

# UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant*  
Institut de Chimie Organique et Analytique

## THÈSE présentée par :

**Elodie TREUILLET**

soutenue le : **19 Mars 2025**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Chimie. Chimie Organique

## Synthèse d'oligosaccharides de sulfates de chondroïtine multivalents (CS) comme nouveaux outils pour l'étude des interactions protéines-CS

### THÈSE dirigée par :

Mme LOPIN-BON Chrystel

Professeure, Université d'Orléans

### CO-ENCADREE par :

Mme SCHULER Marie

Maître de conférences, Université d'Orléans

### RAPPORTEURS :

Mr BONNAFFE David

Professeur, Université Paris-Saclay

Mr LEGENTIL Laurent

Chargé de Recherche, Université de Rennes

---

### JURY :

Mr BONNAFFE David

Professeur, Université Paris-Saclay

Mme GOUHIER Géraldine

Professeure, Université de Rouen

Mr LEGENTIL Laurent

Chargé de Recherche, Université de Rennes

Mme LOPIN-BON Chrystel

Professeure, Université d'Orléans

Mme SCHULER Marie

Maître de conférences, Université d'Orléans

Mr SUZENET Franck

Professeur, Université d'Orléans, Président du jury



*A mon père,*

*Et à tous ceux qui me sont chers,*





---

## REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été réalisés à l'Université d'Orléans et plus précisément au sein de l'Institut de Chimie Organique et Analytique sous la direction du Pr. Chrystel Lopin-Bon et du Dr. Marie Schuler.

Je remercie tout d'abord le Labex SynOrg pour leur soutien financier.

Je tiens à remercier Mr David Bonnaffé, Professeur à l'Université de Paris-Saclay, et Mr Laurent Legentil, Chargé de Recherches à l'Université de Rennes, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs tout comme Mme Géraldine Gouhier, Professeure à l'Université de Rouen, et Mr Franck Suzenet, Professeur à l'Université d'Orléans, en tant qu'examineurs.

Un énorme merci à Chrystel et Marie pour m'avoir fait confiance dès le projet de recherche en 2<sup>ème</sup> année de Master puis pour le poste d'Ingénieure d'Etudes. Merci d'avoir cru en moi pour mener à bien ce projet. Merci d'avoir été patientes et de bon conseil. Votre binôme m'a permis d'apprendre la patience à mon tour, toujours dans la bonne humeur. Merci pour le soutien et la gentillesse dont vous avez fait preuve. Vous avez toujours été à l'écoute et disponibles du mieux que vous le pouviez afin que ni le côté professionnel, ni le côté personnel ne soit affecté. Chrystel, je te remercie pour la transmission de ton expérience sur les sulfates de chondroïtine et toutes les anecdotes souvent très drôles avec tes enfants. Merci pour les discours réconfortants notamment quand je ne me pensais pas capable de faire une thèse. Marie, je te remercie pour ton énergie débordante, ton honnêteté et ta confiance pour les TP à l'IUT. Merci à toutes les deux pour tous les gâteaux et chocolats partagés.

Je me dois également de remercier Pierre aka le Docteur Buisson qui m'a fait apprécier le projet avant même que je ne sois diplômée. Ta bible était celle d'Aude, la mienne, c'est ton manuscrit ! Merci pour tout le travail que tu as fait sur le projet, et merci de m'avoir aidée à démarrer la suite.

Mes remerciements s'adressent également aux différents collaborateurs de l'ANR Modulate avec qui j'ai pu échanger : l'équipe du Dr. Fabien Lecaille du CEPR, l'équipe du Dr. Ludovic Landemarre de GLYcoDiag et l'équipe du Directeur de recherche Régis Daniel au laboratoire LAMBE. Nos différentes rencontres m'ont permis de suivre chacun des aspects du projet dans une ambiance toujours très agréable. Merci à GLYcoDiag pour les néoglycoprotéines et merci à Régis pour les futures purifications de nos composés multivalents. Merci également à Géraldine pour le travail sur les cyclodextrines.

Je remercie ensuite les membres de l'ICOA qui nous ont aidées pendant ces trois années. Je pense au Dr. Cyril Colas et à Sandrine Zubrzycki qui nous ont aidées pour mettre en place la HILIC puis la HILIC-

HRMS et Arnaud Paris pour toutes les lyophilisations tout comme Pierre-Eric et David pour les échanges. Merci également à toute l'équipe Glyco pour tous les échanges très intéressants : Arnaud T., Pierre L., Estelle, Julien C., Malika...

Merci à Hervé Meudal du CBM qui m'a permis d'obtenir de belles RMNs des composés multivalents synthétisés en faible quantité.

Je poursuis ces remerciements avec mes collègues de l'ICOA. Merci à David, Caroline, Camille pour notre dernier congrès ensemble, c'était sympa de manger de la ratatouille sous toutes les formes, de jouer à des jeux et d'avoir un endroit où se doucher avec de l'eau chaude. Merci à Florian pour son aide au laboratoire. Merci à Modou, Rémi, Floriane, Mathias pour tous les échanges ! Merci à Sheïma d'être passée par là. Merci à tous ceux que je n'ai pas cité, encore présents ou déjà partis.

Et puis, il y a les collègues devenus amis. Merci à Thomas et Milène de nous avoir fait découvrir tous ces jeux lors de ces soirées pleines de stratégie, merci pour le soutien, les moments de joie et les repas. Je remercie particulièrement Pauline pour l'amitié solide qu'on a construit malgré nos incompréhensions provoquées par nos différences. Merci de m'avoir fait confiance dès le premier jour pour me confier tes petits et gros tracas, merci pour ton aide au labo, merci pour tous tes délicieux gâteaux, merci pour nos soirées, merci d'avoir fait de ton mieux pour me comprendre. J'espère qu'on se reverra tous en Irlande.

Il y a aussi une autre catégorie. Cette personne qui rentre dans votre vie au moment où vous vous y attendez le moins et qui vous bouleverse. Ju, merci d'avoir toujours été toi et là. Merci de m'avoir véhiculée quand je me suis blessée, merci de m'avoir soutenue chaque fois qu'une glycosylation ou une click ne fonctionnait malheureusement pas, merci d'être resté tard parfois et de m'avoir aidé parce que j'avais un rythme effréné. Merci d'avoir accepté de vivre une nouvelle aventure loin de ta famille. Merci. En fin de compte, je n'aurais jamais pensé dire ça un jour mais, ça n'a pas été une si mauvaise chose la rupture du ligament croisé.

Je remercie chaque stagiaire qui a pu travailler sur ce projet : Dylan, Evan, Antonin, Baptiste. Un merci particulier à Marie qui n'a pas regardé ses heures et qui m'a aidé à réaliser des tests annexes au moment où le projet avançait moins vite. Merci également à Sophie Front et Elmyre qui ont réalisé plusieurs hydrolyses du polymère pour nous aider.

Merci à Marie, Patrice, Nicolas et Georges pour les travaux pratiques à l'IUT ainsi qu'aux étudiants pour leur écoute. Un merci spécial à Marie-Aude, mon binôme de TP, avec qui j'ai découvert et apprécié l'encadrement. Merci à tous pour votre confiance, cette expérience m'a fait grandir.

Merci au programme EDIFICE qui m'a permis de montrer à des étudiants de 1<sup>ère</sup> de mon ancien lycée un peu de la vie au laboratoire tout en revoyant d'anciens professeurs. Un grand merci à l'équipe de MT180 et mon binôme Marine pour cette expérience folle qui m'aura menée jusqu'à Paris. Merci à tous les bénévoles de l'association TEDxOrléans qui m'ont permis de vivre une aventure incroyable de plusieurs mois, en parallèle de la thèse, en tant que speaker. Grâce à ces deux exercices, j'ai grandi en m'adressant à un public avec une vulgarisation de mon sujet de thèse tout en y mettant un peu de moi. Voir la fierté dans les yeux de son père, ça n'a pas de prix.

Merci à tous mes amis qui m'ont toujours soutenue, qui ont cru en moi et qui m'ont aidée à m'aérer l'esprit. Merci à Inès (la plus incroyable des futures mamans et mon binôme de coaching), Lulu (qui aidera beaucoup de jeunes à s'en sortir), Swann (qui va tout déchirer en médecine), Antoine (qui a été, est et sera toujours là), Anthony (le binôme du CMI), Manon (depuis le début), Claire-Lise (ma globe-trotteuse), Alexia (ma sœur de cœur), et j'en passe. Un merci spécial à Pauline, la coloc et amie, qui a supporté toutes mes humeurs, qui a toujours aimé mes plats et qui me manquera pour sûr.

Je finirai par remercier ma famille. Mes grands-parents pour leur soutien à différents moments de ma vie, Caro qui est maman d'un adorable petit Théo, Anaïs qui deviendra, je l'espère, une grande écrivaine, et ma Lilou qui me remplit le cœur de tendresse à chaque fois que je la vois. Bien évidemment Adeline qui a suivi toute l'aventure, essayant de comprendre ce que je racontais, qui m'a fait rire à en pleurer, qui m'a épaulée et écoutée aussi en étant finalement la mère adoptive dont je rêvais. Et le meilleur pour la fin, la cerise sur le gâteau : mon très cher et tendre père sans qui je ne serais certainement pas celle que je suis aujourd'hui. Merci à toi d'avoir toujours fait de ton mieux pour que je réussisse là où je le souhaitais, merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir toujours poussée aussi. Merci d'être ma force.

Une douce pensée pour ma maman.

Go raibh maith agat!



# Table des matières

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Remerciements</b>                                                                 | <b>3</b>  |
| <b>Table des figures, schémas et tableaux</b>                                        | <b>13</b> |
| <b>Abréviations</b>                                                                  | <b>19</b> |
| <b>Introduction générale</b>                                                         | <b>23</b> |
| <b>Introduction</b>                                                                  | <b>25</b> |
| <b>Protéoglycanes et glycosaminoglycanes : définitions, structures et propriétés</b> | <b>27</b> |
| 1. Protéoglycanes                                                                    | 27        |
| 2. Glycosaminoglycanes                                                               | 28        |
| 2.1. L'acide hyaluronique                                                            | 29        |
| 2.2. Sulfates d'héparane et héparine                                                 | 30        |
| 2.3. Sulfates de kératane                                                            | 31        |
| 2.4. Sulfates de dermatane                                                           | 32        |
| 2.5. Sulfates de chondroïtine                                                        | 32        |
| A- Structure                                                                         | 33        |
| B- Localisation                                                                      | 33        |
| C- Les protéoglycanes de sulfates de chondroïtine (CSPGs)                            | 33        |
| <b>Sulfates de chondroïtine : propriétés biologiques et applications</b>             | <b>35</b> |
| 1. Processus biologiques                                                             | 35        |
| 1.1 Processus physiologiques                                                         | 35        |
| A- Au sein du squelette                                                              | 35        |
| B- Au niveau de la peau                                                              | 35        |
| C- Dans le sang                                                                      | 36        |
| D- Dans le cerveau                                                                   | 36        |
| 1.2. Processus pathologiques                                                         | 37        |
| A- Implication dans des cancers                                                      | 37        |
| B- Implication dans l'adsorption de virus et dans des infections                     | 38        |
| C- Implication dans des maladies neurodégénératives et autres troubles neuroaux      | 38        |
| D- Implication dans des maladies articulaires ou musculaires                         | 40        |
| 2. Applications                                                                      | 41        |
| 2.1. Compléments alimentaires                                                        | 41        |
| 2.2. Biomatériels                                                                    | 41        |
| 2.3. Médicaments et cosmétiques                                                      | 42        |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>L'ostéoporose et la cathepsine K</b>                       | <b>44</b> |
| 1. Généralités sur l'ostéoporose                              | 44        |
| 1.1. Définitions et symptômes                                 | 44        |
| 1.2. Phénomènes biologiques                                   | 45        |
| A- Composition du tissu osseux                                | 45        |
| B- Remodelage osseux                                          | 46        |
| 2. Focus sur la cathepsine K                                  | 48        |
| 2.1. Définition et rôle                                       | 48        |
| 2.2. Mode d'action de Cat K                                   | 48        |
| 3. Traitements                                                | 51        |
| 3.1. Agents anaboliques                                       | 51        |
| 3.2. Nutriments                                               | 51        |
| 3.3. Agents anti-résorption                                   | 52        |
| <b>Objectif de la thèse</b>                                   | <b>56</b> |
| <b>Multivalence</b>                                           | <b>58</b> |
| 1. Généralités                                                | 58        |
| 1.1. Définition                                               | 58        |
| 1.2. Synthèse d'objets multivalents                           | 58        |
| 2. Exemples de multivalence de sucres                         | 60        |
| 2.1. Systèmes multivalents pour les lectines de l'humain      | 60        |
| 2.2. Inhibition de glycosidases par des composés multivalents | 62        |
| 3. GAGs multivalents                                          | 64        |
| 3.1. Synthèse d'héparine multivalente                         | 64        |
| 3.2. Synthèse de sulfates d'héparanes multivalents            | 66        |
| 3.3. Synthèse de sulfates de kératane multivalents            | 68        |
| 3.4. Synthèse de sulfates de chondroïtine fucosylés           | 69        |
| 3.5. Synthèse de CS multivalents                              | 72        |
| A- Dendrimères de CS-E par l'équipe de Zhao                   | 72        |
| B- Glycopolymères de CS par l'équipe de Hsieh-Wilson          | 74        |
| C- Glycopeptides de CS-E par l'équipe de Lee                  | 75        |
| D- Glycoclusters de CS-E par l'équipe de De Paz               | 77        |
| <b>Résultats et Discussion</b>                                | <b>81</b> |
| <b>Rétrosynthèse</b>                                          | <b>83</b> |
| <b>Synthèse des disaccharides de CS</b>                       | <b>85</b> |
| 1. Synthèse du disaccharide clé 64                            | 85        |

|                                                                    |            |
|--------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.1. Hémisynthèse et synthèse du disaccharide <b>41</b>            | 85         |
| 1.2. Synthèse du disaccharide protégé <b>63</b>                    | 86         |
| 1.3. Synthèse de l'imidate <b>64</b>                               | 88         |
| 2. Synthèse des disaccharides de CS diversement sulfatés ou non    | 89         |
| 2.1. Introduction de l'aglycone azidopropyle                       | 89         |
| 2.2. Sulfatation et déprotection des disaccharides                 | 90         |
| 4. Conclusion                                                      | 95         |
| <b>Synthèse des tétrasaccharides de CS</b>                         | <b>97</b>  |
| 1. Synthèse du diol 69                                             | 98         |
| 1.1. Synthèse du disaccharide <b>68</b>                            | 98         |
| 1.2. Introduction du groupement lévulinoyle et synthèse du diol 69 | 99         |
| 2. Synthèse des donneurs chloroacétylés                            | 101        |
| 2.1. Protection des futures positions à sulfater                   | 101        |
| 2.2. Synthèse du donneur 4,6-dichloroacétylé                       | 102        |
| 3. Nouvelle voie de synthèse des tétrasaccharides                  | 103        |
| 3.1. Synthèse des disaccharides donneurs acétylés                  | 104        |
| 3.2. Synthèse des disaccharides accepteurs                         | 106        |
| A- Introduction de l'ester lévulinoate                             | 106        |
| B- Synthèse des différents accepteurs                              | 107        |
| Synthèse de l'accepteur tétrabenzoylé                              | 108        |
| Synthèse des accepteurs chloroacétylés                             | 109        |
| 3.3. Conclusion                                                    | 110        |
| 4. Synthèse des tétrasaccharides                                   | 111        |
| 4.1. Vers la synthèse des tétrasaccharides sulfatés                | 111        |
| 4.2. Vers la synthèse d'un tétrasaccharide non-sulfaté             | 113        |
| 4.3. Voie alternative pour la synthèse des tétrasaccharides        | 115        |
| 4.4. Conclusion                                                    | 116        |
| <b>Synthèse des trisaccharides</b>                                 | <b>117</b> |
| 1. Synthèse du monosaccharide accepteur 128                        | 117        |
| 2. Synthèse du trisaccharide non-sulfaté protégé                   | 118        |
| 2.1. Glycosylation [2+1] avec l'imidate per-acétylé                | 118        |
| 2.2. Nouvelle stratégie de synthèse du trisaccharide non-sulfaté   | 120        |
| A- A partir du trisaccharide NAP                                   | 121        |
| Synthèse de l'accepteur                                            | 121        |
| Glycosylation [2+1]                                                | 121        |
| Introduction du bras azidopropyle                                  | 123        |
| B- A partir du trisaccharide portant le bromopropyle               | 123        |

|                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| Synthèse de l'accepteur                                                 | 124        |
| Glycosylation [2+1]                                                     | 124        |
| Synthèse du trisaccharide <b>139</b>                                    | 125        |
| 2.3. Comparaison des stratégies                                         | 126        |
| 2.4. Déprotection du trisaccharide non-sulfaté                          | 126        |
| 3. Synthèse des trisaccharides diversement sulfatés                     | 127        |
| 3.1. Synthèse des donneurs                                              | 127        |
| A- Protection des positions 4 et/ou 6 de la D-GalN                      | 127        |
| B- Activation de la position anomère                                    | 128        |
| Méthode avec les triflates de lanthanides ( $\text{Ln}(\text{OTf})_3$ ) | 129        |
| Méthode avec la diméthylaminopropylamine (DMAPA)                        | 129        |
| Méthode avec la benzylamine ( $\text{BnNH}_2$ )                         | 130        |
| C- A partir du disaccharide 68 portant le 2-naphtylméthyle              | 132        |
| 3.2. Synthèse des trisaccharides protégés                               | 132        |
| 3.3. Sulfatation afin d'accéder aux composés sulfatés                   | 134        |
| 3.4. Déprotection                                                       | 135        |
| <b>Composés multivalents</b>                                            | <b>137</b> |
| 1. La cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (CuAAC)          | 137        |
| 2.1. Historique                                                         | 137        |
| 2.2. Mécanisme de la CuAAC                                              | 139        |
| 2.3. Conditions de réaction                                             | 140        |
| 2. Plateformes utilisées                                                | 142        |
| 3. Conditions de réaction choisies et contraintes                       | 143        |
| 4. CuAAC avec les disaccharides de CS                                   | 145        |
| 4.1. Composés trivalents                                                | 146        |
| A- Optimisation de la réaction avec le disaccharide non-sulfaté         | 146        |
| B- Optimisation de la réaction avec les disaccharides sulfatés          | 149        |
| C- Analyses des composés trivalents                                     | 151        |
| 4.2. Sur la plateforme tétravalente                                     | 153        |
| A-Couplage par CuAAC                                                    | 153        |
| B- Analyse des composés                                                 | 156        |
| 4.3. Essais de CuAAC sur une autre plateforme trivalente 193            | 161        |
| 4.4. Essais de CuAAC sur des cyclodextrines                             | 164        |
| 5. CuAAC avec les trisaccharides                                        | 165        |
| 5.1. Trisaccharides trivalents et tétravalents                          | 165        |
| 5.2. Synthèse des néoglycoprotéines                                     | 167        |
| 5. Conclusion                                                           | 169        |



|                                        |            |
|----------------------------------------|------------|
| <b>Conclusion et Perspectives</b>      | <b>171</b> |
| <b>Conclusion</b>                      | <b>173</b> |
| 1. Synthèse des oligosaccharides de CS | 173        |
| 2. Synthèse des composés multivalents  | 176        |
| <b>Perspectives</b>                    | <b>178</b> |
| <b>Partie expérimentale</b>            | <b>181</b> |
| <b>Références Bibliographiques</b>     | <b>297</b> |



# TABLE DES FIGURES, SCHEMAS ET TABLEAUX

## Figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Représentation schématique d'un PG.                                                                                                                                                                                                                                                 | 27  |
| Figure 2 : Exemples de PGs.                                                                                                                                                                                                                                                                    | 28  |
| Figure 3 : Structure des différents GAGs.                                                                                                                                                                                                                                                      | 29  |
| Figure 4 : Différents motifs de sulfatation des CS.                                                                                                                                                                                                                                            | 33  |
| Figure 5 : Exemples des principaux CSPGs.                                                                                                                                                                                                                                                      | 34  |
| Figure 6 : Schéma représentant le rôle des CSPGs dans certains troubles neuroaux. <sup>24</sup>                                                                                                                                                                                                | 39  |
| Figure 7 : Applications des CS.                                                                                                                                                                                                                                                                | 43  |
| Figure 8 : Cycle de l'ostéoporose.                                                                                                                                                                                                                                                             | 45  |
| Figure 9 : Balance représentant le remodelage osseux ainsi que la perte osseuse.                                                                                                                                                                                                               | 46  |
| Figure 10 : Représentation schématique du renouvellement osseux.                                                                                                                                                                                                                               | 47  |
| Figure 11 : Représentation de l'étape de résorption de l'os.                                                                                                                                                                                                                                   | 47  |
| Figure 12 : (a) Structure cristalline du complexe Cat K/CS-A (PDB ID 3C9E) ; (b) A gauche, le CS-A en interaction avec les exosites chargés positivement (en bleu) et à droite le site actif de Cat K chargé négativement (en rouge) cristallisé avec un inhibiteur connu (E64). <sup>57</sup> | 49  |
| Figure 13 : Mécanismes proposés pour la protéolyse du collagène.                                                                                                                                                                                                                               | 50  |
| Figure 14 : Effets des différents traitements utilisés sur le processus de remodelage osseux. <sup>62</sup>                                                                                                                                                                                    | 54  |
| Figure 15 : Inhibition du complexe CS/Cat K naturel et, par conséquent, de l'activité collagénolytique.                                                                                                                                                                                        | 56  |
| Figure 16 : Objectif de la thèse.                                                                                                                                                                                                                                                              | 57  |
| Figure 17 : Oligosaccharides à synthétiser.                                                                                                                                                                                                                                                    | 57  |
| Figure 18 : Plateformes envisagées dans ce projet.                                                                                                                                                                                                                                             | 57  |
| Figure 19 : Représentation d'un objet multivalent.                                                                                                                                                                                                                                             | 59  |
| Figure 20 : Exemples de plateformes utilisées. <sup>66</sup>                                                                                                                                                                                                                                   | 60  |
| Figure 21 : Types de composés multivalents utilisés pour l'étude des interactions avec des lectines. <sup>71</sup>                                                                                                                                                                             | 61  |
| Figure 22 : Synthèse de néoglycoprotéines ciblant les galectines par Böcker et al. <sup>72</sup>                                                                                                                                                                                               | 62  |
| Figure 23 : Composés multivalents synthétisés pour l'étude de l'interaction avec des glycosidases. <sup>75</sup>                                                                                                                                                                               | 63  |
| Figure 24 : Plateforme de type PAMAM utilisée par l'équipe de Seeberger. <sup>77</sup>                                                                                                                                                                                                         | 64  |
| Figure 25 : Résumé des CS multivalents synthétisés par différentes équipes. <sup>84-92</sup>                                                                                                                                                                                                   | 80  |
| Figure 26 : Comparaison des spectres de RMN <sup>1</sup> H du diol 81 et du disaccharide 4,6-OSO <sub>3</sub> Na 82.                                                                                                                                                                           | 93  |
| Figure 27 : Comparaison des spectres de RMN <sup>1</sup> H des disaccharides 4-OH et 4-OSO <sub>3</sub> Na.                                                                                                                                                                                    | 94  |
| Figure 28 : Comparaison des spectres de RMN <sup>13</sup> C du diol 81 et du disaccharide 6-OSO <sub>3</sub> Na 84.                                                                                                                                                                            | 95  |
| Figure 29 : Sous-produits de la glycosylation [2+2] avec les composés 4-chloroacétylés.                                                                                                                                                                                                        | 113 |
| Figure 30 : Oxazoline dérivant du disaccharide 99.                                                                                                                                                                                                                                             | 114 |
| Figure 31 : Résumé des tétrasaccharides synthétisés.                                                                                                                                                                                                                                           | 116 |
| Figure 32 : Sous-produit obtenu lors de la glycosylation de 99 et 145.                                                                                                                                                                                                                         | 123 |

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 33 : Sous-produit obtenu lors de la glycosylation de 99 et 147.                                                                                            | 125 |
| Figure 34 : Exemples de déprotection de l'acétate anomère avec la DMAPA. <sup>107</sup>                                                                           | 130 |
| Figure 35 : Sous-produits observés lors des glycosylations avec les donneurs lévulinoylés.                                                                        | 134 |
| Figure 36 : Résumé des trisaccharides synthétisés.                                                                                                                | 136 |
| Figure 37 : Cycloaddition de Huisgen. <sup>2</sup>                                                                                                                | 138 |
| Figure 38 : Cycloadditions envisageables en fonction du composé désiré. <sup>3,4</sup>                                                                            | 138 |
| Figure 39 : Mécanisme de la CuAAC proposé par Fokin et confirmé par Bertrand et al.                                                                               | 140 |
| Figure 40 : Exemples de ligands utilisés pour stabiliser le cuivre sous sa forme oxydée (I) dans les CuAAC. <sup>116,</sup>                                       | 141 |
| Figure 41 : Chromatogrammes obtenus par HILIC-DEDL des différents réactifs de la CuAAC.                                                                           | 145 |
| Figure 42 : Synthèse des disaccharides de CS multivalents.                                                                                                        | 146 |
| Figure 43 : RMN <sup>1</sup> H 700 MHz du disaccharide trivalent non-sulfaté.                                                                                     | 151 |
| Figure 44 : RMN <sup>13</sup> C 700 MHz du disaccharide trivalent non-sulfaté.                                                                                    | 152 |
| Figure 45 : RMN <sup>1</sup> H 700 MHz du disaccharide trivalent 4-sulfaté.                                                                                       | 152 |
| Figure 46 : RMN <sup>13</sup> C 700 MHz du disaccharide trivalent 4-sulfaté.                                                                                      | 152 |
| Figure 47 : RMN <sup>1</sup> H 700 MHz du disaccharide trivalent 6-sulfaté.                                                                                       | 153 |
| Figure 48 : RMN <sup>13</sup> C 700 MHz du disaccharide trivalent 6-sulfaté.                                                                                      | 153 |
| Figure 49 : RMN <sup>1</sup> H 700 MHz du disaccharide trivalent 4,6-disulfaté.                                                                                   | 153 |
| Figure 50 : Composé trivalent sans alcyne sur le bras restant (C <sub>65</sub> H <sub>100</sub> N <sub>12</sub> O <sub>49</sub> S <sub>3</sub> m/z : 964.243759). | 156 |
| Figure 51 : Analyses d'un disaccharide non-sulfaté tétravalent.                                                                                                   | 157 |
| Figure 52 : RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C d'un disaccharide non-sulfaté tétravalent après purification de la plateforme.                                  | 159 |
| Figure 53 : RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C (700 MHz, D <sub>2</sub> O) d'un disaccharide 4-sulfaté tétravalent.                                            | 160 |
| Figure 54 : RMN <sup>1</sup> H (700 MHz, D <sub>2</sub> O) d'un disaccharide 6-sulfaté tétravalent.                                                               | 160 |
| Figure 55 : RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C (700 MHz, D <sub>2</sub> O) d'un disaccharide non-sulfaté trivalent (P3-OH).                                    | 163 |
| Figure 56 : RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C (700 MHz, D <sub>2</sub> O) d'un disaccharide 4-sulfaté trivalent (P3-OH).                                      | 164 |
| Figure 57 : Réaction de CuAAC entre une cyclodextrine et un disaccharide de CS.                                                                                   | 165 |
| Figure 58 : RMN <sup>1</sup> H du trisaccharide trivalent.                                                                                                        | 167 |
| Figure 59 : Composés multivalents synthétisés. * impur                                                                                                            | 170 |
| Figure 60 : Composés synthétisés.                                                                                                                                 | 176 |
| Figure 61 : β-cyclodextrines entièrement fonctionnalisées.                                                                                                        | 179 |

## Schémas

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Schéma 1 : Dendrimères à base d'héparine et d'une plateforme de type PAMAM. <sup>77</sup>                               | 65 |
| Schéma 2 : Glycopolymères d'héparines par l'équipe de Hsieh-Wilson. <sup>78</sup>                                       | 66 |
| Schéma 3 : Glycopolymères de sulfates d'héparane synthétisés par l'équipe de Nguyen. <sup>79</sup>                      | 67 |
| Schéma 4 : Exemple de glyoclusters de disaccharides de sulfates d'héparane par l'équipe de Zubkova. <sup>81</sup>       | 68 |
| Schéma 5 : Glycocluster et glycopolymère de sulfates de kératane de l'équipe de Taniguchi. <sup>83</sup>                | 69 |
| Schéma 6 : Synthèse des trisaccharides de sulfates de chondroïtine fucosylés par L'équipe de Li Zhongjun. <sup>84</sup> | 70 |

|                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Schéma 7 : Synthèse de glycoclusters de sulfates de chondroïtine fucosylés avec un espaceur. <sup>84</sup>  | 71  |
| Schéma 8 : Synthèse de glycoclusters de sulfates de chondroïtine fucosylés sans espaceur. <sup>85</sup>     | 72  |
| Schéma 9 : Synthèse des disaccharides de CS-E par Zhao et al. <sup>86,87</sup>                              | 73  |
| Schéma 10 : Synthèse de glycodendrimères de CS-E par l'équipe de Zhao. <sup>86</sup>                        | 73  |
| Schéma 11 : Synthèse des oligosaccharides de CS-E par Hsieh-Wilson et al. <sup>89,90</sup>                  | 75  |
| Schéma 12 : Synthèse de glycopeptides de disaccharides de CS-E par l'équipe de Lee. <sup>91,92</sup>        | 76  |
| Schéma 13 : Synthèse du disaccharide de CS-E réalisée par l'équipe de De Paz. <sup>93</sup>                 | 77  |
| Schéma 14 : Glycoclusters de CS-E de génération 1 et 2 synthétisés par l'équipe de De Paz. <sup>93,94</sup> | 78  |
| Schéma 15 : Rétrosynthèse générale des oligosaccharides de sulfates de chondroïtine envisagés.              | 84  |
| Schéma 16 : Stratégie de l'hémisynthèse.                                                                    | 86  |
| Schéma 17 : Mécanisme de glycosylation (version simplifiée).                                                | 86  |
| Schéma 18 : Mécanisme de glycosylation avec présence d'un groupe participant de type amide en C2.           | 87  |
| Schéma 19 : N-trifluoroacétylation et protection des hydroxyles.                                            | 88  |
| Schéma 20 : Synthèse du trichloroacétimidate 64.                                                            | 89  |
| Schéma 21 : Glycosylation puis substitution nucléophile pour obtenir le composé 80.                         | 90  |
| Schéma 22 : Déprotection du benzylidène.                                                                    | 90  |
| Schéma 23 : Stratégies envisageables à partir du diol 81 pour obtenir les disaccharides déprotégés.         | 91  |
| Schéma 24 : Synthèse du disaccharide non-sulfaté déprotégé 65.                                              | 91  |
| Schéma 25 : Synthèse des disaccharides 4, 6 et 4,6-sulfatés 82-84.                                          | 92  |
| Schéma 26 : Déprotection et N-acétylation pour obtenir les disaccharides de CS-A, -C et -E déprotégés.      | 95  |
| Schéma 27 : Résumé de la synthèse des disaccharides sulfatés et non-sulfaté.                                | 96  |
| Schéma 28 : Rétrosynthèse des tétrasaccharides de sulfates de chondroïtine.                                 | 98  |
| Schéma 29 : Glycosylation avec le 2-naphtalèneméthanol.                                                     | 99  |
| Schéma 30 : Synthèse du composé 69.                                                                         | 100 |
| Schéma 31 : Synthèse des disaccharides 4, 6 et 4,6-chloroacétylés 90-92.                                    | 101 |
| Schéma 32 : Synthèse du disaccharide donneur 94.                                                            | 102 |
| Schéma 33 : Conclusion sur la synthèse du donneur 94.                                                       | 103 |
| Schéma 34 : Nouvelle voie de synthèse envisagée pour atteindre les tétrasaccharides.                        | 104 |
| Schéma 35 : Hydrolyse du benzylidène du composé 7.                                                          | 104 |
| Schéma 36 : Synthèse du donneur per-acétylé 99.                                                             | 105 |
| Schéma 37 : Synthèse des disaccharides donneurs chloroacétylés 101, 103 et 105.                             | 106 |
| Schéma 38 : Synthèse du composé 107.                                                                        | 107 |
| Schéma 39 : Stratégies de synthèse envisagées à partir du disaccharide 107.                                 | 108 |
| Schéma 40 : Synthèse du disaccharide accepteur tétrabenzoylé 111.                                           | 109 |
| Schéma 41 : Synthèse du diol 112.                                                                           | 109 |
| Schéma 42 : Synthèse des accepteurs chloroacétylés 114 et 116.                                              | 110 |
| Schéma 43 : Blocs disaccharidiques donneurs et accepteurs synthétisés.                                      | 111 |
| Schéma 44 : Synthèse des tétrasaccharides par glycosylation [2+2].                                          | 112 |

|                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Schéma 45 : Synthèse du composé 121 par glycosylation [2+2].                                     | 113 |
| Schéma 46 : Synthèse du tétrasaccharide déprotégé 123.                                           | 114 |
| Schéma 47 : Synthèse du composé 125 par glycosylation [2+2].                                     | 115 |
| Schéma 48 : Rétrosynthèse des trisaccharides de sulfates de chondroïtine.                        | 117 |
| Schéma 49 : Synthèse du monosaccharide accepteur 128.                                            | 118 |
| Schéma 50 : Synthèse du trisaccharide non-sulfaté protégé.                                       | 118 |
| Schéma 51 : Synthèse du monosaccharide accepteur 141.                                            | 119 |
| Schéma 52 : Synthèse du trisaccharide 81 portant un PEG-N <sub>3</sub> .                         | 119 |
| Schéma 53 : Synthèse du trisaccharide 141.                                                       | 120 |
| Schéma 54 : Voies alternatives permettant de synthétiser le trisaccharide 139.                   | 120 |
| Schéma 55 : Synthèse de l'accepteur 145 portant le NAP comme aglycone.                           | 121 |
| Schéma 56 : Synthèse du trisaccharide 146 portant le groupement NAP.                             | 121 |
| Schéma 57 : Synthèse du trisaccharide 139 à partir du trisaccharide 146.                         | 123 |
| Schéma 58 : Synthèse de l'accepteur bromé 147.                                                   | 124 |
| Schéma 59 : Synthèse du composé 148.                                                             | 124 |
| Schéma 60 : Introduction du groupement azide.                                                    | 125 |
| Schéma 61 : Bilan et comparaison des deux stratégies de synthèse pour obtenir le composé 139.    | 126 |
| Schéma 62 : Déprotection du trisaccharide 133.                                                   | 126 |
| Schéma 63 : Test de substitution du brome par l'azoture de sodium en présence de chloroacétates. | 127 |
| Schéma 64 : Protection des positions 4 et/ou 6 de la D-GalN avec des esters lévulinoates.        | 128 |
| Schéma 65 : Tests de déprotection de l'acétate anomère avec les triflates de lanthanides.        | 129 |
| Schéma 66 : Tests de déprotection de l'acétate anomère avec la DMAPA.                            | 130 |
| Schéma 67 : Synthèse du composé 143 via la méthode avec la benzylamine.                          | 131 |
| Schéma 68 : Synthèse des disaccharides donneurs 163-165.                                         | 131 |
| Schéma 69 : Synthèse du donneur 163 via le composé portant le groupement 2-naphtylméthyle.       | 132 |
| Schéma 70 : Glycosylation des disaccharides donneurs 163-165 et du monosaccharide accepteur 147. | 133 |
| Schéma 71 : Substitution nucléophile pour insérer le groupement azide.                           | 134 |
| Schéma 72 : Synthèse des trisaccharides diversement sulfatés.                                    | 135 |
| Schéma 73 : Synthèse des trisaccharides finaux.                                                  | 136 |
| Schéma 74 : Cycloadditions azoture-alcyne favorisées par la contrainte (SPAAC).                  | 139 |
| Schéma 75 : Synthèse de la plateforme trivalente 190.                                            | 142 |
| Schéma 76 : Synthèse de la plateforme tétravalente 192.                                          | 143 |
| Schéma 77 : Synthèse du disaccharide non-sulfaté trivalent.                                      | 147 |
| Schéma 78 : Synthèse des disaccharides sulfatés trivalents.                                      | 149 |
| Schéma 79 : Synthèse des disaccharides tétravalents.                                             | 154 |
| Schéma 80 : Synthèse de disaccharides trivalents avec une plateforme aliphatique.                | 161 |
| Schéma 81 : Synthèse des trisaccharides non sulfatés multivalents avec les plateformes simples.  | 166 |
| Schéma 82 : Synthèse de néoglycoprotéines par GLYcoDiag.                                         | 168 |

|                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Schéma 83 : Synthèse de CS diversement sulfatés ou non-sulfaté. _____                                | 173 |
| Schéma 84 : Librairie de blocs donneurs et accepteurs synthétisés. _____                             | 174 |
| Schéma 85 : Tétracaccharides synthétisés. _____                                                      | 175 |
| Schéma 86 : Synthèse du trisaccharide <b>139</b> à partir de deux accepteurs différents. _____       | 175 |
| Schéma 87 : Composés multivalents synthétisés. _____                                                 | 177 |
| Schéma 88 : Stratégies envisageables pour synthétiser les tétrasaccharides. _____                    | 178 |
| Schéma 89 : Exemple de ligation envisageable pour la synthèse d'oligosaccharides multivalents. _____ | 180 |

## Tableaux

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 : Résumé des types de traitements développés et leurs effets secondaires. <sup>60,61,62,63</sup> _____     | 53  |
| Tableau 2 : Valeurs d'IC <sub>50</sub> obtenus par l'équipe de De Paz sur la langérine. <sup>94</sup> _____          | 79  |
| Tableau 3 : Réactions de glycosylation réalisées pour la synthèse de tétrasaccharides chloroacétylés. _____          | 112 |
| Tableau 4 : Conditions utilisées pour la glycosylation de 99 et 112. _____                                           | 113 |
| Tableau 5 : Conditions utilisées pour la glycosylation des composés 99 et 128. _____                                 | 118 |
| Tableau 6 : Optimisation de la réaction de glycosylation donnant le trisaccharide 146. _____                         | 122 |
| Tableau 7 : Optimisation de la réaction de glycosylation donnant le trisaccharide 94. _____                          | 124 |
| Tableau 8 : Optimisation des réactions de glycosylation [2+1] des donneurs 162-165 et de l'accepteur 147. _          | 133 |
| Tableau 9 : Solubilité des réactifs dans différents solvants. _____                                                  | 144 |
| Tableau 10 : Optimisation de la CuAAC avec la plateforme trivalente et le disaccharide non-sulfaté. _____            | 148 |
| Tableau 11 : Optimisation de la CuAAC avec la plateforme trivalente et les disaccharides diversement sulfatés. _____ | 150 |
| Tableau 12 : Synthèse des disaccharides tétravalents diversement sulfatés. _____                                     | 155 |
| Tableau 13 : Optimisation de la CuAAC sur les disaccharides avec une plateforme trivalente aliphatique. ____         | 162 |
| Tableau 14 : Conditions de réaction testées pour la CuAAC avec des cyclodextrines. * Micro-ondes _____               | 165 |
| Tableau 15 : Essais de CuAAC avec les différentes plateformes et le trisaccharide non-sulfaté. * impur _____         | 166 |





---

## ABREVIATIONS

|       |                                                                                                                                       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAPD  | 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine)                                                                                                   |
| Ac    | Acétyle                                                                                                                               |
| ACAN  | Agrécane                                                                                                                              |
| ACN   | Acétonitrile                                                                                                                          |
| AE    | Acétate d'éthyle                                                                                                                      |
| anh.  | Anhydre                                                                                                                               |
| ARN   | Acide RiboNucléique                                                                                                                   |
| Asc   | Ascorbate                                                                                                                             |
| BAIB  | (Diacetoxyiodo)benzene                                                                                                                |
| BCAN  | Brevicane                                                                                                                             |
| BGN   | Biglycane                                                                                                                             |
| Bn    | Benzyle                                                                                                                               |
| BSA   | Albumine de sérum bovin                                                                                                               |
| BTAA  | Acide 2-(4-((bis((1-( <i>tert</i> -butyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-yl)acétique |
| Bu    | Butyle                                                                                                                                |
| Bz    | Benzoyle                                                                                                                              |
| Cat   | Cathepsine                                                                                                                            |
| CCM   | Chromatographie sur couche mince                                                                                                      |
| CEPR  | Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires                                                                                         |
| CRD   | Carbohydrate Recognition Domain                                                                                                       |
| CS    | Sulfates de chondroïtine                                                                                                              |
| CSA   | Acide camphorsulfonique                                                                                                               |
| CuAAC | Copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition                                                                                        |
| d     | Doublet                                                                                                                               |
| DBU   | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène                                                                                                    |
| DCC   | Dicyclohexylcarbodiimide                                                                                                              |
| DCE   | Dichloroéthane                                                                                                                        |
| DCM   | Dichlorométhane                                                                                                                       |
| DCN   | Décorine                                                                                                                              |
| dd    | Doublet de doublet                                                                                                                    |
| DDQ   | 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone                                                                                             |

|                  |                                                               |
|------------------|---------------------------------------------------------------|
| DEDL             | Détecteur évaporatif à diffusion de lumière                   |
| DIPEA            | N,N-Diisopropyléthylamine                                     |
| DMAP             | 4-Diméthylaminopyridine                                       |
| DMF              | Diméthylformamide                                             |
| DMSO             | Diméthylsulfoxyde                                             |
| DP               | Degré de polymérisation                                       |
| DS               | Sulfates de dermatane                                         |
| DTBS             | Di- <i>tert</i> -butyl silyle                                 |
| EDC              | <i>N</i> -éthyl- <i>N'</i> -(diméthylaminopropyl)carbodiimide |
| EP               | Ether de pétrole                                              |
| eq.              | Equivalent molaire                                            |
| ESI              | Ionisation par électrospray                                   |
| Et               | Ethyle                                                        |
| fCS              | Sulfates de chondroïtine fucosylée                            |
| GAG              | Glycosaminoglycane                                            |
| GalN             | Galactosamine                                                 |
| Glc              | Glucose                                                       |
| GlcA             | Acide glucuronique                                            |
| GlcN             | Glucosamine                                                   |
| HA               | Acide hyaluronique ou hyaluronane                             |
| Hep              | Héparine                                                      |
| HILIC            | Hydrophilic interaction liquid chromatography                 |
| HPLC             | High performance liquid chromatography                        |
| HRMS             | Spectrométrie de masse haute résolution                       |
| HS               | Sulfates d'héparane                                           |
| Hz               | Hertz                                                         |
| IC <sub>50</sub> | Concentration pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme      |
| IdoA             | Acide iduronique                                              |
| <i>J</i>         | Constante de couplage                                         |
| K <sub>d</sub>   | Constante de dissociation                                     |
| KS               | Sulfate de kératane                                           |
| LDL              | Lipoprotéine à faible densité                                 |
| Lev              | Lévulinoyle                                                   |
| M                | mol.L <sup>-1</sup>                                           |

|          |                                                            |
|----------|------------------------------------------------------------|
| m        | Multiplet                                                  |
| Me       | Méthyle                                                    |
| MEC      | Matrice extracellulaire                                    |
| MP       | 4-méthoxyphényle                                           |
| MS       | Tamis moléculaire (de l'anglais Molecular Sieves)          |
| MW       | Micro wave                                                 |
| NAP      | Naphtylméthyle                                             |
| NCAN     | Neurocane                                                  |
| nd       | Non déterminé                                              |
| NHS      | <i>N</i> -hydroxysuccinimide                               |
| NIS      | <i>N</i> -iodosuccinimide                                  |
| OA       | Ostéoarthrose                                              |
| P3       | Plateforme trivalente aromatique                           |
| P3-OH    | Plateforme trivalente aliphatique                          |
| P4       | Plateforme tétravalente                                    |
| PAMAM    | Poly(amidoamine)                                           |
| PBS      | Phosphate buffer saline                                    |
| PEG      | Polyéthylène glycol                                        |
| PG       | Protéoglycane                                              |
| Ph       | Phényle                                                    |
| Piv      | Pivaloate                                                  |
| PMB      | <i>p</i> -méthoxybenzyle                                   |
| PNNs     | Réseaux périneuronaux                                      |
| ppm      | Partie par million                                         |
| Py       | Pyridine                                                   |
| q        | Quadruplet                                                 |
| RANKL    | Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B ligand        |
| Rf       | Rapport frontal                                            |
| RMN      | Résonance Magnétique Nucléaire                             |
| RO       | Remodelage osseux                                          |
| ROMP     | Ring Opening Metathesis Polymerization                     |
| SEC-MALS | Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering |
| SLRP     | Small Leucin-Rich Proteoglycan                             |
| SN       | Substitution nucléophile                                   |

|       |                                            |
|-------|--------------------------------------------|
| SNC   | Système nerveux central                    |
| SPAAC | Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition |
| t     | Triplet                                    |
| t.a.  | Température ambiante                       |
| TBAF  | Tetra-n-butylammonium fluoride             |
| TBDPS | <i>tert</i> -butyldiphénysilyle            |
| TBTA  | Tris(benzyltriazolyméthyl)amine            |
| TCA   | Tricloroacétyle                            |
| Tf    | Triflate                                   |
| TFA   | Trifluoroacétyle                           |
| TFE   | 2,2,2-Trifluoroéthanol                     |
| THF   | Tétrahydrofurane                           |
| THPTA | Tris(3-hydroxypropyltriazolyméthyl)amine   |
| TMS   | Triméthylsilyle                            |
| Ts    | Tosyle                                     |
| VCAN  | Versicane                                  |

---

## INTRODUCTION GENERALE

Ces travaux de thèse ont été réalisés grâce au co-financement du Labex SynOrg et de l'Université d'Orléans et ont pour but de synthétiser de nouveaux oligosaccharides de sulfates de chondroïtines (CS) multivalents pour étudier les interactions protéines-CS et plus particulièrement les interactions cathepsine K-CS.

Les sulfates de chondroïtines (CS) sont des macromolécules polysaccharidiques complexes appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Constitués d'une unité disaccharidique répétitive composée d'un acide D-glucuronique (D-GlcA) et d'une 2-acétamido-2-désoxy-D-galactosamine (D-GalN), les CS sont sulfatés en différentes positions ce qui leur confère un caractère polyanionique leur permettant d'interagir avec de nombreuses protéines. Ils interviennent ainsi dans de nombreux processus biologiques comme l'homéostasie tissulaire du cartilage, l'adhésion cellulaire ou la croissance neuronale. Ils sont impliqués dans diverses pathologies comme certains cancers, des infections virales, des maladies neurodégénératives ou encore des maladies articulaires ou musculaires.

L'ostéoporose est une maladie du squelette qui est caractérisée par une faible résistance osseuse entraînant un risque élevé de fractures. Cette maladie est notamment induite par la surexpression d'une protéine, la cathepsine K (Cat K). Cat K est une protéase multifonctionnelle qui possède, entre autres, une activité collagénolytique envers les collagènes de type I et II qui sont des constituants majeurs de l'os engendrant une résorption osseuse et une porosité des os et donc des fractures. Plusieurs inhibiteurs de Cat K ont été développés mais ces derniers visent le site actif ce qui bloque toutes les activités et génère des effets secondaires. Il a été démontré que le processus collagénolytique de la Cat K faisait intervenir un complexe entre l'exosite de la Cat K et un oligosaccharide de CS et que ce complexe ressemble à un « collier de perles » qui s'enroule autour du collagène pour le fragmenter. Dans le cadre d'une collaboration avec le Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires (CEPR) de Tours, qui étudie la cathepsine K, de nouveaux oligosaccharides de CS multivalents ont été synthétisés lors de cette thèse.

La synthèse de CS multivalents reste largement inexplorée et notre stratégie de synthèse repose sur le greffage d'oligosaccharides (du di- à l'hexasaccharide) diversement sulfatés portant un groupement azide sur l'aglycone avec différentes plateformes (aromatique ou aliphatique, protéines, cyclodextrines) fonctionnalisée par un alcyne terminal par chimie click (CuAAC) afin d'obtenir de nouveaux oligosaccharides de CS multivalents envoyés pour une évaluation biologique à nos collaborateurs biologistes.

Ce manuscrit sera divisé en plusieurs parties. Une première partie permettra d'introduire les sulfates de chondroïtine, l'ostéoporose ainsi que la multivalence. Puis, la synthèse des différents oligosaccharides de CS (di-, tétra- et trisaccharides) diversement sulfatés ou non-sulfatés sera exposée avant de présenter la synthèse des composés multivalents *via* cycloaddition de Huisgen. Enfin, une conclusion et des perspectives seront apportées.



# Introduction





---

# PROTEOGLYCANES ET GLYCOSAMINOGLYCANES :

## DEFINITIONS, STRUCTURES ET PROPRIETES

Les sulfates de chondroïtine sont des polysaccharides appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs), des polymères polyanioniques linéaires généralement liés de manière covalente à des protéines pour former des protéoglycanes.

### 1. PROTEOGLYCANES

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules complexes constituées de chaînes polysaccharidiques de GAGs, liées à une protéine porteuse *via* les résidus sérines. Cette liaison se fait par l'intermédiaire d'une zone tétrasaccharidique commune à la majorité des PGs constituée d'un acide D-glucuronique, de deux D-galactoses et d'un D-xylose. C'est par ce dernier que le greffage sur les sérines a lieu.

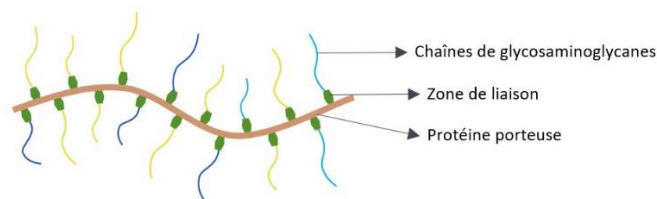


**Figure 1 :** Représentation schématique d'un PG.

Il existe une grande diversité de protéines porteuses, de taille variant de 10 à plus de 500 kDa. Un PG est défini par la nature de la protéine porteuse et des chaînes de GAGs mais au sein d'une même famille, un PG peut être composé d'un type unique de GAG ou de plusieurs, ainsi que d'une seule chaîne ou de plusieurs (*Figure 2*). On dénombre six différents GAGs : les sulfates de chondroïtine (CS), les sulfates d'héparane (HS), les héparines (Hep), les sulfates de kératane (KS), les sulfates de dermatane (DS) et l'acide hyaluronique (HA). Cette grande diversité confère aux PGs diverses activités biologiques allant de la fonction de soutien mécanique à des effets plus complexes comme dans l'adhésion, la motilité et la prolifération des cellules ou encore la différenciation et la morphogénèse des tissus. Ils sont répartis dans les matrices extracellulaires de tous les tissus. <sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Kjellén, L.; Lindahl, U. *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 443.

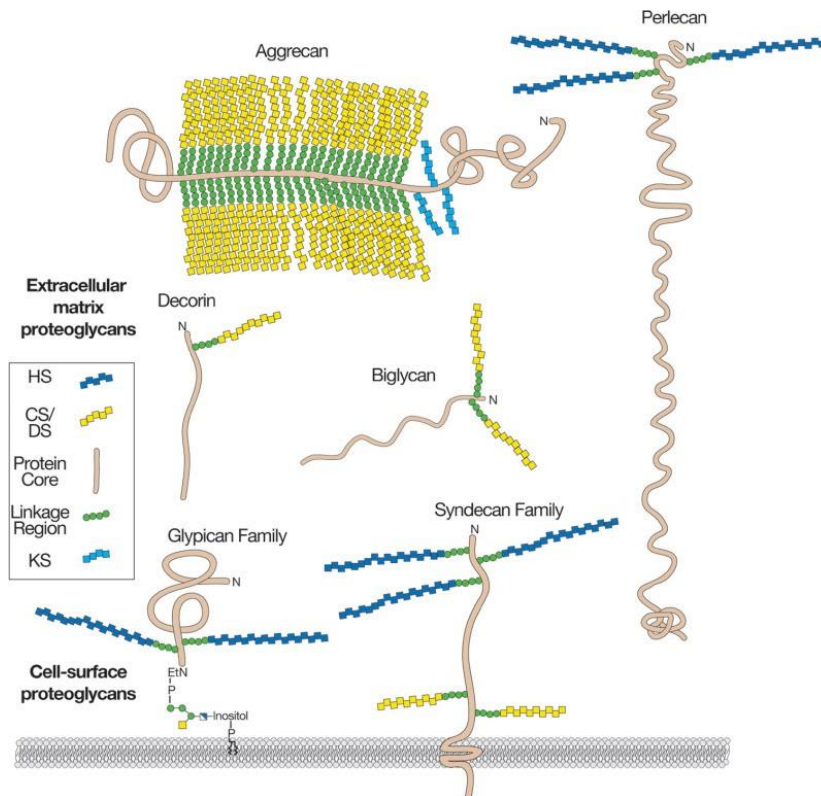


**Figure 2 : Exemples de PGs.<sup>2</sup>**

HS, CS, DS KS sont des GAGs.

## 2. GLYCOSAMINOGLYCANES

Les glycosaminoglycanes, au nombre de 6, sont des polymères linéaires caractérisés par la répétition d'une unité disaccharidique composée d'un acide hexuronique (D-GlcA ou L-IdoA) et d'une hexosamine (D-GalN ou D-GlcN) (Figure 3). On les retrouve dans les matrices extracellulaires (MEC) de nombreux tissus comme le système nerveux, les muscles, les articulations ou encore les os de diverses espèces marines et terrestres comme les humains, les poissons et autres mammifères. La présence de groupements sulfates (seul l'acide hyaluronique n'est pas sulfaté) et carboxylates leur assure un caractère polyanionique qui leur confère des propriétés intéressantes. Impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, ils sont aujourd'hui utilisés dans diverses applications médicales.

<sup>2</sup> Merry, C. L. R.; Lindahl, U.; Couchman, J.; Esko, J. D. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki, A, *et al.*, Essentials of Glycobiology 4<sup>th</sup> edition; 2022.

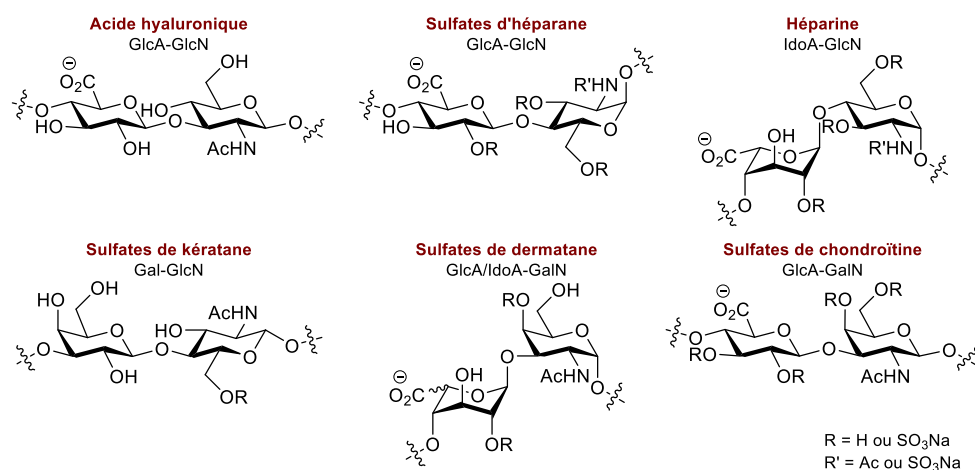


**Figure 3** : Structure des différents GAGs.

## 2.1. L'ACIDE HYALURONIQUE

L'acide hyaluronique, ou hyaluronane (HA), a été découvert en 1934 par Karl Meyer et John Palmer.<sup>3</sup> Son unité répétitive est constituée d'un acide D-glucuronique lié à une N-acétyl-D-glucosamine. Il est le seul GAG non sulfaté et le seul qui ne se lie pas aux protéines porteuses de manière covalente mais il permet l'obtention d'agrégats de PGs dans la matrice extracellulaire. On le retrouve dans les matrices extracellulaires où il joue un rôle dans la mitose, le détachement et la migration cellulaire. Etant hygroscopique, il permet le transport de l'eau et le maintien de la viscoélasticité des tissus, d'où sa présence dans presque tous les tissus humains, notamment les tissus conjonctifs liquides tels que le liquide synovial et l'humeur vitreuse des yeux. D'autres rôles lui sont attribués comme la stimulation de la sécrétion de la matrice extracellulaire ou encore la régulation de l'inflammation pour maintenir l'homéostasie dans les tissus sains.<sup>4,5</sup>

Chez les patients atteints d'arthrose, on retrouve une diminution de la masse molaire moyenne de l'HA dans le liquide synovial à cause de l'hydrolyse de ce GAG en oligosaccharides plus courts. De par sa capacité à agir sur l'inflammation à différents niveaux, il peut être impliqué dans des troubles inflammatoires tels que l'asthme et la maladie de Crohn ou encore dans la prolifération de tumeurs et la formation de métastases lorsqu'il est présent en trop grande quantité.<sup>6</sup>

<sup>3</sup> Meyer, K.; Palmer, J. W. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107*, 629–634.

<sup>4</sup> Sodhi, H.; Panitch, A. *Biomolecules* **2021**, *11*, 29.

<sup>5</sup> Cooper, C. A.; Brown, K. K.; Meletis, C. D.; Zabriskie, N. *Alternative and Complementary Therapies* **2008**, *14*, 78–84.

<sup>6</sup> Köwitsch, A.; Zhou, G.; Groth, T. *J of Tissue Eng Regener Med* **2018**, *12*, e23–e41.

L'HA est biocompatible, biodégradable et résorbable et utilisé depuis des années dans les domaines de la biochimie, la radiochimie, la biophysique moléculaire et la chimie des polymères. Des HA extraits ou de synthèse peuvent être exploités sous forme d'hydrogels, très utiles en ingénierie tissulaire et en cosmétique. Ils peuvent également être utilisés dans la cicatrisation au niveau du remodelage et la formation de tissus. Constituant important de l'humeur vitreuse, ils sont employés dans différentes procédures chirurgicales ophtalmologiques.<sup>7</sup>

## 2.2. SULFATES D'HEPARANE ET HEPARINE

Les sulfates d'héparane (HS) et les héparines (Hep) ont une structure commune. Ils sont composés d'une D-glucosamine N-acétylée ou N-sulfatée liée soit à un acide D-glucuronique, soit à un acide L-iduronique (L-IdoA). On les différencie par leur taux de sulfatation. En effet, l'héparine a un taux bien plus important puisqu'elle comprend en moyenne plus de 2 sulfates par unité disaccharidique, et, de manière générale, ces groupements sont distribués équitablement tout au long de la chaîne. Au contraire, sur les chaînes d'HS, on peut distinguer des régions hautement sulfatées, et d'autres moins voire non sulfatées.<sup>6</sup>

L'héparine est le plus ancien anticoagulant. Ce GAG a été découvert par hasard en 1916 par Mclean lorsque celui-ci cherchait initialement à isoler un agent possédant les propriétés contraires, c'est-à-dire une substance thromboplastique.<sup>8</sup> On la retrouve exclusivement dans certaines cellules sanguines dites basophiles ou des cellules des tissus conjonctifs du foie, de la peau, des reins où ils peuvent stocker des protéases.

Elle est utilisée aussi bien pour traiter des réactions anti-inflammatoires et antitumorales que dans la prévention de maladies infectieuses. Elle peut également être un constituant de nanoparticules afin de permettre la délivrance de médicaments.

Les sulfates d'héparane peuvent être considérés comme les GAGs les plus complexes. C'est pourquoi on ne retrouve actuellement pas beaucoup d'applications médicales. Pourtant, ils sont produits par la plupart des cellules. On les repère aussi bien à la surface des cellules que dans la MEC des vaisseaux sanguins, du derme ou du cerveau. On retrouve des protéoglycanes de HS (HSPGs) aussi bien dans les membranes basales pour participer à la migration cellulaire que dans les vésicules de sécrétion pour réguler notamment la coagulation et la cicatrisation. Les HSPGs membranaires jouent le rôle de

---

<sup>7</sup> Yasin, A.; Ren, Y.; Li, J.; Sheng, Y.; Cao, C.; Zhang, K. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*.

<sup>8</sup> Howell, W. H.; Holt, E. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **1918**, *47*, 328–341.

récepteurs ou d'inhibiteurs de protéases pour réguler à la fois leur distribution et leur activité ou encore coopèrent avec des protéines pour faciliter la motilité cellulaire, l'interaction entre les cellules ou encore l'adhésion cellulaire ce qui les rend directement impliqués dans les infections bactériales et virales. En effet, certains virus (HSV, HIV, SARS-CoV-2...) exploitent la présence des charges négatives apportées par les HS pour s'attacher aux cellules hôtes et ainsi provoquer leur réplication.<sup>9,10</sup>

### 2.3. SULFATES DE KERATANE

Identifiés en 1939 par l'équipe de Suzuki dans des extraits de cornée, les sulfates de kératane (KS) restent les moins connus des GAGs.<sup>11</sup> Ils sont les seuls à ne pas avoir d'acide uronique. En effet, l'unité disaccharidique est composée d'un D-galactose lié en 1→4 à une N-acétyl-D-glucosamine sulfatée en position 6. On les retrouve principalement dans la cornée mais également en grande quantité dans les systèmes nerveux central et périphérique tout comme dans d'autres tissus conjonctifs tels que le cartilage et l'os. Ils jouent un rôle dans l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules, la cicatrisation... Ils sont également responsables de la transparence de la cornée puisque leur présence abondante permet le maintien d'un niveau essentiel d'hydratation.<sup>12</sup> Au niveau de ce même tissu, ils sont également impliqués dans la motilité cellulaire des cellules endothéliales et dans le contrôle du gradient de chimiokines, leur dégradation et donc l'inflammation.

Des phénomènes pathologiques sont provoqués par des dérèglements structuraux ou au niveau de la biosynthèse de ces GAGs. En effet, la mutation d'un gène impliqué dans la biosynthèse des KS peut troubler la cornée en raison d'une mauvaise réfraction de la lumière à travers le cristallin tandis qu'une altération de l'élongation de la chaîne de KS entraîne un kératocône, une maladie dégénérative de l'œil. Suite à une mutation entraînant un changement dans le motif de sulfatation des KS, ils sont également impliqués dans la sclérose latérale amyotrophique, aussi appelée la maladie de Lou Gehrig ou de Charcot, une maladie dégénérative touchant les cellules nerveuses et la moelle épinière tout comme dans les problèmes d'apprentissage cognitif et de mémoire chez les patients atteints d'Alzheimer.<sup>13</sup>

---

<sup>9</sup> Koganti, R.; Memon, A.; Shukla, D. Koganti, R.; Memon, A.; Shukla, D. *Semin. Thromb. Hemost.* **2021**, *47*, 283–294.

<sup>10</sup> Sarrazin, S.; Lamanna, W. C.; Esko, J. D. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2011**, *3*, a004952.

<sup>11</sup> Suzuki, M. *J. Biochem.*, **1939**, *30*, 185–191

<sup>12</sup> a) Funderburgh, J. L. *Glycobiology* **2000**, *10*, 951–958. ; b) Pomin, V. H. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 282–289.

<sup>13</sup> Caterson, B.; Melrose, J. *Glycobiology* **2018**, *28*, 182–206.

## 2.4. SULFATES DE DERMATANE

GAGs prédominants dans la peau, les sulfates de dermatane (DS), aussi connus sous le nom de sulfates de chondroïtine B, ont été isolés pour la première fois en 1941 par Karl Meyer.<sup>14</sup> Ils sont composés d'un acide L-iduronique lié en position 1→3 à une N-acétyl-D-galactosamine (GalNAc). Il existe une grande variété de protéoglycanes de sulfates de dermatane DSPGs (différentes protéines) et de DS de par la variabilité de la longueur de la chaîne, de l'épimérisation en position C-5 de l'IdoA (ce qui donne un acide glucuronique) et de la position des groupements sulfates (2-IdoA, 4-GalNAc et/ou 6-GalNAc). Les DS sont des éléments de la matrice extracellulaire que l'on retrouve dans un grand nombre de tissus chez les animaux et ils jouent un rôle notamment dans la coagulation, la prolifération cellulaire, la différenciation et la cicatrisation. De plus, au niveau de la cornée et du sclère (couche externe du globe oculaire), il permet le maintien à la fois de la clarté optique et de la forme de l'œil.<sup>4</sup> Les syndromes d'Ehlers-Danlos, un groupe de maladies héréditaires rares du tissu conjonctif, sont provoqués, entre autres, par un défaut de DS en raison d'une mutation au niveau d'un gène impliqué dans la biosynthèse de ces GAGs.<sup>15</sup>

Des protéoglycanes mixtes de sulfates de chondroïtine et de sulfates de dermatane rendent encore plus large la palette de rôles possibles de ceux-ci. L'athérosclérose, maladie dans laquelle des dépôts de graisse se forment dans les artères, peut être causée par ces PGs puisqu'ils ont la capacité de se lier aux lipoprotéines et donc entraîner une rétention ainsi qu'une accumulation de lipides lorsque le taux de DSPGs est trop élevé. Ils peuvent être impliqués dans la formation de métastases cancéreuses, dans le développement d'infections, de maladies des tissus conjonctifs ou cardiovasculaires, dans l'inhibition de la régénération neuronale...<sup>16</sup> Des études ont permis de démontrer l'impact des DSPGs et des DS dans la régulation de la formation et la résistance des fibrilles de collagène, d'où leur rôle dans des fibroses hépatiques causées notamment par l'accumulation de collagène.<sup>17</sup>

## 2.5. SULFATES DE CHONDROÏTINE

En 1947, Bengt Sylvén est le premier à publier sur les sulfates de chondroïtine en les mettant en relation directe avec le cartilage (qui se dit *chondros* en grec).<sup>18</sup> Depuis, de nombreuses études ont été menées et ils sont décrits comme étant les GAGs les plus abondants dans le corps humain. On les

---

<sup>14</sup> Meyer, K.; Chaffee, E. J. *Biol. Chem.* **1941**, *138*, 491–499.

<sup>15</sup> Mizumoto, S.; Yamada, S. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7485.

<sup>16</sup> a) Zhang, B.; Chi, L. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, b) Volpi, N. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 233–239.

<sup>17</sup> Lensen, J. F. M.; Vlag, J. van der; Versteeg, E. M. M.; Wetzels, J. F. M.; Heuvel, L. P. W. J. van den; Berden, J. H. M.; Kuppevelt, T. H. van; Rops, A. L. W. M. M. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0134946.

<sup>18</sup> Sylvén, B. *Acta Orthopaedica* **1949**, *18*, 21–27.

retrouve également dans les tissus d'autres animaux terrestres (bovins, porcins, poulets) ou marins (comme les requins, les poissons osseux ou les raies). Ces diverses origines permettent d'obtenir, après extraction, un large panel de CS différents en termes de structure, de degré de sulfatation et de masse moléculaire (50 à 100 kDa).

#### A- STRUCTURE

L'unité disaccharidique de base des CS, appelée chondrosine, est composée d'un acide-D-glucuronique (D-GlcA) lié à une *N*-acétyl-D-galactosamine (D-GalNAc) *via* une liaison  $\beta 1 \rightarrow 3$ . Les motifs répétitifs, liés entre eux en  $\beta 1 \rightarrow 4$ , sont sulfatés de manière diverse, allant du mono au tétra-sulfaté. Ces substitutions sont observées en position 4 et/ou 6 de la GalNAc ou en position 2 et, plus rarement, 3 du GlcA (*Figure 4*). Cependant, chez les humains, ce sont les CS-A (4S), CS-C (6S) et CS-E (4,6S) que l'on retrouve majoritairement. Comme pour tous les autres GAGs, leur caractère polyanionique leur permet d'interagir avec des protéines grâce à des interactions électrostatiques.

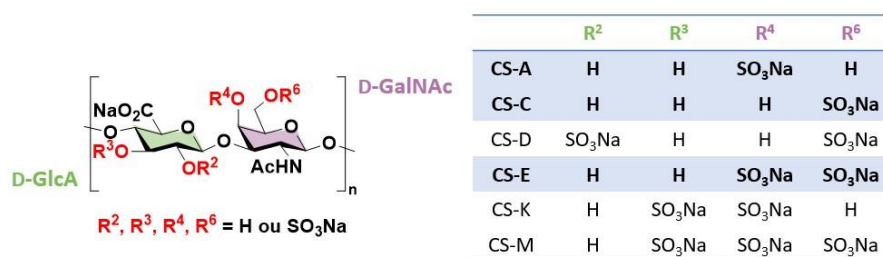


**Figure 4 :** Différents motifs de sulfatation des CS.

#### B- LOCALISATION

Les CS sont localisés dans différents organes : les os, la peau, le cerveau, les reins, le foie et le sang. On les retrouve principalement, comme la plupart des autres GAGs, dans la matrice extracellulaire (MEC). Particulièrement abondants dans le cartilage, ils sont également présents dans les vaisseaux sanguins, les ligaments et les tendons tout comme au niveau des terminaisons axonales.

Voyant cette importante répartition des CS, on comprend aisément qu'ils ont de multiples activités biologiques.

#### C- LES PROTEOGLYCANES DE SULFATES DE CHONDROÏTINE (CSPGs)

Les CSPGs interviennent majoritairement dans deux familles de PGs. D'un côté, il y a les hyalectanes, des protéoglycanes qui forment des agrégats avec l'acide hyaluronique. Ils sont composés d'une grande protéine centrale (100 à 400 kDa) sur laquelle sont accrochés des chaînes de CS mais également de KS. Dans cette famille, on retrouve par exemple l'aggrécane, le versicane (le plus abondant), le neurocane et le brevicane (*Figure 5*, Hyalectins). De l'autre côté, il y a les petits protéoglycanes riches

en leucine (small leucine-rich proteoglycans, SLRPs) que l'on trouve dans la MEC. Ils sont, quant à eux, composés d'une plus petite protéine centrale (environ 40 kDa) contenant des motifs répétitifs riches en leucine. Les PGs appartenant à cette famille ne possèdent qu'une ou deux chaînes de CS/DS. Il s'agit de la décorine (une chaîne) et du biglycane (deux chaînes) (*Figure 5*, SLRPs). De plus, on retrouve le CSPG transmembranaire NG2 ainsi que le phosphacan que l'on retrouve dans le cerveau mais qui n'appartiennent pas à ces deux familles.

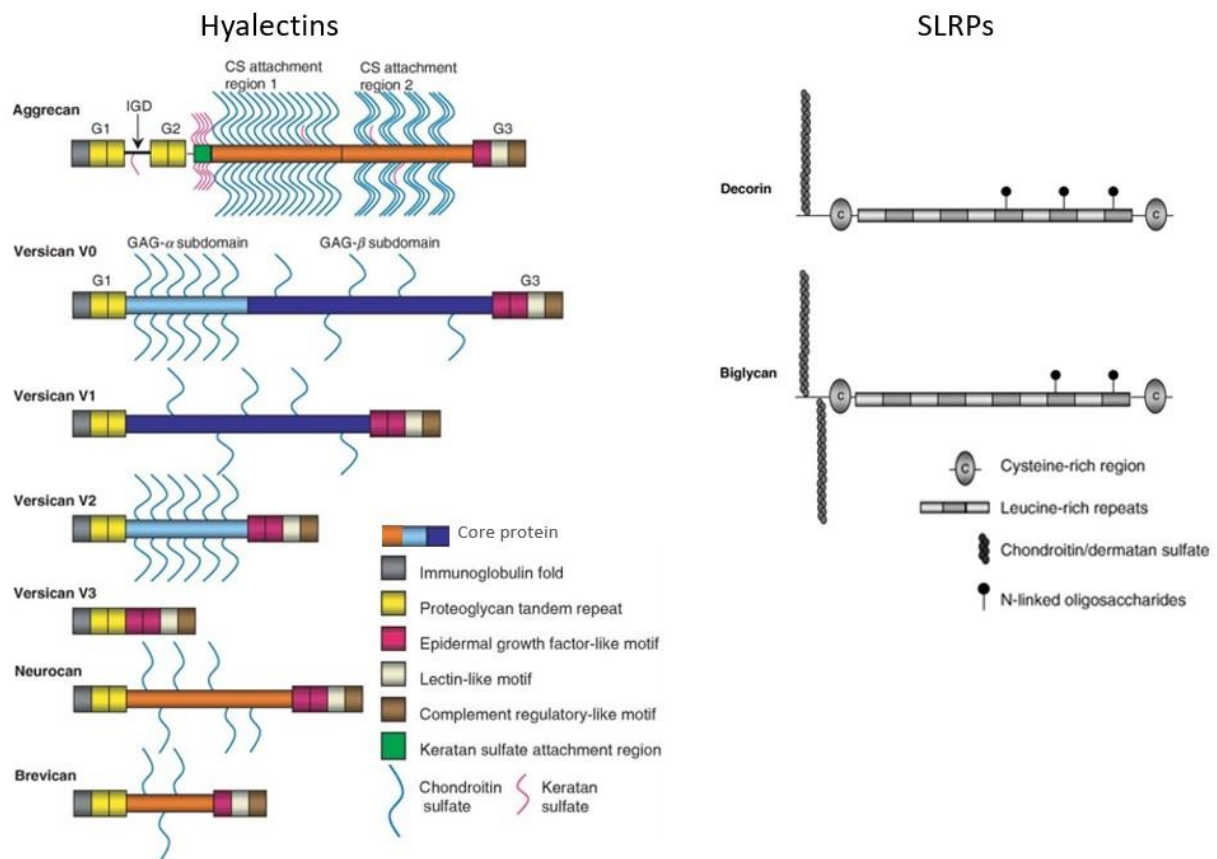


**Figure 5 :** Exemples des principaux CSPGs.<sup>19</sup>

Nous allons maintenant voir différents rôles des CS (et CSPGs) dans des processus biologiques physiologiques et pathologiques. Nous regarderons ensuite quelles sont leurs applications actuelles.

<sup>19</sup> Handley, C. J.; Samiric, T.; Ilic, M. Z. *Adv. Pharmacol.* **2006**, *53*, 219–232.



---

# SULFATES DE CHONDROÏTINE : PROPRIETES BIOLOGIQUES ET APPLICATIONS

## 1. PROCESSUS BIOLOGIQUES

Les processus biologiques impliquant les CS peuvent être divisés en deux catégories : ceux qui concernent le fonctionnement normal, qualifiés de physiologiques, et ceux qui sont reliés à une maladie, un dysfonctionnement, qualifiés de pathologiques.

### 1.1 PROCESSUS PHYSIOLOGIQUES

#### *A- AU SEIN DU SQUELETTE*

Comme indiqué auparavant, on retrouve les CS (et les CSPGs) dans les os, le cartilage, les tendons et les ligaments. Plusieurs études ont montré qu'ils ont la capacité de réduire la raideur, le gonflement et l'inflammation des articulations notamment grâce à leur interaction avec des médiateurs moléculaires qui jouent un rôle dans les voies de transduction du signal inflammatoire. L'étude menée par Xu *et al* montre également que le biglycane est impliqué dans le développement et la régénération des os mais également dans l'organisation des fibres de collagène.<sup>20</sup>

Le caractère anionique des CS leur permet de chélater des métaux de transitions, et par conséquent d'inhiber des réactions qui induisent le stress oxydatif. On leur associe donc des propriétés antioxydantes. En effet, en inhibant la peroxydation lipidique, les CS réduisent le taux d'apoptose du réseau mitochondrial des chondrocytes (cellules du cartilage) permettant ainsi de limiter la dégradation de la matrice cartilagineuse.<sup>21</sup>

#### *B- AU NIVEAU DE LA PEAU*

La peau et les os possèdent des molécules de signalisation et des composants de la MEC identiques et sont tous deux en renouvellement continu. Par conséquent, les rôles des CS sont assez similaires dans les deux tissus. Dans le derme, ils sont capables de réduire l'action des espèces réactives de

---

<sup>20</sup> Xu, T.; Bianco, P.; Fisher, L. W.; Longenecker, G.; Smith, E.; Goldstein, S.; Bonadio, J.; Boskey, A.; Heegaard, A. M.; Sommer, B.; Satomura, K.; Dominguez, P.; Zhao, C.; Kulkarni, A. B.; Robey, P. G.; Young, M. F. *Nat Genet* **1998**, *20*, 78–82.

<sup>21</sup> Mishra, S.; Ganguli, M. *Drug Discovery Today* **2021**, *26*, 1185–1199.

l'oxygène sur les protéines au niveau des fibroblastes, les cellules architectes de ce tissu. Ils sont également impliqués dans l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération, et jouent un rôle important dans la cicatrisation des plaies.<sup>25</sup>

#### *C- DANS LE SANG*

L'homéostasie vasculaire est maintenue essentiellement grâce à différents protéoglycanes mixtes qui contiennent des CS et des DS (versicane, biglycane et décorine).<sup>22</sup>

En augmentant l'activité des inhibiteurs connus sous les noms d'anti-facteurs IIa et Xa, les CS, comme les héparines, sont également connus pour leur rôle d'anticoagulant. De plus, ils peuvent être qualifiés d'antithrombotiques puisque les CS-E participent à l'activation de la plasmine, une enzyme qui permet de prévenir la formation excessive de fibrine, une protéine insoluble formée lorsqu'un vaisseau sanguin est endommagé.<sup>23</sup>

#### *D- DANS LE CERVEAU*

Les réseaux périneuronaux en forme de treillis (PNNs), qui enveloppent les neurones, correspondent à des MECs réticulaires enrichis en CSPGs. Les PNNs permettent la stabilisation synaptique et le soutien de l'homéostasie des ions autour des neurones. Les CSPGs sont impliqués dans presque tous les procédés du système nerveux central (SNC). Présents dès le développement neuronal, ils interviennent notamment dans la cytokinèse embryonnaire et la prolifération des cellules du système nerveux. Au sein de ces réseaux, les chaînes de CS sont très importantes puisqu'elles sont responsables de la neuroprotection. Le caractère polyanionique des aggrécans (CSPGs) leur permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène et donc de diminuer le potentiel oxydatif de ces dernières.<sup>24</sup> Quant au brevican, il régule la plasticité des interneurones qui est notamment responsable de l'apprentissage et de la mémoire.<sup>25</sup> De plus, ces protéoglycanes jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation, la migration neuronale, la croissance des axones, la formation, la maturation et la stabilité des synapses.

En plus de ces rôles divers et variés dans différentes parties du corps, les CS permettent de lutter contre l'obésité et le diabète et font également partie de la barrière protectrice de la vessie. On leur attribue également des rôles antiviraux et antitumoraux.<sup>26</sup>

---

<sup>22</sup> Zhang, B.; Chi, L. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*.

<sup>23</sup> Shen, Q.; Guo, Y.; Wang, K.; Zhang, C.; Ma, Y. *Molecules* **2023**, *28*, 7093.

<sup>24</sup> Kitagawa, H. *Front Biosci* **2016**, *21*, 1330–1340.

<sup>25</sup> Lin, J.; Duan, M.; Lin, N.; Zhao, W. *Reviews in the Neurosciences* **2021**, *32*, 737–750.

Voyons maintenant l'implication des CS et CSPGs dans diverses pathologies.

## 1.2. PROCESSUS PATHOLOGIQUES

Certaines maladies peuvent être liées à un dérèglement lors de la biosynthèse des CS (mutations de gènes, épimérisation), ou suite à de la dégradation (taille des chaînes). Les motifs de sulfatation peuvent également être impactés. Prenons l'exemple de l'athérosclérose caractérisée par l'accumulation de plaques de lipides qui se fixent sur la paroi interne des artères. Il a été montré que, dans les artères, les chaînes de CSPGs se lient aux lipoprotéines à faibles densité (LDL). Cette capacité de liaison est influencée par la longueur, le motif de sulfatation ainsi que la densité de charge de ces chaînes. Il apparaît que le CS-C (6-sulfaté) se lie préférentiellement aux lipides or celui-ci est retrouvé en grande quantité dans les lésions athérosclérotiques ce qui entraîne une accumulation de LDL et finalement la formation de plaques.<sup>26</sup> Des maladies inflammatoires de la peau comme le lupus érythémateux cutané ou la dermatomyosite sont aussi causées par un déséquilibre du ratio entre les CS-A et -C au profit des CS-C.<sup>27</sup>

### A- IMPLICATION DANS DES CANCERS

De manière générale, un grand nombre de protéoglycanes se retrouvent surexprimés dans différentes tumeurs. Par exemple, lors d'un hépatocarcinome, la quantité de dépôt de galactosaminoglycanes (CS et DS) est plus importante.<sup>28</sup> Impliqués de deux manières possibles, les PGs peuvent agir soit de manière directe sur les fonctions cellulaires, soit en modulant l'activité d'autres molécules avec lesquelles ils interagissent (facteurs de croissance ou cytokines par exemple). En s'accumulant dans la MEC dès le développement de la tumeur, certains CSPGs anormalement surexprimés interviennent dans l'organisation de cette matrice ainsi que dans le comportement des cellules tumorales ce qui entraîne leur prolifération ainsi que leur migration.

Les hyalectanes accélèrent la progression de la tumeur en augmentant la mobilité et la migration cellulaire. Dans presque tous les cancers humains, le versicane (VCAN) est surexprimé par les fibroblastes. Il est notamment impliqué dans la motilité des cellules malades et donc dans l'invasion

---

<sup>26</sup> a) Cilpa, G.; Koivuniemi, A.; Hyvönen, M. T.; Riekkola, M.-L. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 4818–4825. b) Karangelis, D. E.; Kanakis, I.; Asimakopoulou, A. P.; Karousou, E.; Passi, A.; Theocharis, A. D.; Triposkiadi, F.; Tsilimigias, N. B.; Karamanos, N. K. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17*, 4018–4026.

<sup>27</sup> Kim, J. S.; and Werth, V. P. *J. Histochem. Cytochem.* **2011**, *59*, 780–790.

<sup>28</sup> a) Kovalszky, I.; Pogany, G.; Molnar, G.; Jeney, A.; Lapis, K.; Karacsonyi, S.; Szecseny, A., and Iozzo, R. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *167*, 883–890. b) Lapis, K.; Kavalsky, I.; Jeney, A.; Pogany, G.; Molnar, G.; Repassy, D.; Szecseny, A., and Karacsonyi, S. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1990**, *15*, 155–165.

des cancers de la prostate et du sein.<sup>29,30</sup> L'aggrécane (ACAN), quant à lui, est retrouvé en grande quantité dans les tumeurs touchant le cartilage.

Les petits protéoglycanes riches en leucine (SLRPs) sont connus pour avoir des propriétés antitumorales puisqu'ils se lient à des facteurs de croissance et les bloquent. La décorine, par exemple, est connue pour retarder la croissance de plusieurs lignées cancéreuses et de tumeurs.

Etudier ces maladies a permis de montrer une nouvelle fois l'importance des chaînes de CS dans la migration cellulaire puisque des dérèglements notables en termes de taille, de motif de sulfatation et d'épimérisation peuvent être observés chez les malades.<sup>31,32,33</sup>

#### *B- IMPLICATION DANS L'ADSORPTION DE VIRUS ET DANS DES INFECTIONS*

Dans la plupart des cas, les pathogènes nécessitent la présence de chaînes de GAGs dont les CS pour s'attacher à la surface et infecter les cellules hôtes. Ils les utilisent également pour passer d'une cellule à une autre et pour échapper aux différents mécanismes de défense. Pour ce faire, certains microorganismes peuvent exprimer spécifiquement des protéines qui vont se lier à ces chaînes. C'est le cas, par exemple, pour le virus de la dengue, le virus de l'herpès simplex (HSV), des bactéries ou des champignons. A nouveau, des études ont démontré l'importance du motif de sulfatation présenté à la surface de la cellule hôte dans la reconnaissance.<sup>22</sup>

#### *C- IMPLICATION DANS DES MALADIES NEURODEGENERATIVES ET AUTRES TROUBLES NEURONAUX*

Comme cela a été précédemment abordé, les CSPGs jouent un rôle important dans le SNC. Dès l'apparition de lésions, les CS-C sont largement plus répandus et contribuent à l'inhibition de la régénération axonale ainsi qu'à la restriction de la plasticité.<sup>34</sup>

Leur présence dans les réseaux périneuronaux (PNNs) et les cellules du cerveau les implique directement dans les troubles neuronaux causés par un dysfonctionnement des interneurones à parvalbumine et stimulation rapide (PV-cells). Comme on peut le voir sur la figure ci-dessous, un dérèglement au niveau des CS engendre indirectement les crises d'épilepsie, la schizophrénie et le

---

<sup>29</sup> a) Ricciardelli, C.; Mayne, K.; Sykes, P. J.; Raymond, W. A.; McCaul, K.; Marshall, V. R.; Tilley, W. D.; Skinner, J. M.; Horsfall, D. J. *Clin Cancer Res* **1997**, *3*, 983–992. ; b) Ricciardelli, C.; Mayne, K.; Sykes, P. J.; Raymond, W. A.; McCaul, K.; Marshall, V. R.; Horsfall, D. J. *Clin Cancer Res* **1998**, *4*, 963–971.

<sup>30</sup> Suwawat, S.; Ricciardelli, C.; Tammi, R.; Tammi, M.; Auvinen, P.; Kosma, V.-M.; LeBaron, R. G.; Raymond, W. A.; Tilley, W. D.; Horsfall, D. J. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 2491–2498.

<sup>31</sup> Lidholt, K., Eriksson, I., and Kjellen, L. *Biochem. J.* **1995**, *311*, 233–238.

<sup>32</sup> Wegrowski, Y.; Maquart, F. Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Tumor Progression. In *Advances in Pharmacology*; Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity; Academic Press, **2006**; Vol. 53, pp 297–321.

<sup>33</sup> Asimakopoulou, A. P.; Theocharis, A. D.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. *In Vivo* **2008**, *22*, 385–389.

<sup>34</sup> Galtrey, C. M.; Fawcett, J. W. *Brain Research Reviews* **2007**, *54*, 1–18.

syndrome de Costello. En effet, un déséquilibre du ratio de CS-A/-C (4S/6S) peut provoquer le dysfonctionnement des PV-cells. Dans le cas de l'épilepsie et de la schizophrénie, on observe une moindre maturation de celles-ci causée par une diminution en CS-A et/ou une augmentation en CS-C. Au contraire, dans le cas du syndrome de Costello, une maladie génétique rare présente à la naissance, on observe une hypermaturation des cellules en raison d'une formation prématurée de PNNs provoquant l'arrêt de la période critique de plasticité de manière précoce, et finalement le retard de développement et la déficience intellectuelle.<sup>24,34</sup>

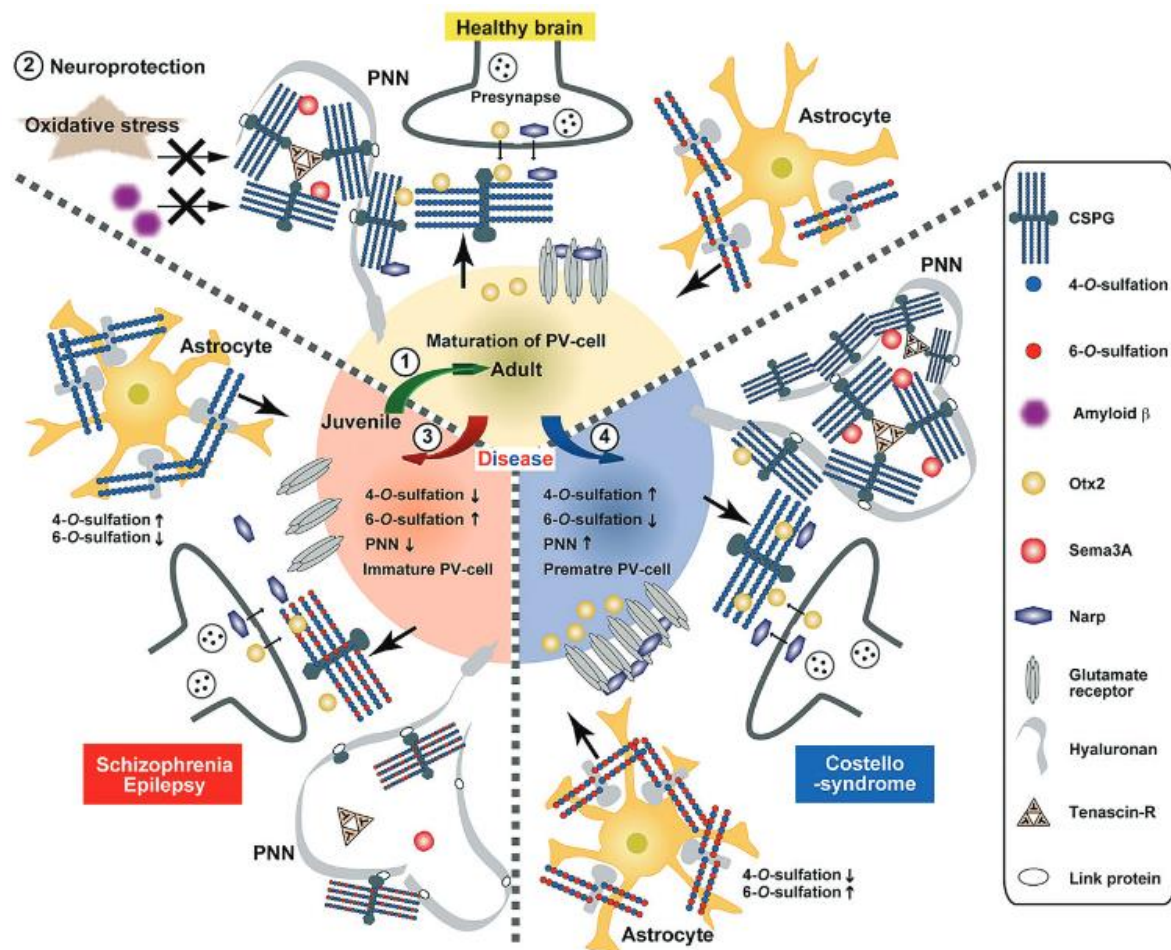


**Figure 6** : Schéma représentant le rôle des CSPGs dans certains troubles neurologiques.<sup>24</sup>

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par une perte de neurones et de gaines de myéline dans le SNC. Pourtant, la figure 6 rappelle le rôle des CSPGs dans la neuroprotection contre le stress oxydatif et la formation de plaques amyloïdes (Aβ). De plus, les neurones entourés de PNNs contenant des agrécans semblent protégés contre l'agrégation de la protéine Tau. Les plaques amyloïdes et ces agrégats sont colocalisés avec les CSPGs ce qui implique directement les CS dans la

maladie d'Alzheimer.<sup>35</sup> Dans cette maladie, une diminution de la quantité d'ACAN, qui est clivé et dégradé, ainsi qu'une perte de BCAN responsable de la perte de synapses sont observées ce qui entraîne une déficience au niveau de la plasticité neurale.

La sclérose en plaques, quant à elle, est considérée comme une maladie démyélinisante. Dans les lésions de celle-ci, on retrouve une quantité très importante de CSPGs (ACAN, BCAN, VCAN) dont certains jouent le rôle d'inhibiteurs de la myélinisation des neurones.<sup>36</sup>

#### *D- IMPLICATION DANS DES MALADIES ARTICULAIRES OU MUSCULAIRES*

L'arthrose (ou ostéoarthrose, OA) est une maladie qui affecte le cartilage articulaire et est caractérisée par une inflammation des chondrocytes, les cellules du cartilage. Pour conserver leurs propriétés fonctionnelles optimales et donc un certain équilibre entre la synthèse et la dégradation, les tissus cartilagineux ont notamment besoin de réseaux formés par l'agrécan, l'acide hyaluronique et le collagène, une protéine structurelle. Cependant, dans le cas de l'arthrose, cet équilibre n'est plus maintenu en raison d'une surexpression des enzymes qui détruisent les PGs des MECs du cartilage. En effet, des produits de dégradation de l'HA, de la protéine centrale de l'ACAN tout comme de SLRPs comme la décorine ou le biglycane sont observés.

L'atrophie chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne est causée par une mutation qui rend la dystrophine dysfonctionnelle, entraînant la contraction et le relâchement des muscles à l'effort ainsi que la détérioration des fibres. A ceci s'ajoute une surexpression de 7 des 22 CSPGs présents dans les muscles squelettiques sains ainsi qu'une augmentation du degré de sulfatation des chaînes de CS.<sup>37,38</sup>

Les CS jouent également un rôle important dans l'ostéoporose et donc dans la détérioration du tissu osseux, tissu dans lequel ils sont présents. Nous verrons cela dans une prochaine partie.

Après avoir identifié le rôle des CS dans diverses maladies, on peut supposer qu'ils ont été utilisés comme médicaments ou bien ciblés dans le but de nouvelles thérapies. Nous allons désormais passer en revue les diverses applications développées aujourd'hui.

---

<sup>35</sup> DeWitt, D.A., Silver, J., Canning, D.R., Perry, G. *Exp. Neurol.* **1993**, 121, 149–152.

<sup>36</sup> Lin, J.; Duan, M.; Lin, N.; Zhao, W. *Reviews in the Neurosciences* **2021**, 32, 737–750.

<sup>37</sup> a) Negroni, E.; Henault, E.; Chevalier, F.; Gilbert-Sirieix, M.; Van Kuppevelt, T. H.; Papy-Garcia, D.; Uzan, G.; Albanese, P. *J Neuropathol Exp Neurol* **2014**, 73, 789–797. b) An, H.; Zheng, H.; Zhang, L.; Ma, L.; Liu, Z. *J Zhejiang Univ Sci B* **2013**, 14, 973–982. c) Ralston, E.; Gutierrez-Cruz, G.; Kenea, A. D.; Brooks, S. R. *BioRxiv*, **2021**.

<sup>38</sup> Maciej-Hulme, M. L.; Melrose, J.; Farrugia, B. L. *Am. J. Physiol-Cell Physiol.* **2023**, 324, C142–C152.

## 2. APPLICATIONS

Les CS (et CSPGs) ont des propriétés anti-inflammatoires, antithrombotiques, anticoagulantes, antioxydantes ainsi qu'une bonne capacité de rétention d'eau. Ils sont aussi bien utilisés en tant que médicaments qu'en tant que biomatériels ou compléments alimentaires.

### 2.1. COMPLEMENTS ALIMENTAIRES

Enregistré comme un médicament en Europe, les CS sont considérés aux Etats-Unis que comme un complément alimentaire que l'on peut donc obtenir sans ordonnance. Certaines études ont démontré que la prise de glucosamine accompagnée de CS ne semblait pas avoir un effet significatif sur l'arthrose du genou mais seulement un rôle dans le soulagement de la douleur. Cependant, en complément d'une bonne alimentation et d'une bonne hygiène de vie, les CS peuvent être consommés pour la santé des os (formation d'un complexe avec le calcium) et ainsi prévenir les risques d'ostéoporose.

Il semblerait également qu'une prise de différents CS en tant que complément alimentaire pourrait avoir un effet anti-obésité.<sup>23</sup>

### 2.2. BIOMATERIELS

Les CS sont biocompatibles, non toxiques, biodégradables et sans effet secondaire. On les retrouve maintenant en tant que composants fonctionnels de divers matériels comme les hydrogels, les scaffolds (ou échafaudages), les nanoparticules et d'autres systèmes d'administration.<sup>23</sup>

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles qui ont une grande capacité d'absorption de l'eau. Connu pour être hygroscopique, l'acide hyaluronique est le premier GAG exploité dans les biomatériaux de ce type dans l'ingénierie tissulaire alors des doubles-réseaux CS-HA, plus résistants et stables ont été élaborés pour la bio-impression. On peut également trouver des hydrogels à base de CS et de chitosane (polyoside composé de D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine) pour panser des plaies grâce à leurs propriétés autocicatrisantes, antibactériennes et hémostatiques. D'autres hydrogels sont plutôt utilisés en ingénierie tissulaire pour la régénération cardiaque ou la formation d'os *in situ*.<sup>23</sup>

Les CS sont exploités pour former des scaffolds utiles en ingénierie tissulaire pour le nucleus pulposus (substance gélatineuse au cœur du disque intervertébral), le stroma cornéen, le tendon, l'os ou encore le cartilage. Par exemple, les échafaudages de nanofibres produits par électrofilage peuvent imiter la

MEC ce qui rend possible la régénération des tissus (cicatrisation, réparation du myocarde), l'adhésion, la croissance et la prolifération cellulaire.<sup>23</sup>

Afin de cibler plus précisément et efficacement une maladie et donc d'éviter toute toxicité envers des tissus et organes sains, les biotechnologies, et plus précisément, les nanotechnologies sont utilisées. Dans ce domaine, différentes méthodes permettant de préparer ce type de biomatériau ont été développées avec les CS mais tous ont adopté la même méthode de libération du médicament : rapide au début puis lente et durable. Cependant, la charge médicamenteuse va de 2 à 16,1 % et l'efficacité d'encapsulation est comprise entre 39,50 à 93,97 %.<sup>39</sup>

Des systèmes d'administration de médicaments ont été développés pour atteindre des cibles précises. La vectorisation permet alors un relargage contrôlé, une meilleure pharmacodynamique ainsi qu'une baisse d'effets indésirables (toxicité ou effets secondaires) dans le cas des médicaments. Les CS sont utilisés pour préparer le système d'administration puisqu'ils sont capables d'interagir avec des macromolécules cationiques. Par exemple, en considérant leur activité anticancéreuse, ils peuvent créer une synergie avec des transporteurs (comme des nanoparticules) qui visent les tumeurs.<sup>40</sup> Une thérapie immunitaire a également été envisagée par Okubo *et al* grâce, cette fois-ci, au transport d'antigènes par les CS.<sup>41</sup> En plein essor, une autre équipe a prouvé qu'un hydrogel injectable à base de CS et de collagènes de type II permettrait la délivrance de chondrocytes, des cellules du cartilage.<sup>42</sup>

Grâce à leurs propriétés intéressantes ainsi que ces découvertes, on peut voir le fort potentiel des CS dans le développement de nouveaux modes d'administration, aussi bien pour des médicaments, que des gènes et des cellules.

## 2.3. MÉDICAMENTS ET COSMÉTIQUES

Les CS peuvent être administrés de différentes manières : ingérés sous forme liquide (goutte pour les yeux) ou solide, injectés ou bien appliqués sous forme de crème (anti-âge). Ils peuvent également traiter l'athérosclérose, le psoriasis ou encore prévenir des événements coronariens tout comme améliorer les symptômes associés à l'inflammation de la vessie ou à la cystite interstitielle.<sup>23,33</sup>

---

<sup>39</sup> Amhare, A. F.; Lei, J.; Deng, H.; Lv, Y.; Han, J.; Zhang, L. *Journal of Drug Targeting* **2021**, *29*, 259-268.

<sup>40</sup> Liu, P.; Chen, N.; Yan, L.; Gao, F.; Ji, D.; Zhang, S.; Zhang, L.; Li, Y.; Xiao, Y. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 17-26.

<sup>41</sup> Okubo, M.; Miyazaki, M.; Yuba, E.; Harada, A. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 1518-1529.

<sup>42</sup> Gao, Y.; Li, B.; Kong, W.; Yuan, L.; Guo, L.; Li, C.; Fan, H.; Fan, Y.; Zhang, X. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 2014-2020.



Les CS sont utilisés principalement pour traiter l'arthrose dite symptomatique principalement du genou et des doigts. En effet, ils permettent de réduire la production de médiateurs ou de protéases qui engendrent l'inflammation tout en améliorant la balance synthèse/dégradation de la MEC du cartilage. En d'autres termes, en complément avec la glucosamine, ils font office de traitement adjuvant à action lente pour soulager les douleurs, le gonflement et l'épanchement articulaire tout en augmentant la mobilité et la fonction articulaire et en rétrécissant l'espace interarticulaire chez des patients atteints d'arthrose du genou ou des doigts.<sup>21,23,43</sup>



**Figure 7 :** Applications des CS.

Dans le cadre d'un partenariat avec le CEPR de Tours, nous nous intéressons plus particulièrement à l'ostéoporose. Nous allons donc, dans une troisième partie, nous intéresser à cette maladie ainsi que le rôle des CS dans celle-ci afin de définir l'objectif de cette thèse.

<sup>43</sup> Iovu, M.; Dumais, G.; du Souich, P. *Osteoarthritis and Cartilage* **2008**, 16, S14–S18.

---

# L'OSTEOPOROSE ET LA CATHEPSINE K

## 1. GENERALITES SUR L'OSTEOPOROSE

### 1.1. DEFINITIONS ET SYMPTOMES

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : « L'ostéoporose est une maladie généralisée du squelette, caractérisée par une résistance osseuse diminuée prédisposant à un risque élevé de fracture. La résistance osseuse est la résultante de la densité osseuse et de la qualité osseuse (altération de la microarchitecture osseuse notamment). ».<sup>44</sup> Cette maladie ne se voit pas à l'œil nu, elle est qualifiée de silencieuse. Une perte de taille de plus de 4 cm et de nombreuses fractures ostéoporotiques ainsi qu'une faible densitométrie de l'os peuvent être observées. En effet, plus l'os est poreux, moins il est solide, plus il est susceptible de se casser. Ces fractures font suite à un petit traumatisme comme une simple chute de sa hauteur. Les plus fréquentes se localisent au niveau du poignet, des vertèbres et des hanches. Ces deux dernières sont très souvent associées à des douleurs, de l'invalidité et peuvent même entraîner le décès du malade. Cette pathologie touche des centaines de millions de personnes à travers le monde et il serait estimé qu'une femme sur trois âgée de plus de 50 ans subira des fractures de fragilité, surtout après la ménopause, mais on ne compterait qu'un homme sur cinq. Il a été estimé, qu'en 2019, 25,5 millions de femmes et 6,5 millions d'hommes étaient atteints d'ostéoporose au sein de l'Union Européenne, de la Suisse et du Royaume-Uni pour un total de 4,3 millions de nouvelles fractures, 248 487 décès et 57 milliards d'euros dépensés pour les soins.<sup>45</sup> Il a été recensé que seulement une personne sur trois regagne son niveau d'avant une fracture ostéoporotique du col du fémur et qu'une personne sur trois est placée en maison de retraite. Cela explique pourquoi on peut voir apparaître chez ces malades la peur de chuter et la dépression (*Figure 9 pour illustrer*).

---

<sup>44</sup> [https://www.lecofer.org/item-cours-1-7-0.php#ch\\_1](https://www.lecofer.org/item-cours-1-7-0.php#ch_1)

<sup>45</sup> Willers, C.; Norton, N.; Harvey, N. C.; Jacobson, T.; Johansson, H.; Lorentzon, M.; McCloskey, E. V.; Borgström, F.; Kanis, J. A. *Arch. Osteoporos.* **2022**, *17*, 23.

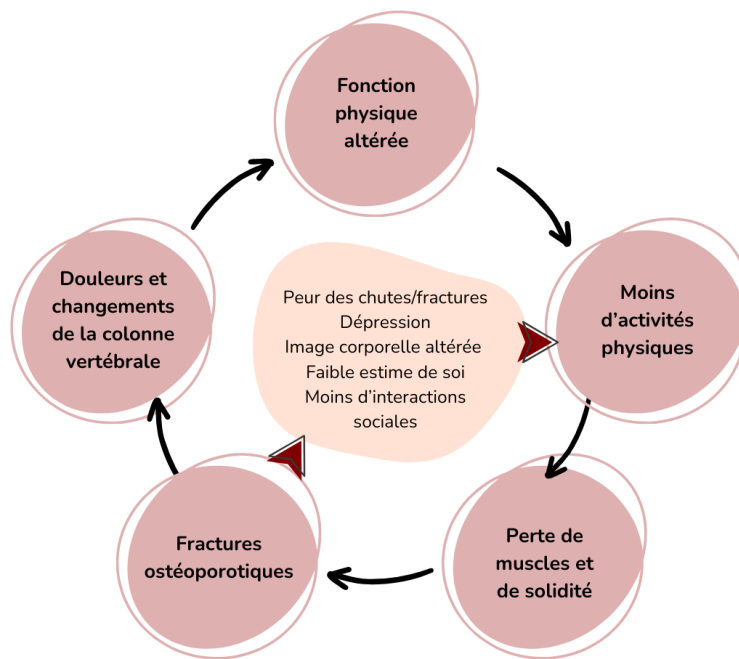


**Figure 8 :** Cycle de l'ostéoporose.

Pour comprendre le processus pathologique, nous allons nous intéresser maintenant aux phénomènes biologiques entraînant cette perte de masse osseuse.

## 1.2. PHENOMENES BIOLOGIQUES

### A- COMPOSITION DU TISSU OSSEUX

Le tissu osseux est composé d'une matrice extracellulaire minéralisée, de cellules osseuses et d'un très riche réseau vasculaire. La matrice osseuse est composée de 60 % d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) et de 10 % d'eau et d'électrolytes. Les 30 % restants correspondent à 90 % de collagènes accompagnés de quelques protéoglycanes, de protéines non collagéniques et de facteurs de croissance. Le collagène est une protéine structurale très abondante de la MEC de différents tissus comme les tendons et ligaments, la peau, la cornée et l'os qui offre une stabilité mécanique, de la force, de la robustesse tout comme de l'élasticité. On retrouve différents types de collagène mais les collagènes de type I, II et III représentent la majorité du collagène. : celui de type I joue un rôle dans l'augmentation de la densité minérale osseuse ; celui de type II est le principal constituant du cartilage et celui de type III est notamment observé dans les vaisseaux sanguins.<sup>46</sup>

<sup>46</sup> a) Van Der Rest, M.; Garrone, R. *The FASEB Journal* **1991**, 5, 2814–2823. ; b) Guillerminet, F.; Beaupied, H.; Fabien-Soulé, V.; Tomé, D.; Benhamou, C.-L.; Roux, C.; Blais, A. *Bone* **2010**, 46, 827–834. ; c) Takeda, S.; Park, J.-H.; Kawashima, E.; Ezawa, I.; Omi, N. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **2013**, 10, 35.

Il existe plusieurs types de cellules osseuses dont les ostéocytes, les ostéoblastes et les ostéoclastes. Les ostéoclastes sont des cellules plurinucléées chargées de libérer des enzymes et de l'acidité dans le but de résorber l'os déjà existant. Au contraire, les ostéoblastes mononucléés forment la nouvelle matrice. Après maturation, ils deviennent des ostéocytes et se retrouvent alors internalisés dans la matrice minéralisée, jouant un rôle très important dans l'entretien de celle-ci. Ces ostéocytes représentent 95 % de la totalité des cellules et sont en contact avec les cellules présentes à la surface en permanence.<sup>47</sup>

### B- REMODELAGE OSSEUX

L'os est un tissu conjonctif spécialisé qui n'est pas statique. En effet, on parle de perpétuel renouvellement ou de remodelage osseux (RO). Des phénomènes de résorption et de formation d'os ont continuellement lieu ce qui permet également de contrôler la balance phosphocalcique. Pendant l'enfance, la formation est supérieure à la résorption ce qui permet le dépôt de calcium et de phosphore. Après un pic à l'adolescence, la masse osseuse atteint son maximum vers 20-25 ans. Ensuite, on observe une stabilisation de cette masse jusqu'à ce que la résorption soit plus importante dès 40-50 ans environ. A partir de ce moment-là, la balance phosphocalcique est négative, entraînant une perte de masse osseuse.<sup>47,48</sup>

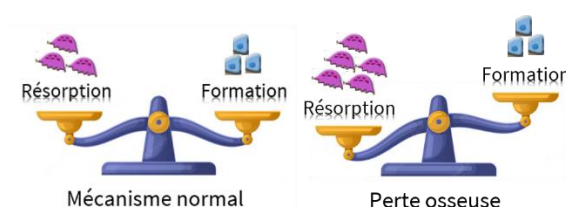


**Figure 9 :** Balance représentant le remodelage osseux ainsi que la perte osseuse.

Ce processus de remodelage osseux se fait en 4 phases de manière continue grâce à une véritable relation entre les différentes cellules (*Figure 10*). Lors d'un processus normal, les ostéocytes meurent par apoptose suite à une lésion ce qui entraîne la production d'une cytokine indispensable pour la différenciation des ostéoclastes et donc l'initiation du processus. Les ostéoclastes actifs adhèrent à la matrice osseuse et réalisent tout d'abord une déminéralisation : des ions phosphates et calcium sont relargués après une excrétion importante de protons. Ensuite, lors de la phase de résorption, ils libèrent des enzymes comme des protéases à cystéine lysosomales telles que la cathepsine K (Cat K)

<sup>47</sup> Desoutter, J.; Mentaverri, R.; Brazier, M.; Kamel, S. *Revue Francophone des Laboratoires* **2012**, 2012, 33–42.

<sup>48</sup> Dossier Ostéoporose, *INSERM*, **2023**.

ou des métalloprotéases matricielles afin de dégrader le collagène de type I de la MEC (Figure 11). Puis, on observe une phase d'inversion pendant laquelle les ostéoblastes sont générés et différenciés.<sup>49</sup> Ceux-ci prennent place dans la cavité créée et forment le nouvel os avant de connaître trois différents destins possibles : ils peuvent être immobilisés dans la matrice et deviennent alors des ostéocytes, être transformés en cellules bordantes ou encore mourir par apoptose. Tout ce mécanisme est long : la formation de l'os nouveau représente à lui seul plusieurs mois. Il a été estimé qu'environ 10 % de squelette est renouvelé chaque année.<sup>47,48</sup>

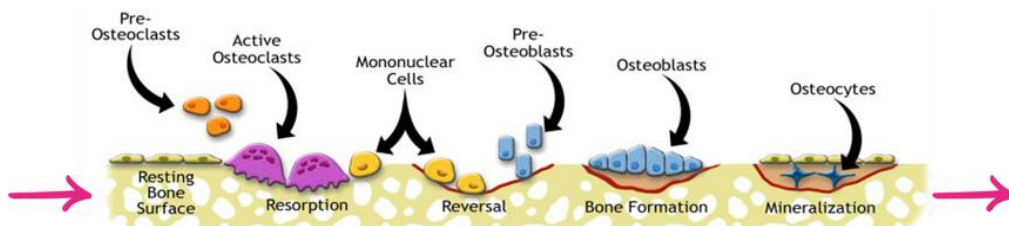


**Figure 10 :** Représentation schématique du renouvellement osseux.<sup>50</sup>

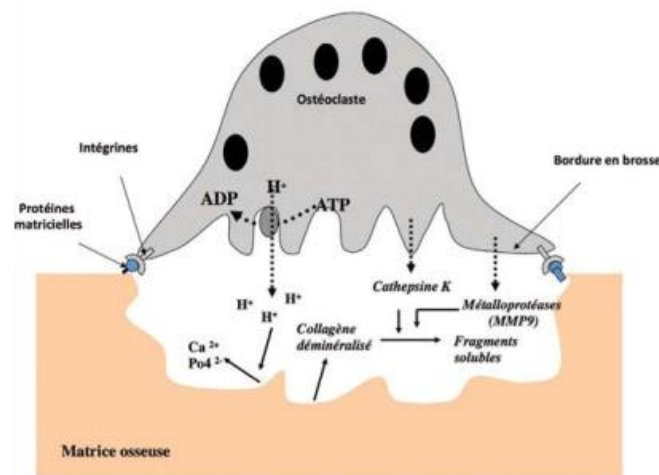


**Figure 11 :** Représentation de l'étape de résorption de l'os.

L'équilibre résorption/formation est maintenu grâce à un contrôle hormonal local. Parmi les hormones impliquées, on retrouve la vitamine D, les œstrogènes, la testostérone et l'hormone parathyroïdienne (PTH). Dans un cadre normal, les œstrogènes inhibent l'apoptose des ostéocytes et, par conséquent, diminuent l'activité des ostéoclastes. De plus, ils inhibent l'apoptose des ostéoblastes ce qui permet le maintien de leur activité. La ménopause correspond à une carence brutale en œstrogènes qui

<sup>49</sup> a) Takeuchi, Y.; Nakayama, K.; Matsumoto, T. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 3938–3944. ; b) Takeuchi, Y.; Suzawa, M.; Kikuchi, T.; Nishida, E.; Fujita, T.; Matsumoto, T. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29309–29316.

<sup>50</sup> Jing Lu, *PhD thesis*, **2011**, 978-3-8440-0230-0

provoque une augmentation de la différenciation des cellules soit un excès de la résorption non compensée par les ostéoblastes et donc une accélération de la perte de masse osseuse. C'est pourquoi l'ostéoporose est plus fréquente chez les femmes que les hommes qui, eux, ne connaissent pas de changement hormonal brutal.<sup>47,48</sup>

## 2. FOCUS SUR LA CATHEPSINE K

Comme évoqué précédemment, les ostéoclastes libèrent des protéases lors de l'étape de résorption de l'os (Figure 11). Parmi ces protéases, nous nous intéressons à la cathepsine K (Cat K).

### 2.1. DEFINITION ET ROLE

Les cathepsines sont des protéases à cystéine que l'on retrouve dans les lysosomes. On en compte 11 dans le génome humain. La cathepsine K est une protéine monomérique exprimée principalement par les ostéoclastes.<sup>51</sup>

Elle est cruciale pour le remodelage osseux de par son activité collagénolytique qui lui permet de cliver la triple hélice des collagènes de type I et II en plusieurs fragments. Elle est également impliquée dans le développement du squelette, le remodelage du tissu pulmonaire, la dégradation protéolytique des fibres élastiques mais également pendant la cicatrisation ou pour protéger le SNC. En effet, si cette protéase est inhibée, la structure de l'os est altérée.<sup>52</sup> Par contre, si elle est surexprimée, le volume de l'os est réduit et cet excès peut provoquer des maladies telles que l'ostéoporose, l'arthrose et certains cancers des os.<sup>53,54,55</sup>

### 2.2. MODE D'ACTION DE CAT K

Le clivage des collagènes se déclenche après déminéralisation de l'os suite à une acidification du milieu ce qui explique que l'environnement acide soit nécessaire à l'activation de cette protéase. Stable à pH neutre, active à pH acide, cette enzyme a tout de même besoin d'être activée pour que l'activité collagénolytique ait lieu. Des études ont d'abord démontré que Cat K formait un complexe avec des

---

<sup>51</sup> Drake, F. H.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Connor, J. R.; Debouck, C.; Richardson, S.; Lee-Rykaczewski, E.; Coleman, L.; Rieman, D.; Barthlow, R.; Hastings, G.; Gowen, M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12511–12516.

<sup>52</sup> Yoshioka, Y.; Yamachika, E.; Nakanishi, M.; Ninomiya, T.; Nakatsuji, K.; Kobayashi, Y.; Fujii, T.; Iida, S. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **2018**, *56*, 732–738.

<sup>53</sup> Vidak, E.; Javoršek, U.; Vizovišek, M.; Turk, B. *Cells* **2019**, *8*, 264.

<sup>54</sup> Aguda, A. H.; Panwar, P.; Du, X.; Nguyen, N. T.; Brayer, G. D.; Brömme, D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111*, 17474–17479.

<sup>55</sup> Lecaille, F.; Brömme, D.; Lalmanach, G. *Biochimie* **2008**, *90*, 208–226.

oligosaccharides de GAGs puis la liste a été réduite aux KS et aux CS puisqu'il est apparu que les DS, HS et Hep réduisaient l'activité collagénolytique attendue.<sup>56</sup> Finalement, il a été prouvé que les CS sont plus importants que les KS. En effet, la protéase forme un complexe avec le CS-A (4-sulfaté), qui représente 90 % des GAGs dans l'os, pour cliver le collagène (*Figure 12 a*).<sup>57,58</sup> Lorsque la cathepsine est surexprimée, l'activité collagénolytique est trop importante ce qui engendre l'ostéoporose tandis que sans complexe, il n'y a pas de clivage.

Des études structurales du complexe CS/Cat K ont permis de montrer que les interactions sont d'ordre électrostatique et qu'elles se font au niveau des exosites. En effet, l'oligosaccharide de CS-A est chargé négativement tandis que l'on retrouve des charges positives au niveau des exosites de Cat K (*Figure 12 b*). Cette interaction au niveau des exosites permet de laisser le site actif disponible pour exercer les autres fonctions biologiques nécessaires.<sup>54,56,59</sup>

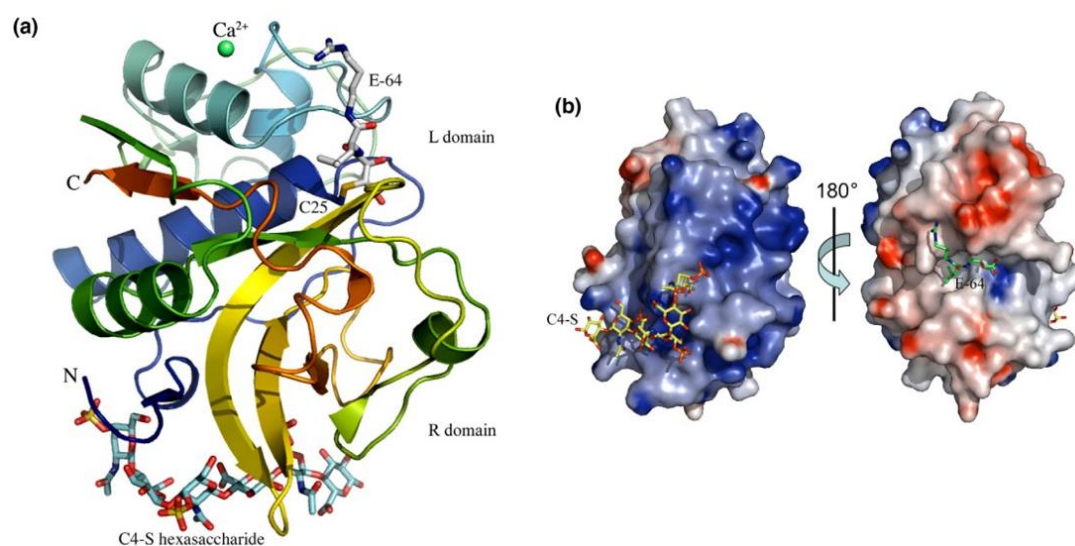


**Figure 12 :** (a) Structure cristalline du complexe Cat K/CS-A (PDB ID 3C9E) ; (b) A gauche, le CS-A en interaction avec les exosites chargés positivement (en bleu) et à droite le site actif de Cat K chargé négativement (en rouge) cristallisé avec un inhibiteur connu (E64).<sup>57</sup>

<sup>56</sup> Li, Z.; Yasuda, Y.; Li, W.; Bogyo, M.; Katz, N.; Gordon, R. E.; Fields, G. B.; Brömme, D. *J Biol Chem* **2004**, 279, 5470–5479.

<sup>57</sup> Li, Z.; Kienetz, M.; Cherney, M. M.; James, M. N. G.; Brömme, D. *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 78–91.

<sup>58</sup> Dejica, V. M.; Mort, J. S.; Laverty, S.; Percival, M. D.; Antoniou, J.; Zukor, D. J.; Poole, A. R. *The American Journal of Pathology* **2008**, 173, 161–169.

<sup>59</sup> Cherney, M. M.; Lecaille, F.; Kienitz, M.; Nallaseth, F. S.; Li, Z.; James, M. N. G.; Brömme, D. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 8988–8998.



Les études structurales ont également révélé que l'interaction a lieu tout au long du polymère linéaire de CS-A entre chaque Cat K et un motif hexasaccharidique. De plus, deux mécanismes du clivage des collagènes ont été proposés. Le premier suggère que le complexe formé ressemble à un « collier de perles » (beads-on-a-strand en anglais). Dans ce cas, plusieurs unités de cathepsine se lient à un polymère de CS-A. La triple hélice du collagène viendrait alors se loger entre deux cathepsines adjacentes et serait fragmentée *via* le site actif libre (Figure 13, A). Le second mécanisme suggère qu'une première Cat K se lie au CS-A associé au collagène avant le recrutement d'une seconde cathepsine afin d'obtenir un dimère pouvant cliver la triple hélice (Figure 13, B). Dans les deux cas, le site actif est libre afin de réaliser la protéolyse du collagène.

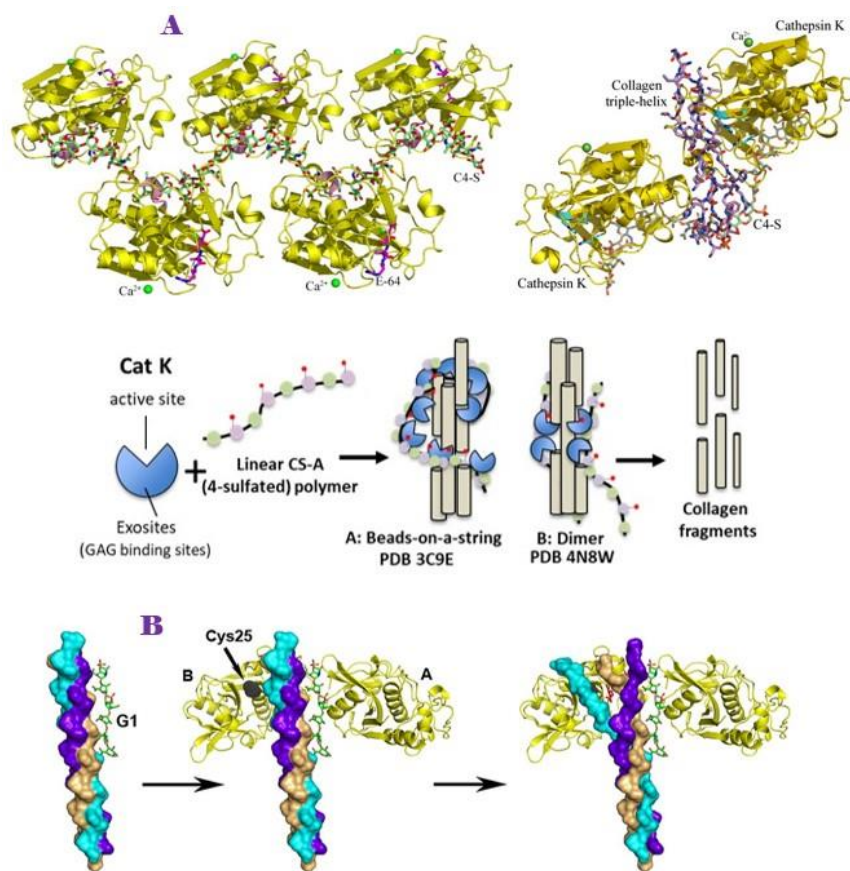


**Figure 13** : Mécanismes proposés pour la protéolyse du collagène.

A) Collier de perles ; B) Dimère



### 3. TRAITEMENTS

Depuis plus de 70 ans déjà, la recherche de traitements contre l'ostéoporose a débuté et ces médicaments peuvent être regroupés en différentes catégories : ceux qui favorisent la formation de l'os et ceux qui inhibent la résorption. On retrouve également des nutriments.<sup>60,61,62,63</sup>

#### 3.1. AGENTS ANABOLIQUES

Les agents anaboliques assurent la formation de nouvel os en renversant l'état ostéoporotique. Parmi ces traitements, on retrouve les analogues de l'hormone parathyroïdienne qui, à faible dose, stimulent l'activité ostéoblastique en participant à la création, la croissance et le développement des os. Cependant, à plus haute dose, les ostéoclastes sont également activés.

Les sels de strontium, le fluor et des statines (une classe d'hypolipémiants) sont exploités pour activer les ostéoblastes et certains peuvent également inhiber les ostéoclastes.

Dans le cadre de l'ostéoporose chez l'homme, des androgènes, des hormones masculines, peuvent être employées pour promouvoir la prolifération cellulaire, pour stimuler l'activité des ostéoblastes ou encore augmenter le volume et la masse des os.

En 2019, Amgen a développé un médicament appelé le Romosozumab. Il s'agit d'un anticorps monoclonal agissant sur la sclérostine, protéine qui inhibe une voie de signalisation canonique (Wnt/ $\beta$ -caténine) réduisant ainsi la formation osseuse, en diminuant son activité ou en inhibant ses effets. Cependant, des études ont montré qu'après 12 ou 24 mois de prise médicamenteuse, le risque de fracture augmente de manière importante.

#### 3.2. NUTRIMENTS

Les vitamines et le calcium sont de bons nutriments. En effet, la vitamine D facilite l'absorption du calcium et agit sur les cellules du RO ce qui stimule la minéralisation tout en inhibant la résorption de l'os. Le calcium, pris en complément, prévient la mobilisation du calcium dans le sang, entraînant un ralentissement de la perte osseuse.

---

<sup>60</sup> Adami, G.; Fassio, A.; Gatti, D.; Viapiana, O.; Benini, C.; Danila, M. I.; Saag, K. G.; Rossini, M. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal* **2022**, *14*, 1-14.

<sup>61</sup> Liang, B.; Burley, G.; Lin, S.; Shi, Y.-C. *Cell Mol Biol Lett* **2022**, *27*, 72.

<sup>62</sup> Langdahl, B. L. *British Journal of Pharmacology* **2021**, *178*, 1891–1906.

<sup>63</sup> Chen, Y.; Jia, L.; Han, T.; Zhao, Z.; Yang, J.; Junping, X.; Yang, H.-J.; Ke, Y. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*.

### 3.3. AGENTS ANTI-RESORPTION

Les agents anti-résorption, quant à eux, inhibent l'activité des ostéoclastes entraînant une diminution de la résorption de l'os. Parmi ces traitements, on retrouve des modulateurs sélectifs du récepteur d'œstrogènes, utilisés depuis plus de 70 ans dans le cadre d'une ostéoporose post-ménopause, augmentant ainsi la densité osseuse tout en diminuant le risque de fractures des vertèbres. Plus tard, des thérapies de remplacement de ces hormones ont été développées diminuant la perte osseuse.

Dès les années 70, les bisphosphonates (BP) ont été utilisés. Ils se lient aux minéraux de l'os et bloquent ainsi la différenciation des ostéoclastes qui finissent par mourir par apoptose. A nouveau, le long-terme n'est que peu envisageable puisqu'ils peuvent finir par inhiber le renouvellement osseux et, par conséquent, ils augmenteraient la fragilité osseuse tout comme le risque de nécrose mandibulaire ou de fractures atypiques du fémur.

On retrouve également les calcitonines, des inhibiteurs de la cytokine RANKL (Denosumab, Amgen) ou de la protéase cathepsine K (Odanacatib, Merck). Dans ce deuxième cas, l'inhibition vise le site actif de la cathepsine K ce qui engendre l'inactivité totale de la protéine et donc de lourds effets secondaires.

Les effets de certains traitements au niveau de l'os ont été résumés dans la *Figure 14*.<sup>62</sup> De plus, un tableau récapitulatif permet d'énumérer quelques effets secondaires non évoqués dans les paragraphes ci-dessus (*Tableau 1*).

| Famille                             | Type                                    | Effets secondaires                                                                                                                 |
|-------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Formation d'os nouveau              | Analogues de l'hormone parathyroïdienne | Hypercalcémie, constipation, dépression, douleurs à la poitrine, hypotension, nausées, migraines...                                |
|                                     | Statines                                | Lésions hépatiques                                                                                                                 |
|                                     | Androgène                               | Lésions cérébrovasculaires et cardiovasculaires                                                                                    |
|                                     | Sels de strontium                       | Thrombose veineuse, syndrome DESS et problèmes cardiaques                                                                          |
|                                     | Fluor                                   | Certains cancers des os et neuroarthrite à haute concentration                                                                     |
|                                     | Anticorps monoclonal anti-sclérotine    | <i>Plus d'études sont nécessaires</i>                                                                                              |
| Inhibition de la résorption de l'os | Calcitonine                             | Réactions allergiques, nausées et hypocalcémie                                                                                     |
|                                     | Thérapie de remplacement d'œstrogènes   | Ballonnements, sensibilité des seins, hypertension, nausées, cancers, bouffées de chaleur, et obésité                              |
|                                     | Modulateurs de récepteurs d'œstrogènes  | Réduction de la quantité de plaquettes, réactions gastrointestinales, bouffées de chaleur, crampes, et thrombose veineuse          |
|                                     | Bisphosphonates                         | Fractures fémorales atypiques, néphrotoxicité, perturbations gastrointestinales et ostéonécrose de la mâchoire                     |
|                                     | Inhibiteur RANKL                        | Infections, hypocalcémie et douleurs des membres<br>Traitement long : fractures fémorales atypiques et ostéonécrose de la mâchoire |
|                                     | Inhibiteur Cat K                        | Attaques et fibrillation auriculaire                                                                                               |
| Nutriments                          | Calcium                                 | Constipation et hypercalcémie                                                                                                      |
|                                     | Vitamine et dérivés                     | Empoisonnement si overdose                                                                                                         |

**Tableau 1 :** Résumé des types de traitements développés et leurs effets secondaires.<sup>60,61,62,63</sup>

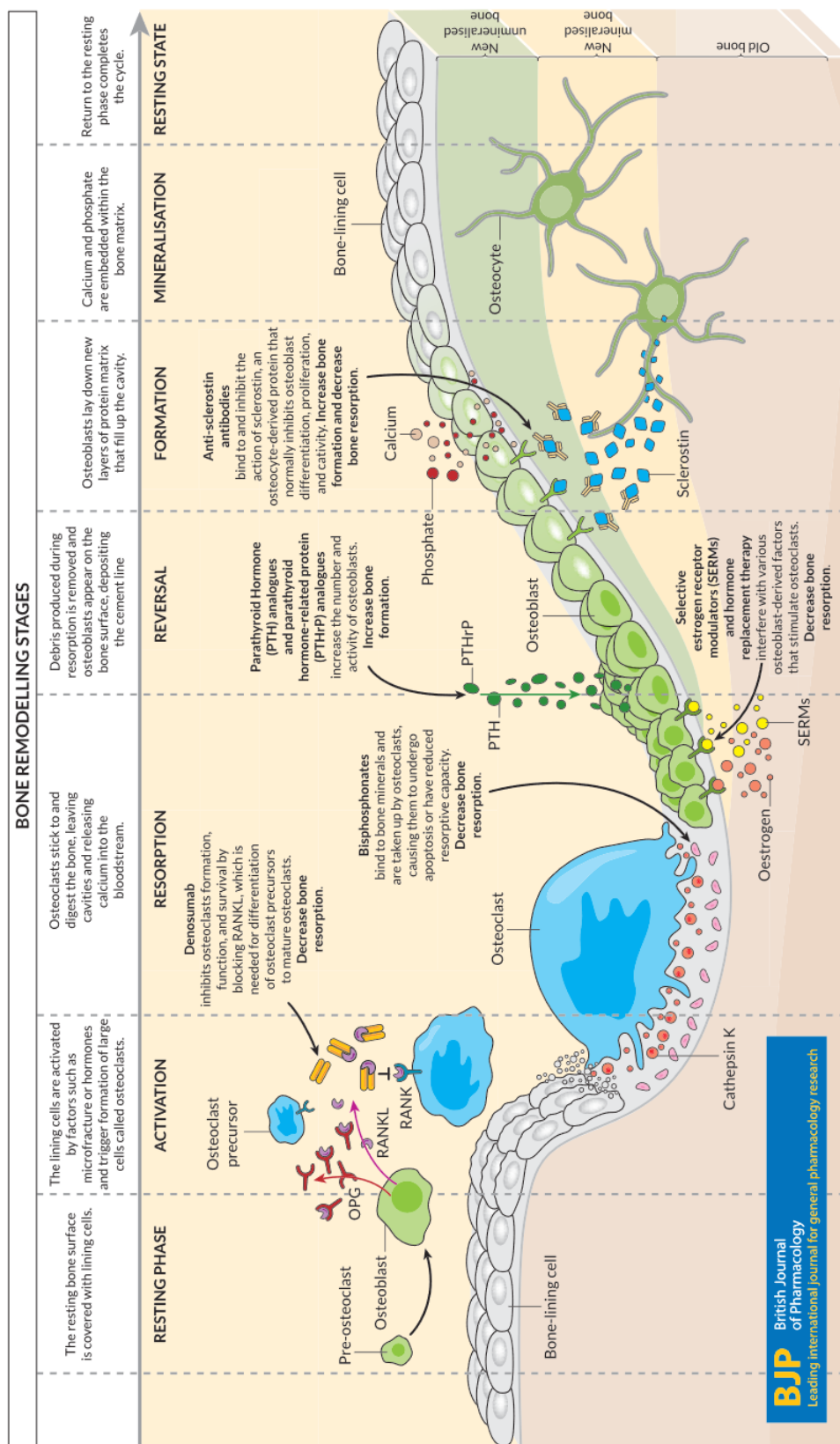


Figure 14 : Effets des différents traitements utilisés sur le processus de remodelage osseux.<sup>62</sup>

Des procédures chirurgicales ont également été mises en place comme une méthode d'ostéo-augmentation locale qui consiste en l'implantation d'un matériau ostéo-conducteur à base de calcium résorbable afin de renforcer l'os localement. Cependant, beaucoup de besoins ne sont pas encore satisfaits à l'heure actuelle. En effet, l'ostéoporose sévère n'est pas traitée, tout comme les patients avec un risque de fracture imminent élevé. Les médicaments actuels ne sont pas satisfaisants, certains présentent de lourds effets secondaires rendant impossible le traitement sur longue durée. Pourtant, un patient atteint d'ostéoporose aura besoin d'une médication toute sa vie une médication et l'utilisation de thérapies séquentielles et combinées est un long et difficile processus à mettre en place.

Jusqu'à maintenant, les inhibiteurs développés ont ciblé le site actif de Cat K, entraînant l'arrêt de l'activité collagénolytique mais également de ses autres activités, et donc, par la suite, l'apparition d'effets secondaires. Afin de diminuer l'activité collagénolytique, une stratégie pourrait être d'inhiber la formation du complexe Cat K/CS afin de conserver l'activité protéolytique de Cat K vis-à-vis des autres substrats.

## OBJECTIF DE LA THESE

L'objectif de ce projet est d'empêcher la formation du complexe CS/Cat K afin d'inhiber uniquement l'activité collagénolytique tout en laissant le site actif libre pour les autres activités et ainsi rééquilibrer la balance destruction/formation de l'os. La stratégie choisie est donc de synthétiser différents oligosaccharides de sulfates de chondroïtine multivalents qui pourraient être capables d'interférer avec la formation du complexe Cat K/CS permettant, par conséquent, de diminuer la résorption de l'os (*Figure 15*). Pour cela, notre équipe collabore notamment avec l'équipe du Dr. Fabien Lecaille du Centre d'Etudes des Pathologies Respiratoires (CEPR) de Tours, travaillant notamment sur les cathepsines.

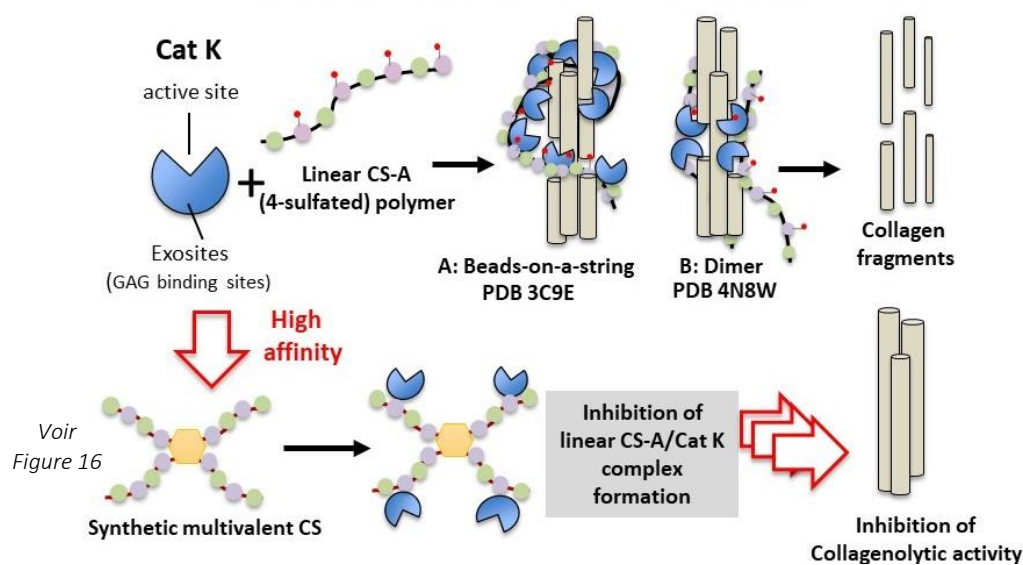


**Figure 15 :** Inhibition du complexe CS/Cat K naturel et, par conséquent, de l'activité collagénolytique.

Dans cette optique, différentes tailles d'oligosaccharides (de di- à hexasaccharides) avec différents motifs de sulfatation (CS-A 4-sulfaté, -C 6-sulfaté, -E 4,6-sulfaté et non-sulfaté) seront synthétisés puis greffés sur différentes plateformes (*Figure 16*).

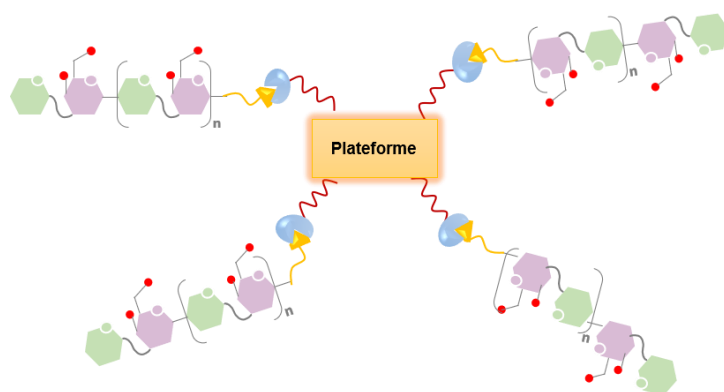


**Figure 16 :** Objectif de la thèse.

Ce travail se divisera en deux parties. L'étape 1 correspond à la synthèse des oligosaccharides diversement sulfatés permettant la ligation sur différentes plateformes (*Figure 17*).

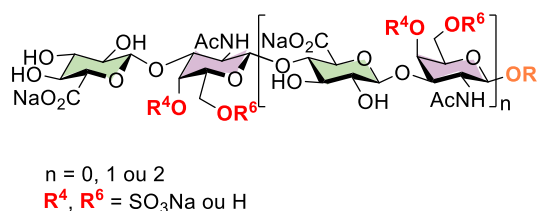


**Figure 17 :** Oligosaccharides à synthétiser.

L'étape 2 représente le couplage sur des plateformes simples (aliphatiques et aromatiques) au laboratoire. Un partenariat avec le Pr. Géraldine Gouhier à COBRA nous permettra de greffer nos molécules sur des cyclodextrines fonctionnalisées. Enfin, nous pourrons obtenir des néoglycoprotéines grâce à la ligation de nos oligosaccharides sur une BSA modifiée par l'équipe du Dr. Ludovic Landemarre à GLYcoDIAG.<sup>64</sup>

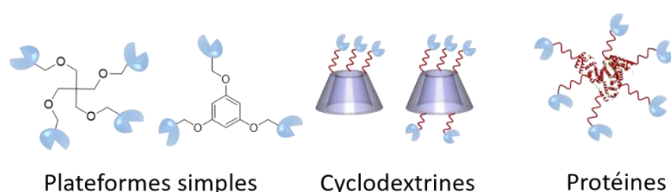


**Figure 18 :** Plateformes envisagées dans ce projet.

Nous allons maintenant introduire la multivalence, son utilisation en chimie et plus précisément avec des GAGs afin de définir pleinement le projet de thèse.

<sup>64</sup> a) <https://www.glycodiag.com> ; b) Prasch, H.; Hojnik, C.; Lindhorst, T. K.; Didak, B.; Landemarre, L.; Wrodnigg, T. M. *Carbohydr. Res.* **2019**, 475, 65–68.

## 1. GENERALITES

### 1.1. DEFINITION

Un objet est multivalent s'il peut interagir avec plusieurs autres composés à la fois. Le principe de l'attache Velcro® en est un exemple puisqu'il réside dans l'utilisation de ce concept *via* une multitude de crochets qui ne se cassent pas mais se déforment et glissent pour s'accrocher dans les boucles, et cela est réversible. Cette invention a été inspirée par des fruits. D'après l'histoire, Georges de Mestral s'est intéressé aux fruits de la bardane après être revenu d'une partie de chasse pendant laquelle un grand nombre d'entre eux se sont accrochés à ses vêtements. Dans la Nature, ce phénomène est largement utilisé pour gagner en affinité et en sélectivité vis-à-vis d'un récepteur. De manière générale, cela permet de maximiser les échanges ou le stockage d'énergie, de nutriments, d'information mais également l'adhésion. Des exemples peuvent être cités comme les arbres qui permettent à la fois la captation de l'eau du sol *via* leurs racines et la captation de la lumière du soleil avec leurs feuilles, ou encore notre réseau respiratoire qui est organisé de telle sorte que le transfert de l'oxygène dans le sang soit optimal. Lee a observé pour la première fois en 1995 un effet dit multivalent au niveau des interactions entre des sucres et des protéines et Whitesides *et al.* ont évoqué des paramètres thermodynamiques dans une revue complète publiée en 1998.<sup>65,66</sup> De nombreuses équipes se sont intéressées à la synthèse de composés multivalents afin d'étudier différents phénomènes biologiques.<sup>67</sup> Aujourd'hui, on retrouve la multivalence en chimie de synthèse, en chimie des matériaux, en biologie et même en médecine, dans le développement de molécules pharmaceutiques jusqu'en biophysique pour étudier divers procédés.

### 1.2. SYNTHÈSE D'OBJETS MULTIVALENTS

Un objet multivalent est constitué d'une plateforme centrale, aussi appelée charpente, d'un bras espaceur et de molécules d'intérêt ou ligands (*Figure 19*). La construction d'un objet multivalent nécessite de prendre en compte plusieurs paramètres tels que : la valence du système, la géométrie dans l'espace, la taille de l'espaceur, le type de ligation choisi... Pouvoir choisir tous ces paramètres

---

<sup>65</sup> Lee, Y. C.; Lee, R. T. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321–327.

<sup>66</sup> Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.

<sup>67</sup> Chabre, Y. M.; Roy, R. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 165–393.



donne un avantage considérable pour contrôler ses propriétés physico-chimiques telles que la solubilité et la chiralité.

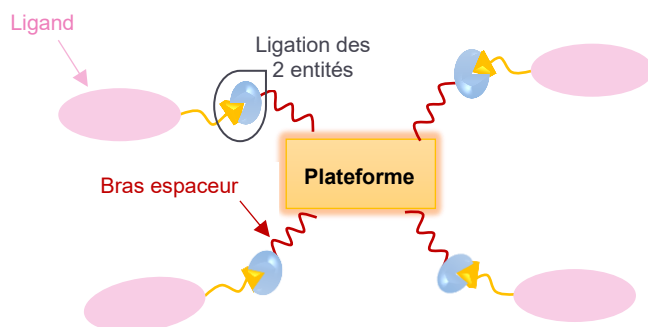


**Figure 19** : Représentation d'un objet multivalent.

La valence et la géométrie du système sont fixées par la plateforme. Il existe une grande diversité de plateformes. Par exemple, nous pouvons citer les dendrimères qui correspondent à un assemblage par couches à partir d'un cœur central grâce à des étapes d'activation/addition pour obtenir la structure dendritique finale désirée. Chaque branchement constitue ce qu'on appelle une nouvelle génération. Les cœurs peuvent être formés à partir d'acides aminés ou de composés commerciaux comme les polyamidoamines (PAMAMs) par exemple. Dans les domaines de la bio-nanotechnologie, on retrouve les calixarènes, les fullerènes, les nanoparticules et les nanotubes. Les cyclodextrines sont également particulièrement utilisées puisqu'elles permettent de rigidifier la partie centrale. D'autres objets multivalents avec une valence plus importante peuvent également être obtenus à partir de polymères, de peptides, de protéines ou de liposomes...<sup>68,69,70</sup> Des clusters sont des objets multivalents de plus petite taille à partir de charpentes aromatiques ou aliphatiques par exemple. Les saccharides peuvent également être utilisés comme plateforme.<sup>67</sup>

<sup>68</sup> Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; Castro, C. D.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K.-E.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Marradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Raymond, J.-L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhof, H.; Imberty, A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709–4727.

<sup>69</sup> Artner, L. M.; Merkel, L.; Bohlke, N.; Beceren-Braun, F.; Weise, C.; Dervede, J.; Budisa, N.; Hackenberger, C. P. R. *Chem. Commun.* **2011**, *48*, 522–524.

<sup>70</sup> Pifferi, C.; Berthet, N.; Renaudet, O. *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 953–965.

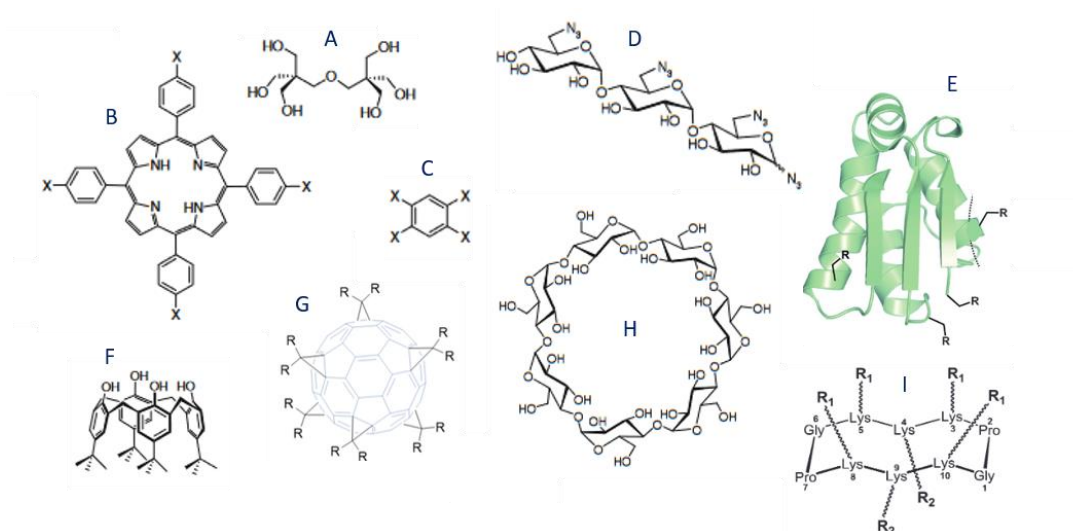


**Figure 20 :** Exemples de plateformes utilisées.<sup>67</sup>

A) aliphatique ; B) porphyrine ; C) aromatique ; D) sucre ; E) protéine ; F) calixarène ; G) fullerène ; H) cyclodextrine ; I) peptide cyclique.

## 2. EXEMPLES DE MULTIVALENCE DE SUCRES

Il existe de nombreux exemples de sucres multivalents, on parle alors de glycomposés multivalents (glycoclusters, glycodendrimères...).<sup>71</sup> Nous avons sélectionné deux exemples.

### 2.1. SYSTEMES MULTIVALENTE POUR LES LECTINES DE L'HUMAIN

Les lectines sont des protéines se liant spécifiquement aux saccharides grâce à leur domaine de reconnaissance des sucres (carbohydrate recognition domain, CRD). Présentes dans les organes et les tissus, on les retrouve impliquées dans des processus biologiques comme l'inflammation, les cancers, l'immunité et des infections... Les interactions sucres/lectines sont de l'ordre du millimolaire mais cela est naturellement compensé par de la multivalence. La revue publiée en 2023 par Martinez-Bailén *et al* fait état de glycomposés multivalents synthétisés dans le but d'étudier 5 types de lectines ainsi que les activités biologiques associées (Figure 17). On retrouve les dendrimères et dendrons, les nanoparticules, les polymères, les liposomes, les peptides, les protéines, les calixarènes, ou encore les cyclodextrines sur lesquels sont greffés différents sucres tels que des mannoses, des lactoses ou encore des thiogalactoses, de tailles différentes (du mono- à l'hexasaccharide). Différents types de ligation ont été employés mais la cycloaddition de Huisgen catalysée au cuivre (CuAAC) et son

<sup>71</sup> Müller, C.; Despras, G.; Lindhorst, T. K. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 3275–3302.

alternative développée par Bertozzi (strain promoted alkyne-azide cycloaddition SPAAC) ont été principalement utilisées.<sup>72</sup>

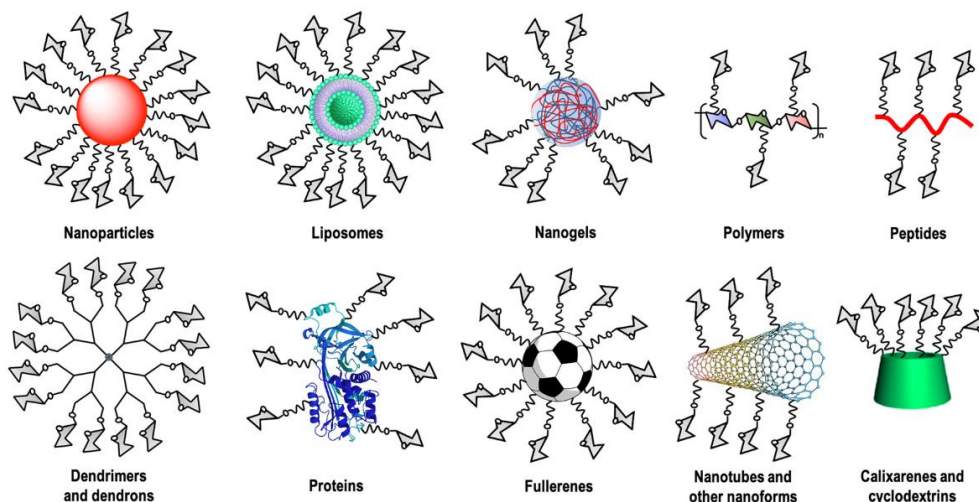


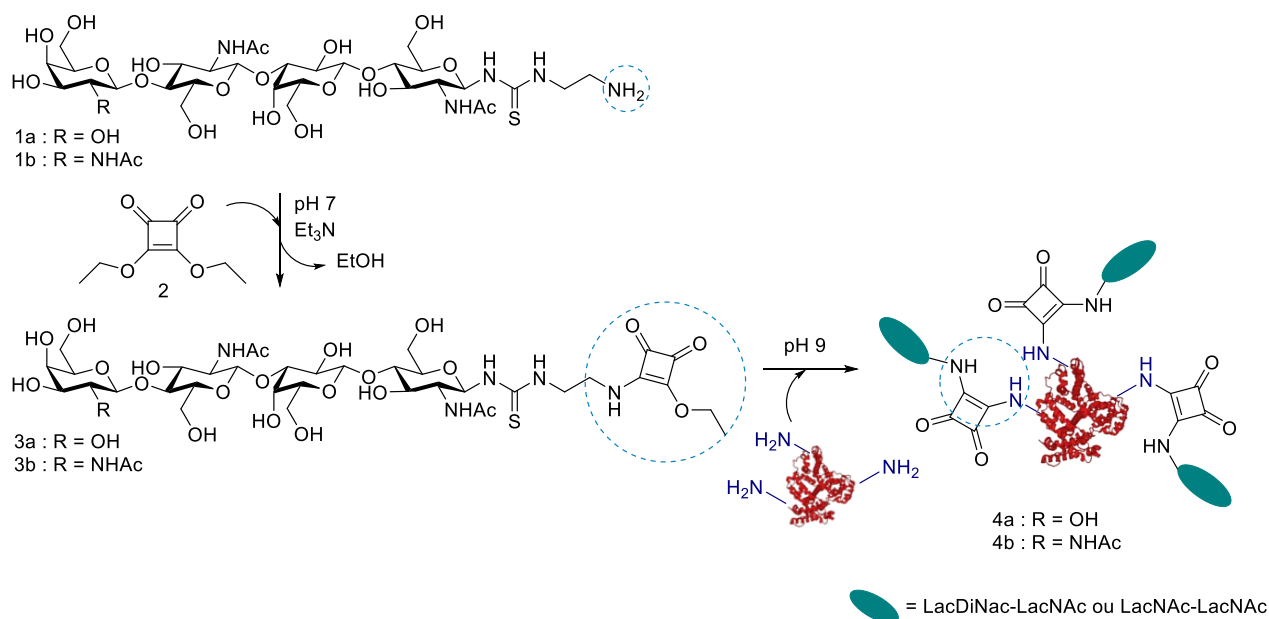
**Figure 21** : Types de composés multivalents utilisés pour l'étude des interactions avec des lectines.<sup>71</sup>

De manière générale, les ligands multivalents ont présenté de meilleures affinités et certaines activités intéressantes ont été observées.

Prenons l'exemple des galectines, un type de lectines, qui sont impliquées dans différents processus biologiques comme l'adhésion et la signalisation cellulaire et qui reconnaissent spécifiquement les  $\beta$ -galactosides. Divers composés multivalents ont été synthétisés pour cibler cette famille de lectine. Des néoglycoprotéines (objets multivalents dont le cœur est une protéine modifiée et le ligand est un sucre) ont notamment été synthétisées car elles présentent l'avantage d'être biocompatibles et permettent une grande valence. Böcker *et al.* ont synthétisé deux tétrasaccharides différents LacNAc-LacNAc **1a** et LacDiNAc-LacNAc **1b** portant une amine terminale sur l'aglycone afin de réaliser des glycomimétiques des ligands naturels. La mise en réaction de ces sucres avec le 3,4-diéthoxy-3-cyclobutène-1,2-dione **2** a permis la formation d'un ester monoamide d'acide squarique tout en laissant un vinyl éther disponible. Le squaramate **3a-b** obtenu a ensuite été utilisé pour réaliser le greffage sur une protéine, l'albumine de sérum bovin (BSA), afin d'obtenir les composés multivalents **4a-b** via un lien squaramide après réaction à partir des amines des chaînes latérales, principalement les lysines, de la protéine (Figure 18).<sup>73</sup>

<sup>72</sup> Martínez-Bailén, M.; Rojo, J.; Ramos-Soriano, J. *Chemical Society Reviews* **2023**, 52, 536–572.

<sup>73</sup> Böcker, S.; Laaf, D.; Elling, L. *Biomol.* **2015**, 5, 1671–1696.



Synthèse composés 3a et 3b : 2 (4,0 eq.), Et<sub>3</sub>N (4,0 eq.), EtOH 50 % (35 mM), t.a., 16 h.

Synthèse des néoglycoprotéines : BSA, solution saline tamponnée au borate (50 mM), t.a., jusqu'à 136 h.

**Figure 22** : Synthèse de néoglycoprotéines ciblant les galectines par Böcker *et al.*<sup>73</sup>

Différents taux de greffage (1 à 29 sucres par BSA) ont été obtenus ce qui a permis d'étudier lien entre la valence et l'interaction vis-à-vis de Gal-3, une galectine qui joue un rôle crucial dans le développement du cancer (contribue à l'immunosuppression), grâce au calcul du  $K_d$  par sucre.<sup>74</sup> Il semblerait que plus la valence est importante, plus le  $K_d$  diminue et donc meilleur est le potentiel de liaison. De plus, d'autres tests ont permis de montrer leur potentiel inhibiteur qui augmente avec la valence, ce qui en fait donc de bons candidats pour cibler cette galectine dans la recherche contre le cancer.<sup>73</sup>

## 2.2. INHIBITION DE GLYCOSIDASES PAR DES COMPOSES MULTIVALENTS

En 2019, le Pr. Philippe Compain a publié une revue rassemblant les principales avancées de son équipe concernant le design et la synthèse d'inhibiteurs multivalents de glycosidases. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse de la liaison glycosidique des sucres ou glycoconjugués naturellement présents dans presque tous les organismes vivants. La synthèse d'inhibiteurs multivalents des glycosidases a débuté

<sup>74</sup> a) Šimonová, A.; Kupper, C. E.; Böcker, S.; Müller, A.; Hofbauerová, K.; Pelantová, H.; Elling, L.; Křen, V.; Bojarová, P. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, 101, 47–55. ; b) Kupper, C. E.; Böcker, S.; Liu, H.; Adamzyk, C.; Kamp, J. van de; Recker, T.; Lethaus, B.; Jahnen-Dechent, W.; Neuss, S.; Muller-Newen, G.; Elling, L. *Curr. Pharm. Des* **2013**, 19, 5457–5467.

vers la fin des années 1990 avec des clusters d'minosucres allant du di- au tétravalent.<sup>75</sup> Désormais, on retrouve une plus grande librairie de composés préparés à partir de diverses plateformes, divers saccharides *via* divers modes de ligation (*Figure 23*). En effet, on retrouve des cœurs présentant une faible valence (aromatiques, aliphatiques, sucres) tout comme des polymères, des pseudo-peptides, des cyclodextrines et des nanoparticules. Le choix est grand, permettant ainsi de jouer sur la rigidité ou la flexibilité conformationnelle du centre et, par conséquent, l'orientation spatiale des sucres présentés à la surface de l'objet. Pour le ligand (appelé inhitope ici), les iminosucres, cibles des glycosidases, sont principalement utilisés mais des exemples de C-glycosides sont également donnés. Les composés ont été principalement synthétisés *via* CuAAC mais deux autres méthodes de click sans métal ont été utilisées : l'échange de fluorure de soufre (sulfur fluoride exchange SuFEx) entre un fluorure de sulfonyle et une amine et la ligation oxime entre un amino-oxy et un aldéhyde.<sup>76</sup>

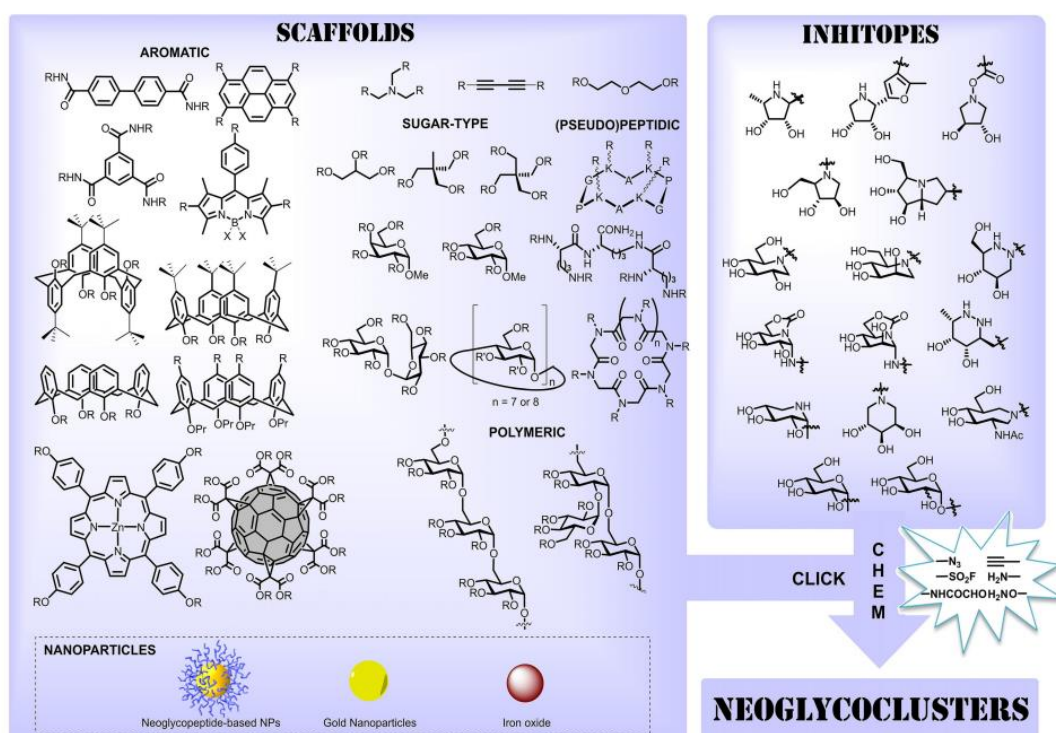


**Figure 23 :** Composés multivalents synthétisés pour l'étude de l'interaction avec des glycosidases.<sup>75</sup>

<sup>75</sup> Lohse, A.; Jensen, K. B.; Lundgren, K.; Bols, M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, 7, 1965–1971.

<sup>76</sup> Compain, P. *The Chemical Record* **2020**, 20, 10–22.

La multivalence s'est révélée efficace pour améliorer l'affinité mais également la sélectivité d'inhibiteurs synthétisés de certaines glycosidases comme l' $\alpha$ -mannosidase ou pour en stimuler d'autres comme la  $\beta$ -glucocérébroside.

### 3. GAGS MULTIVALENTS

Beaucoup de sucres multivalents ont donc été synthétisés à ce jour mais on ne compte que quelques exemples de GAGs multivalents (tous sauf les DS).<sup>77</sup>

#### 3.1. SYNTHÈSE D'HEPARINE MULTIVALENTE

En 2007, l'équipe de Seeberger a publié la synthèse de dendrimères à base d'hexasaccharides d'héparine. Les plateformes étaient de type polyamidoamine (PAMAM) avec 32 fonctions acide carboxylique (Figure 24).<sup>78</sup>

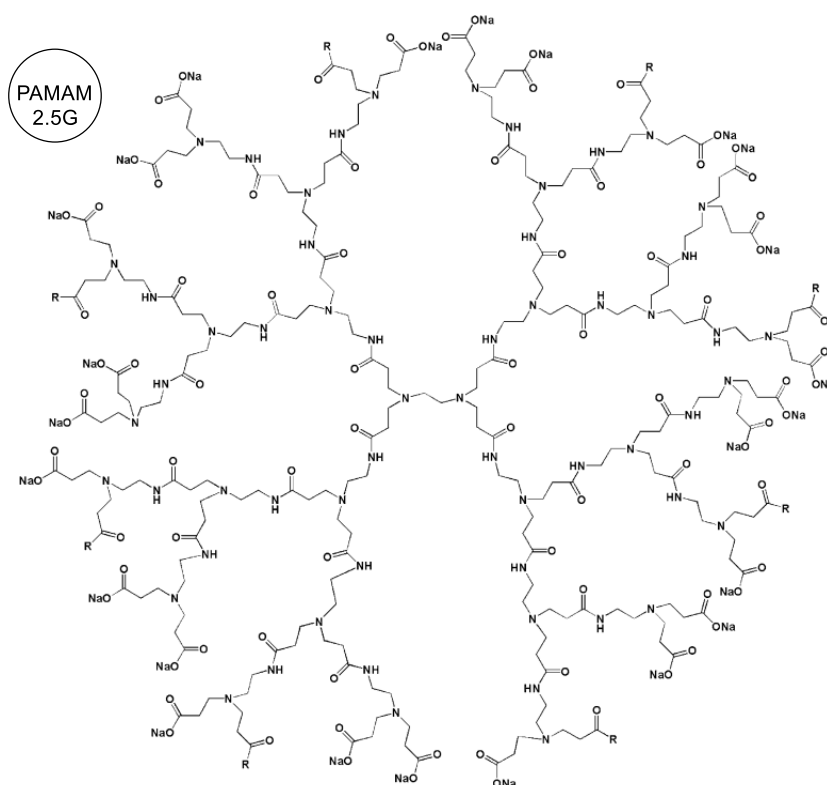
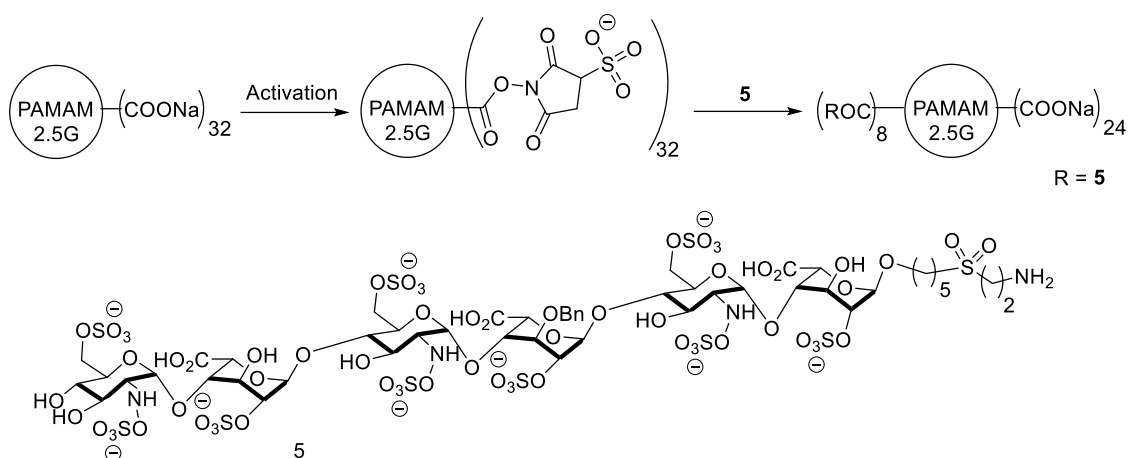


**Figure 24** : Plateforme de type PAMAM utilisée par l'équipe de Seeberger.<sup>78</sup>

<sup>77</sup> Rojo, J.; Nieto, P. M.; Paz, J. L. de. *Current Medicinal Chemistry* **2022**, 29, 1173–1192.

<sup>78</sup> de Paz, J. L.; Noti, C.; Böhm, F.; Werner, S.; Seeberger, P. H. *Chemistry & Biology* **2007**, 14, 879–887.

L'activation de la plateforme a été réalisée en présence de *N*-éthyl-*N'*-(diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le couplage peptidique a ensuite été effectué en présence de triéthylamine afin de former des liaisons amides entre les deux parties (*Schéma 1*). Cependant, la valence maximale n'a pas été atteinte puisque seulement 25 % environ des esters ont été transformés (pourcentage déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ). Toutefois, les composés synthétisés ont présenté des interactions intéressantes avec des protéines liant naturellement des héparines comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF) permettant d'envisager l'élaboration de nouveaux agents thérapeutiques pour la réparation, la régénération et la cytoprotection des tissus.



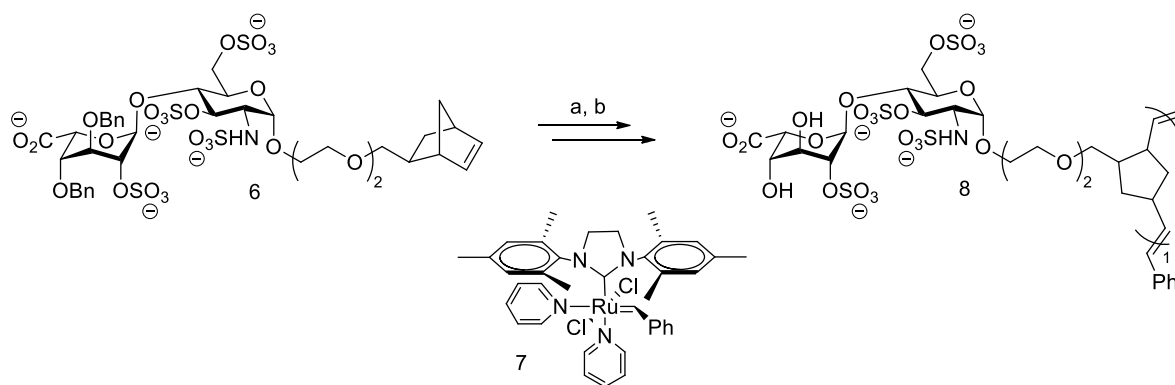
*Activation de la plateforme* : EDC (1,2 eq./COONa), NHS (1,2 eq./COONa), DMSO, t.a., 24 h.

*Synthèse du glycodendimère* : Hexasaccharide **5** (1,1 eq./COONa), Et<sub>3</sub>N, DMSO, t.a., 24 h.

**Schéma 1** : Dendrimères à base d'héparine et d'une plateforme de type PAMAM.<sup>78</sup>

En 2013, l'équipe de Hsieh-Wilson a synthétisé des mimétiques d'héparine comme anticoagulants (*Schéma 2*). Le disaccharide d'héparine tétrasulfaté **6** portant un norbornène en aglycone a d'abord été synthétisé. La polymérisation par ouverture de cycle par métathèse (ring-opening metathesis polymerization ROMP) a été réalisée dans un mélange MeOH/DCM et les composés obtenus ont été débenzylés afin de donner les glycopolymères **8** avec un degré de polymérisation (DP) allant de 4 à 45 (déterminé par diffusion de la lumière à l'aide d'un détecteur SEC-MALS). Les composés avec un DP de 30 et de 45 ont montré une activité inhibitrice intéressante vis-à-vis d'un facteur de coagulation.<sup>79</sup>

<sup>79</sup> Oh, Y. I.; Sheng, G. J.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 11796–11799.



a) **7**, MeOH/DCE, 55 °C. b) Pd(OH)<sub>2</sub>/C, H<sub>2</sub> (1 atm), MeOH, tampon phosphate (pH 7,4), 63-92 %.

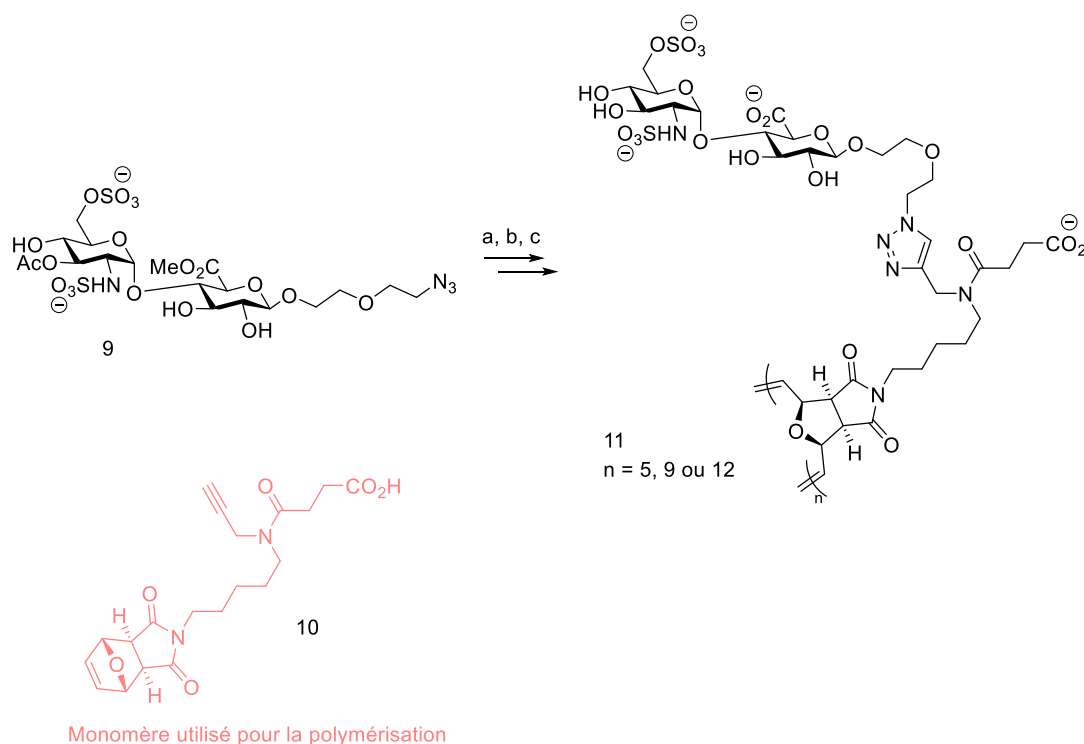
**Schéma 2** : Glycopolymères d'héparines par l'équipe de Hsieh-Wilson.<sup>79</sup>

### 3.2. SYNTHÈSE DE SULFATES D'HEPARANES MULTIVALENTS

L'équipe de Nguyen a, quant à elle, synthétisé des oligosaccharides de sulfates d'héparane multivalents (*Schéma 3*). Le disaccharide **9** a été synthétisé avec un azide terminal ce qui a permis ensuite le greffage au monomère **10** *via* CuAAC en présence d'iodure de cuivre CuI et de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène DBU. Puis, une polymérisation *via* ROMP a été réalisée avec un catalyseur de Grubbs III. Différents degrés de polymérisation (5, 9 ou 12) ont été obtenus suite à la variation de la quantité de catalyseur employée et cela a été confirmé par RMN <sup>1</sup>H. Pour finir, les composés **11** ont été obtenus après saponification. Ces glycopolymères ont par la suite été testés comme inhibiteurs d'héparanase et les polymères se sont avérés plus efficaces que les monomères (de l'ordre du nanomolaire). Le polymère avec un DP de 12 s'est révélé être le plus puissant.<sup>80</sup>

<sup>80</sup> Loka, R. S.; Yu, F.; Sletten, E. T.; Nguyen, H. M. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 9163–9166.





a) **10**, CuI, DBU, DMF, 50 °C, 64 %. b) (H<sub>2</sub>IMes)(3-BrPy)<sub>2</sub>(Cl)<sub>2</sub>Ru=CHPh, DCE/TFE (2.5:1), 55 °C, 1 h. c) LiOH, H<sub>2</sub>O/THF, 80-89 %.

**Schéma 3** : Glycopolymères de sulfates d'héparane synthétisés par l'équipe de Nguyen.<sup>80</sup>

D'autres glycopolymères de HS ont été synthétisés à partir de di-, tri- et tétrasaccharides *via* une méthode chimio-enzymatique. En effet, la stratégie débute par une première polymérisation d'un acrylamide fonctionnalisé par un acide glucuronique. Ensuite, des oligosaccharides ont été obtenus (du di- au tétrasaccharide) par élongation enzymatique. Finalement, deux sulfatations différentes ont été effectuées : soit une 6-sulfatation, soit toutes les *O*-sulfatation. Après différentes études, le polymère fonctionnalisé avec des trisaccharides complètement *O*-sulfatés a semblé avoir la plus importante affinité de liaison ( $K_d$  de  $3,0 \times 10^{-10}$  M) avec le récepteur transmembranaire qui reconnaît des molécules dites de danger (receptor for advanced glycation end-products, RAGE), pouvant donner lieu à de potentiels antagonistes de RAGE.<sup>81</sup>

En 2018, l'équipe de Zubkova a travaillé sur des glyoclusters de HS. Une librairie de di- et de tétrasaccharides a été synthétisée avec une amine libre sur l'aglycone.<sup>82</sup> Le couplage de ces

<sup>81</sup> Li, J.; Cai, C.; Wang, L.; Yang, C.; Jiang, H.; Li, M.; Xu, D.; Li, G.; Li, C.; Yu, G. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 1570–1574.

<sup>82</sup> Tyler, P. C.; Guimond, S. E.; Turnbull, J. E.; Zubkova, O. V. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 2718–2723.

oligosaccharides a été réalisé sur un noyau pentaérythritol fonctionnalisé avec des esters **13** en présence de triéthylamine dans le DMF (*Schéma 4*). Les composés tétravalents **14** obtenus ont pu être ensuite diversement sulfatés et déprotégés. Finalement, ils ont été testés comme inhibiteurs de l'héparanase, une glycosidase impliquée dans les cancers car elle favorise notamment la migration cellulaire. Certains de ces glycomimétiques ont présenté de faibles IC<sub>50</sub> (contrairement à l'oligosaccharide monovalent) tout en inhibant les métastases ainsi que la croissance des cellules tumorales du méylome humain (greffé chez la souris) sans être cytotoxiques et semblent finalement intéressants pour développer une nouvelle classe de médicaments contre le cancer.<sup>83</sup>

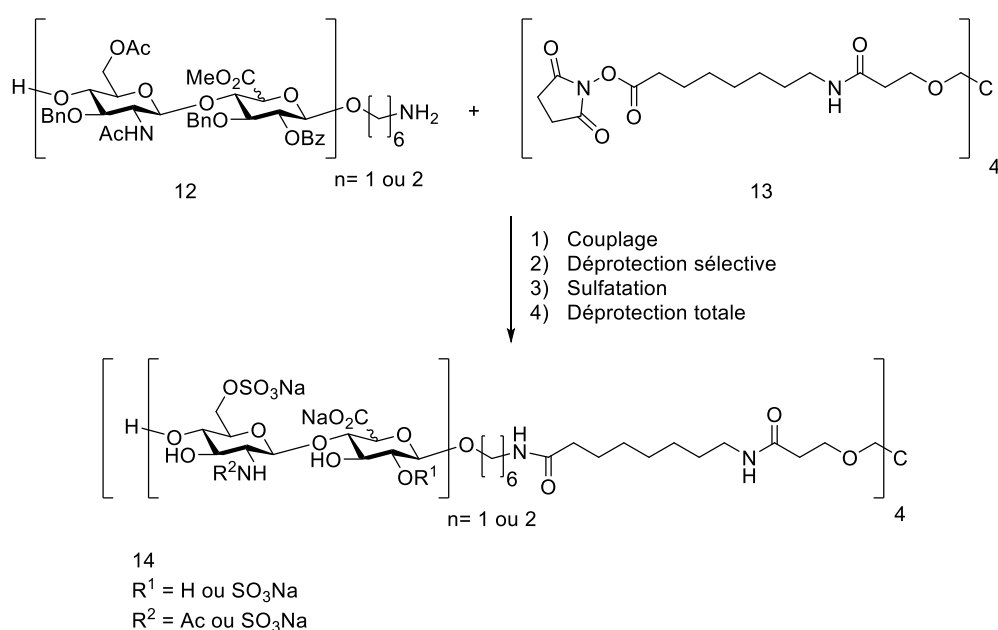


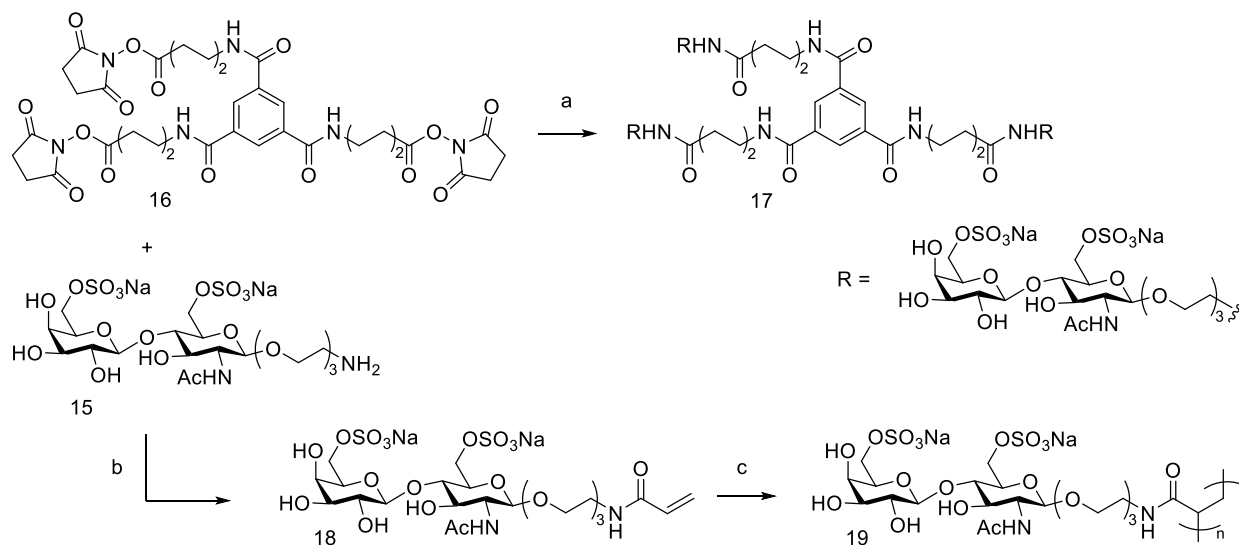
**Schéma 4** : Exemple de glyclusters de disaccharides de sulfates d'héparane par l'équipe de Zubkova.<sup>82</sup>

### 3.3. SYNTHÈSE DE SULFATES DE KERATANE MULTIVALENTS

En 2018, l'équipe de Taniguchi a publié la synthèse d'un dendrimère et d'un polymère à base de sulfates de kératane. Le disaccharide 6-sulfaté **15** a été synthétisé avec une amine libre en aglycone. Le disaccharide a ensuite été greffé sur la plateforme trivalente **16** fonctionnalisée par des esters activés. Le disaccharide a également été mis en réaction avec le *N*-acryloxysuccinimide afin de donner le composé **18** qui a ensuite été polymérisé en présence de 2,2'-azobis(2-méthylpropionamidine) afin de donner les composés **19** avec un DP (déterminé par HPLC équipée d'une colonne d'exclusion stérique) de 33 en moyenne (*Schéma 5*). Ils ont démontré que les composés multivalents avaient une

<sup>83</sup> Zubkova, O. V.; Ahmed, Y. A.; Guimond, S. E.; Noble, S.-L.; Miller, J. H.; Alfred Smith, R. A.; Nurcombe, V.; Tyler, P. C.; Weissmann, M.; Vlodavsky, I.; Turnbull, J. E. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3236–3242.

plus grande affinité vis-à-vis de la langérine ( $\mu\text{M}$ - $\text{nM}$ ) que le monovalent. De plus, dans des expériences cellulaires et *in vivo*, ils ont influencé la signalisation cellulaire et l'inflammation.<sup>84</sup>



Synthèse du glycocluster : a)  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, 58 %.

Synthèse du glycopolymère : b) *N*-acryloxysuccinimide, 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 79 %. c) AAPD,  $\text{H}_2\text{O}$ , 72 °C, 4 h, 95 %.

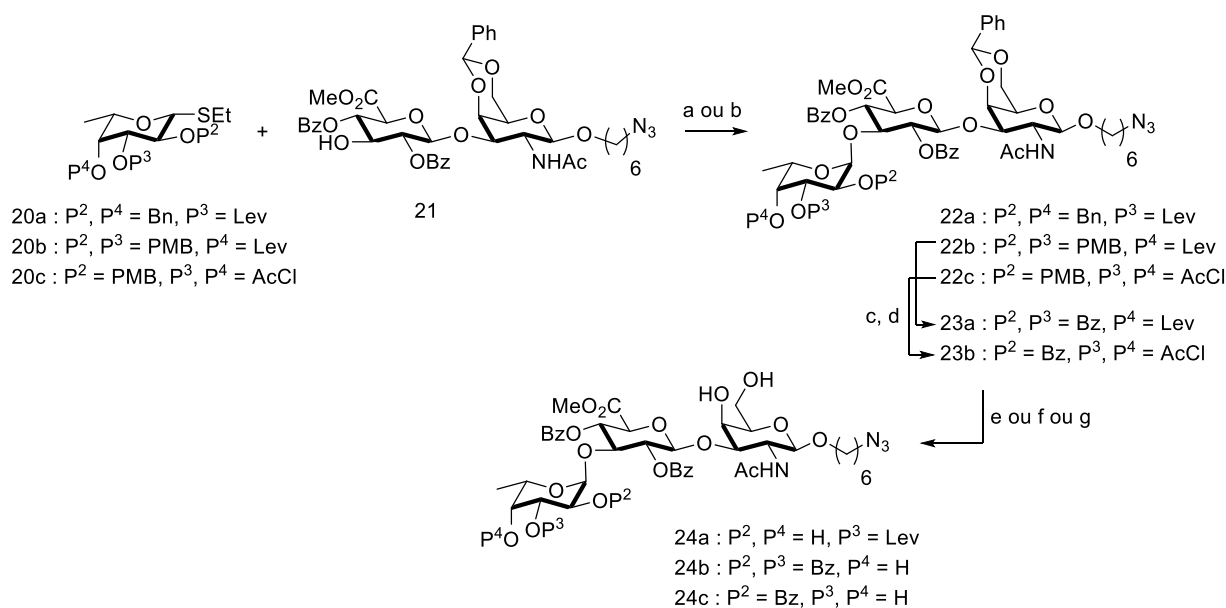
**Schéma 5** : Glycocluster et glycopolymère de sulfates de kératane de l'équipe de Taniguchi.<sup>84</sup>

### 3.4. SYNTHÈSE DE SULFATES DE CHONDROÏTINE FUCOSYLES

L'équipe de Li Zhongjun travaille sur une catégorie particulière de CS, les CS fucosylés, qui correspondent à un disaccharide de CS fonctionnalisé avec un fucose en position 3 du GlcA. Ce trisaccharide a été préparé *via* une glycosylation [2+1] entre un fucose donneur dont les positions 2,3 et 4 ont été protégées par différents groupements protecteurs (benzyles Bn, lévulinoyles Lev, chloroacétyles AcCl et *p*-méthoxybenzyle PMB) en prévision des futures positions à sulfater et un disaccharide de CS accepteur porteur d'un groupement azide terminal sur l'aglycone. Puis les groupements PMB ont été déprotégés et remplacés par des benzoyles Bz avant que les futures positions à sulfater soient déprotégées (Schéma 6).<sup>85</sup>

<sup>84</sup> Ota, F.; Hirayama, T.; Kizuka, Y.; Yamaguchi, Y.; Fujinawa, R.; Nagata, M.; Ismanto, H. S.; Lepenies, B.; Aretz, J.; Rademacher, C.; Seeberger, P. H.; Angata, T.; Kitazume, S.; Yoshida, K.; Betsuyaku, T.; Kida, K.; Yamasaki, S.; Taniguchi, N. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2018**, 1862, 1592–1601.

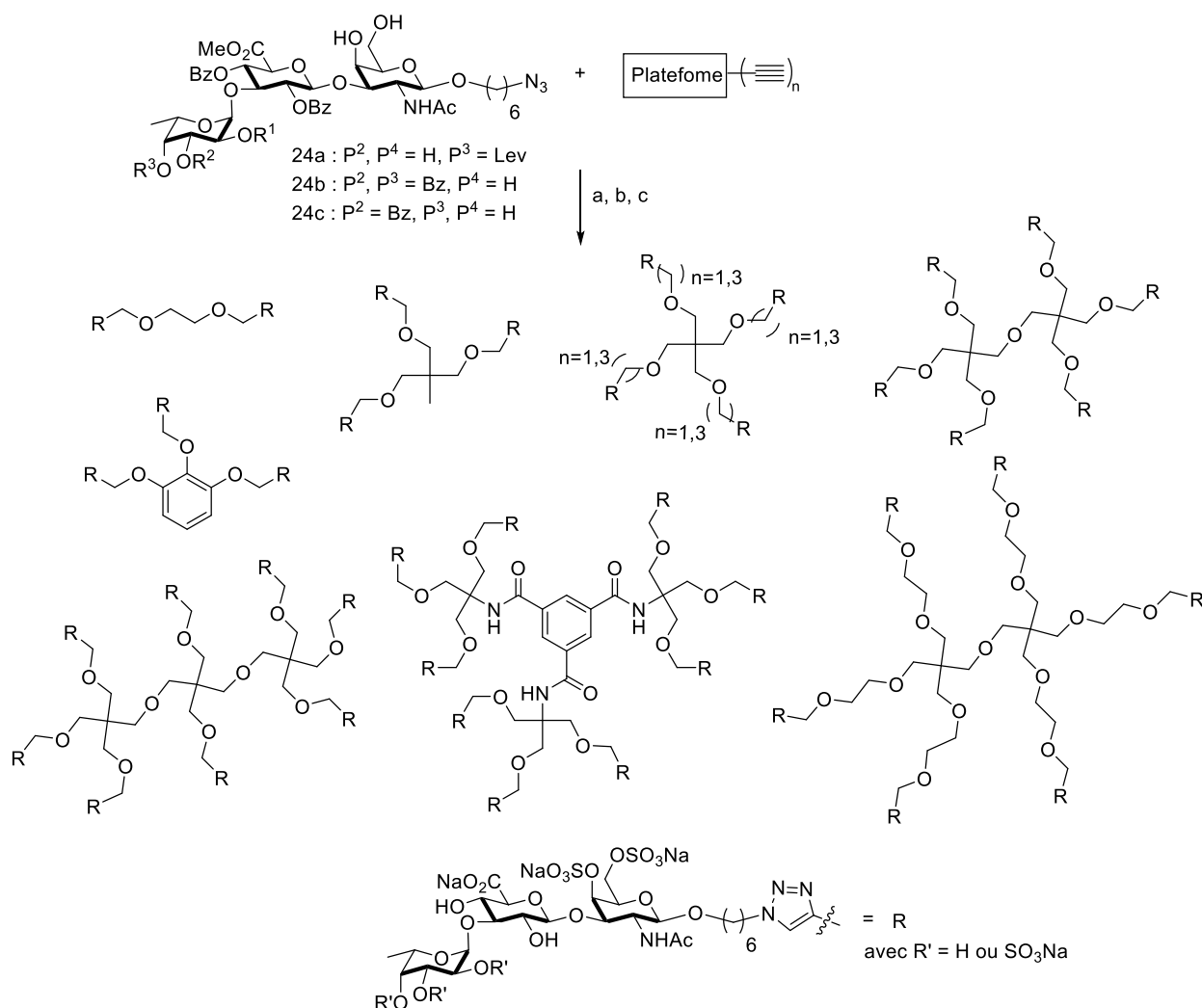
<sup>85</sup> Zhang, X.; Yao, W.; Xu, X.; Sun, H.; Zhao, J.; Meng, X.; Wu, M.; Li, Z. *Chemistry – A European Journal* **2018**, 24, 1694–1700.



a) **20a** ou **20b**, NIS, AgOTf, tamis 4 Å, DCM, -20 °C à t.a., puis Ac<sub>2</sub>O/AcOH, 70 °C, 77- 84 % ; b) **20c**, NIS, AgOTf, tamis 4 Å, DCM, -20 °C à t.a., 78 % ; c) DDQ, DCM/H<sub>2</sub>O, t.a. ; d) BzCl, pyridine, -10 °C à t.a., 89-91 % sur 2 étapes ; e) AcOH(aq), 50 °C puis NaBrO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, AcOEt/H<sub>2</sub>O, t.a., 65 % sur 2 étapes ; f) AcOH(aq), 50 °C puis thiourée, lutidine, MeOH, 60 °C, 70 % sur 2 étapes ; g) AcOH(aq), 50 °C puis N<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.AcOH, pyridine/DCM, 0 °C à t.a., 76 % sur 2 étapes.

**Schéma 6** : Synthèse des trisaccharides de sulfates de chondroïtine fucosylés par L'équipe de Li Zhongjun.<sup>85</sup>

Une CuAAC a ensuite été réalisée avec différentes plateformes en présence de sulfate de cuivre, d'ascorbate de sodium dans un mélange chloroforme/méthanol/eau. Les composés multivalents obtenus ont été sulfatés en position 4 et 6 de la GalN ainsi que sur le fucose en positions 2, 3 et/ou 4 avant d'être déprotégés. Une librairie de composés présentant 3 motifs de sulfatation différents et une valence allant de 2 à 9 a ainsi pu être synthétisée (*Schéma 7*). Ces composés ont été testés dans le cadre du développement de nouveaux agents anticoagulants. Seuls les composés sulfatés en positions 2 et 4 sur le fucose ont une activité anticoagulante.<sup>85</sup>

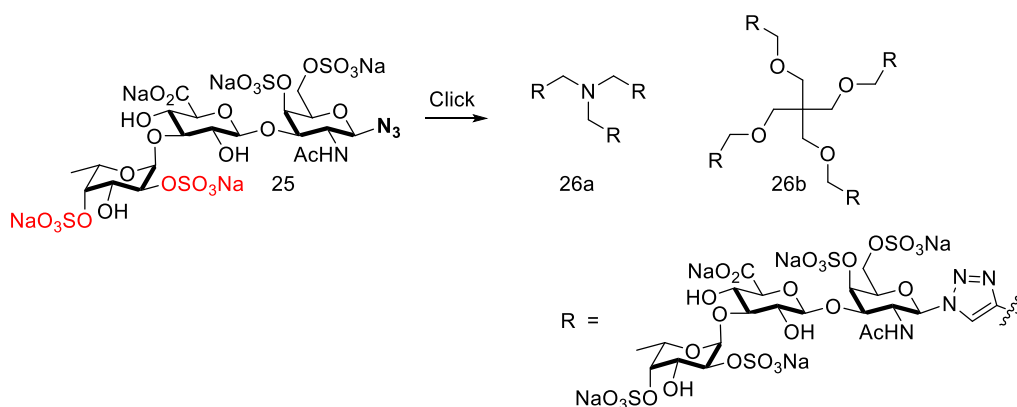


a) Trisaccharide (1,2 eq./alcyne), CuSO<sub>4</sub> (0,12 eq./alcyne), Na Ascorbate (1,0 eq./alcyne), CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 3/1/1, 45 °C, 16 h, 88 % à quant. ; b) SO<sub>3</sub>.NMe<sub>3</sub>, DMF, 50 °C ; b) LiOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, -10 °C à t.a. puis NaOH(a) 4M, MeOH, 0 °C à t.a., 60-86 % sur 2 étapes.

**Schéma 7** : Synthèse de glycoclusters de sulfates de chondroïtine fucosylés avec un espaceur.<sup>85</sup>

En parallèle, cette équipe a également réalisé la synthèse de deux autres trisaccharides multivalents, sans espaceur, mais avec le motif de sulfatation qui a donné les meilleurs résultats auparavant. On peut noter que la CuAAC n'a pas été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en raison de la présence des groupements sulfates sur le trisaccharide. L'acide 2-(4-((bis((1-(*tert*-butyl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)acétique (BTAA) a été utilisé comme ligand et le tampon phosphate salin comme solvant (Schéma 8).<sup>86</sup>

<sup>86</sup> Liu, H.; Zhang, X.; Wu, M.; Li, Z. *Carbohydr. Res.* **2018**, *467*, 45–51.



Conditions de CuAAC : Plateforme (1,0 eq.), CuSO<sub>4</sub> (0,12 eq./alcyne), Na Ascorbate (1,0 eq./alcyne), BTAA (1,0 eq./alcyne), 10 mM tampon PBS, t.a., 48 h, **26a** 85 %, **26b** 90 %.

**Schéma 8** : Synthèse de glycoclusters de sulfates de chondroïtine fucosylés sans espaceur.<sup>86</sup>

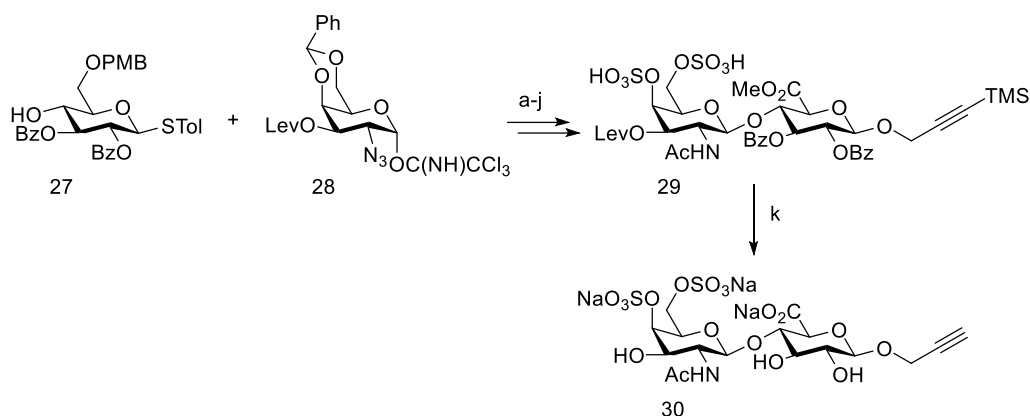
Finalement, tous les composés ont été testés comme inhibiteurs d'une protéine du sang et il est apparu que les multivalents ont présenté une activité inhibitrice proche du polymère naturel mais que les plus intéressants ne sont pas ceux avec la valence la plus grande.<sup>85,86</sup>

### 3.5. SYNTHÈSE DE CS MULTIVALENTS

#### A- DENDRIMÈRES DE CS-E PAR L'ÉQUIPE DE ZHAO

En 2019, l'équipe de Zhao a synthétisé des dendrimères de disaccharides de CS-E de séquence GalN-GlcA (*Schéma 9*). Le monosaccharide donneur **28** a été préparé en 5 étapes avec un groupement azide en position 2 pour introduire par la suite le groupement *NH*-acétyle, un benzylidène pour la future sulfatation des positions 4 et 6 et un groupement lévulinoyle pour permettre l'élargissement de la chaîne. Le monosaccharide accepteur **27**, quant à lui, a été réalisé en 6 étapes. La glycosylation entre les deux monosaccharides a été réalisée puis le groupement 3-triméthylsilylpropargyle a été introduit en aglycone. Ensuite, le groupement *p*-méthoxybenzyle (PMB) a été déprotégé avant de réaliser une oxydation de l'alcool primaire suivie d'une estérification. Après conversion du groupement azide en acétamide, le benzylidène a été déprotégé et la disulfatation a été réalisée avant la déprotection finale afin d'obtenir le composé **30**. Cette synthèse complexe nécessite 22 étapes.<sup>87</sup>

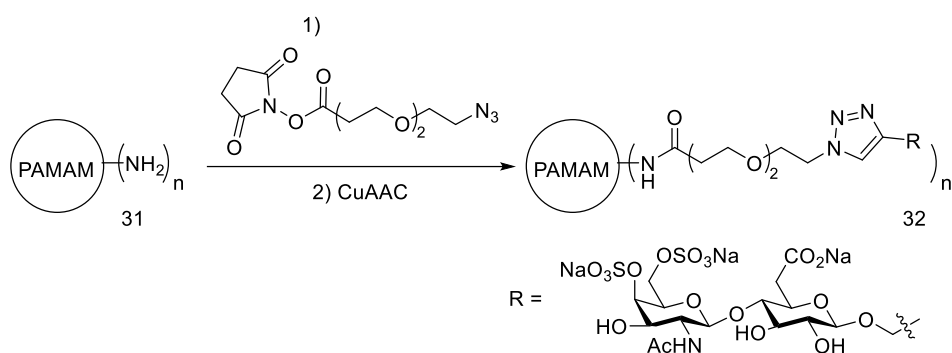
<sup>87</sup> Yang, S.; Liu, Q.; Zhang, G.; Zhang, X.; Zhao, Z.; Lei, P. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 5897–5908.



a) **27** (1,0 eq.), **28** (1,8 eq.),  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,18 eq.), toluène, tamis 4 Å,  $-60^\circ\text{C}$ , 30 min, 96 % ; b) NIS (2,0 eq.), TFA (0,5 eq.),  $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 1 h ; c)  $\text{Cl}_3\text{CCN}$  (6,0 eq.), DBU (0,4 eq.),  $\text{DCM}$ , t.a., 30 min, 87 % sur 2 étapes ; d) 3-(triméthylsilyl)propargyl alcohol (7,6 eq.), TMSOTf (0,3 eq.),  $\text{DCM}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 16 h, 87 % ; e) DDQ,  $\text{DCM}/\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 16 h, 70 % ; f) (2,2,6,6-tétraméthylpiperidin-1-yl)oxyl, BAIB, TBAB,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 4 h ; g)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{DMF}$ , t.a., 16 h, 87 % for two steps ; h)  $\text{AcSH}$ , pyridine, 16 h ; i)  $\text{AcOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 3 h, 47 % sur 2 étapes ; j)  $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$ ,  $\text{DMF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 16 h, 71 % ; k)  $\text{LiOH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ ,  $0^\circ\text{C}$  à t.a., 12 h puis  $\text{NaOH}$ ,  $\text{MeOH}$ , t.a., 12 h, 77 % sur 2 étapes.

**Schéma 9** : Synthèse des disaccharides de CS-E par Zhao *et al.*<sup>87,88</sup>

Le dendrimère PAMAM a été fonctionnalisé avec des groupements azide en bout de chaîne (*Schéma 10*). Plusieurs générations de plateformes ont été préparées (G2 à G5) *via* CuAAC et donc 16, 32, 64 ou 128 conjugaisons pouvaient être réalisées. Cependant, le couplage n'a jamais été complet et seulement 2, 5, 24 et 104 sucres ont été obtenus sur les glycodendrimères finaux (déterminé par RMN  $^1\text{H}$ ).<sup>88</sup>



Préparation de la plateforme : NHS (1,1 eq./ $\text{NH}_2$ ), DIPEA (2,0 eq./ $\text{NH}_2$ ), DMSO, 16 h.

Conditions de CuAAC : **30** (1,2 eq./ $\text{N}_3$ ),  $\text{CuSO}_4$  (0,05 eq./ $\text{N}_3$ ), TBTA (0,1 eq./ $\text{N}_3$ ), NaAsc (0,1 eq./ $\text{N}_3$ ),  $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$  t.a., 16 h.

**Schéma 10** : Synthèse de glycodendrimères de CS-E par l'équipe de Zhao.<sup>87</sup>

<sup>88</sup> Yang, S.; Zhang, H.; Liu, Q.; Sun, S.; Lei, P.; Zhao, Z.; Wu, L.; Wang, Y. *Future Medicinal Chemistry* **2019**, *11*, 1403–1415.

Le potentiel inhibiteur de ces dendrimères dans la voie de signalisation d'une protéine (NF- $\kappa$ B) impliquée dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire a été étudiée. Il est apparu que les générations 2 et 3 n'ont pas influé sur l'activation de NF- $\kappa$ B contrairement aux générations 4 et 5 qui ont montré un fort potentiel d'inhibition.<sup>88</sup>

#### *B- GLYCOPOLYMERES DE CS PAR L'EQUIPE DE HSIEH-WILSON*

Dès 2008, l'équipe de Hsieh-Wilson a débuté la synthèse d'objets multivalents de CS. Des di- et tétrasaccharides de CS-E ou non-sulfatés ont été synthétisés. Comme on peut le voir sur le *Schéma 11*, la synthèse débute par une glycosylation entre deux synthons monosaccharidiques préalablement préparés en 7 étapes chacun.<sup>89</sup> L'amine caractéristique de GalN a été protégée par un groupement trichloroacétyle (TCA) et les futures positions à sulfater ont été protégées par un *p*-méthoxybenzylidène (*p*MP). De plus, la position 4 de GlcA a été protégée par un éther silylé et la glycosylation entre les monosaccharides **33** et **34** a pu être réalisée. Après activation du disaccharide **35** par le trichloroacétonitrile et le DBU, l'oléfine cyclique (*cis*-cyclooctène ou norbornène) nécessaire pour la métathèse polymérisante (ROMP) a pu être introduite. Les hydroxyles en position 4 et 6 de GalNAc n'ont été libérés qu'après polymérisation (pour des questions de solubilité) puis sulfatés. 23 étapes ont donc été nécessaires pour atteindre les composés **39** et **40a-b**. Cette méthode a permis d'obtenir des CS multivalents avec un haut degré de polymérisation (39 à 80, déterminé par RMN <sup>1</sup>H et par chromatographie par perméation de gel) et de bons rendements. Des tests biologiques ont montré que le polymère de tétrasaccharide de CS-E était un bon mime du polymère naturel puisqu'il inhibait la croissance des neurones de l'hippocampe.<sup>90,91</sup>

<sup>89</sup> Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7736–7737.

<sup>90</sup> Rawat, M.; Gama, C. I.; Matson, J. B.; Hsieh-Wilson, L. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2959–2961.

<sup>91</sup> Lee, S.-G.; M. Brown, J.; J. Rogers, C.; B. Matson, J.; Krishnamurthy, C.; Rawat, M.; C. Hsieh-Wilson, L. *Chemical Science* **2010**, *1*, 322–325.



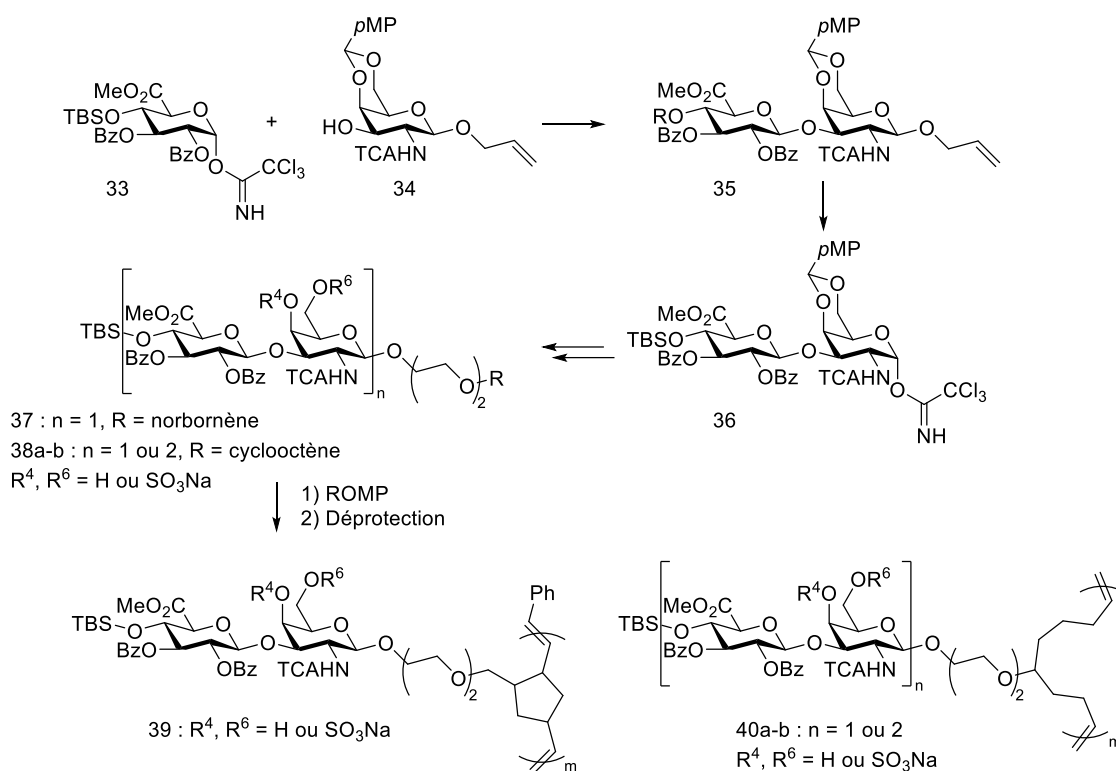


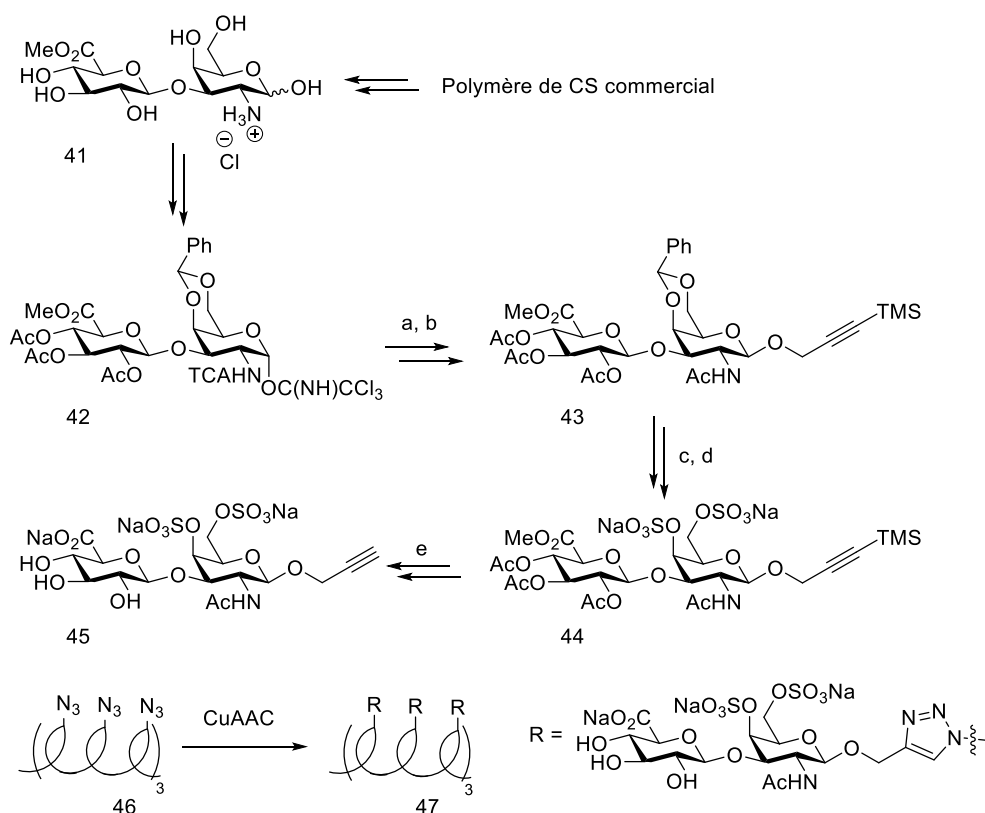
**Schéma 11** : Synthèse des oligosaccharides de CS-E par Hsieh-Wilson *et al.*<sup>90,91</sup>

### C- GLYCOPEPTIDES DE CS-E PAR L'ÉQUIPE DE LEE

L'équipe de Lee s'est intéressée aux plateformes à base de peptides de polyproline. Ces plateformes ont été fonctionnalisées avec un groupement azide en bout de chaîne. Dans ce cas, l'oligosaccharide présenté doit contenir un alcyne terminal pour réaliser une CuAAC. Les disaccharides de CS-E ont ainsi été préparés en utilisant une méthodologie d'hémisynthèse développée au laboratoire par Jean-Claude Jacquinet et Chrystel Lopin-Bon à partir de polymère de CS commerciaux. Une hydrolyse acide permet d'obtenir un disaccharide désulfaté et *N*-désacétylé en seulement 3 étapes. L'amine a ensuite été protégée avec un groupement trichloroacétylé (TCA) et un acétal benzylidène est utilisé pour protéger les positions 4 et 6 de la D-GalN pour les futures sulfatations.<sup>92</sup> La position anomère a ensuite été activée sous forme de trichloroacétimidate pour introduire un groupement 3-triméthylsilylpropargyle. Suite à cette glycosylation, l'amine a été déprotégée puis acétylée et le benzylidène a été déprotégé permettant la *O*-sulfatation de ces positions. La déprotection a permis d'atteindre le composé désiré **45**. La synthèse du CS-E *via* cette méthode se fait en 12 étapes.

<sup>92</sup> Vibert, A.; Lopin-Bon, C.; Jacquinet, J.-C. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 9561–9578.

Finalement, les disaccharides ont été couplés *via* CuAAC en présence de CuI, TBTA et DIPEA dans le DMSO pour donner les composés multivalents (*Schéma 12*).<sup>93</sup>



**Synthèse de 45 :** a) 3-TMS propargyl alcohol (5,0 eq.), TMSOTf (0,2 eq.), DCM, -78 à -15 °C, 2 h, 61 % ; b) AIBN (0,5 eq.), BU<sub>3</sub>SnH (10,0 eq.), toluène, 80 °C, 4 h, 91 % ; c) AcOH-H<sub>2</sub>O 4/1, 80 °C, 30 min puis TBAF (1,3 eq.), 0 °C, 1 h 30, 53 % sur 2 étapes ; d) SO<sub>3</sub>.NMe<sub>3</sub> (25,0 eq.), DMF, 50 °C, 16 h, 82 % ; e) LiOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, THF/H<sub>2</sub>O, 0 °C à t.a., 12 h puis NaOH, MeOH, t.a., 12 h, 91 % sur 2 étapes.

**Conditions de CuAAC :** 45 (1,3 eq./azide), CuI (0,3 mol%/azide), TBTA (0,3 eq./azide), DIPEA (48 eq.), DMSO, t.a., 7 j.

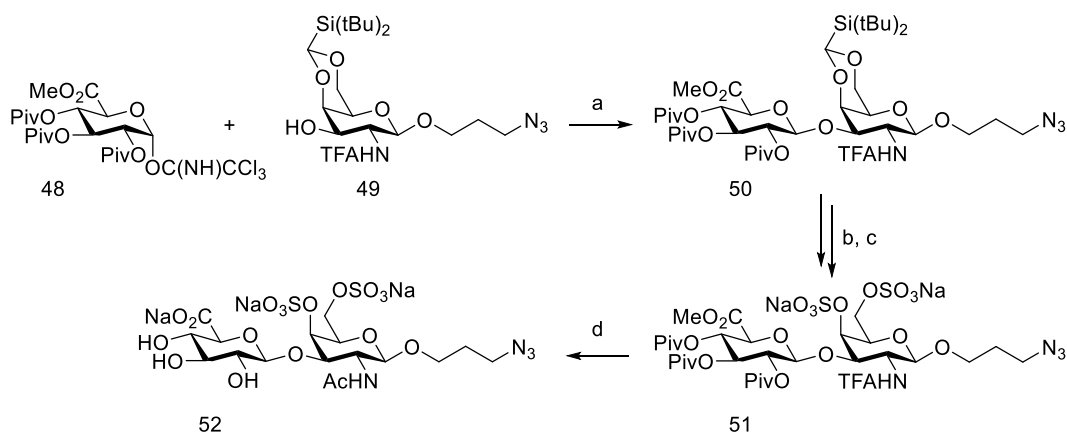
**Schéma 12 :** Synthèse de glycopeptides de disaccharides de CS-E par l'équipe de Lee.<sup>92,93</sup>

L'activité de ces glycopeptides a été évaluée vis-à-vis d'une voie de signalisation intervenant dans la survie des neurones (NGF/TrkA). Ces études ont alors montré que, parmi les 7 composés synthétisés, les disaccharides non-sulfatés multivalents ne montrent aucune activité et, parmi les 5 restants, l'un d'eux (celui qui présente tous les CS-E sur une seule face de l'hélice du peptide) sort du lot montrant une activité très intéressante aussi bien dans les prédictions de modèle moléculaires que dans les cultures cellulaires. Ce composé semble donc être un bon agent de stimulation neuronale intervenant sélectivement dans la voie de signalisation ciblée ce qui pourrait permettre d'imaginer une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter des maladies neurodégénératives.<sup>93</sup>

<sup>93</sup> Liu, P.; Chen, L.; Toh, J. K. C.; Ang, Y. L.; Jee, J.-E.; Lim, J.; Lee, S. S.; Lee, S.-G. *Chem. Sci.* **2014**, *6*, 450–456.

#### D- GLYCOCLUSTERS DE CS-E PAR L'EQUIPE DE DE PAZ

Dès 2017, l'équipe de de Paz a synthétisé une librairie de glycoclusters de disaccharides de CS-E uniquement synthétisé à partir de deux synthons monosaccharidiques (*Schéma 13*). La synthèse de l'accepteur **49** protégé par un groupement trifluoroacétyl et un di-*tert*-butyl silylène (DTBS) et présentant un azide terminal sur l'aglycone a nécessité 7 étapes. Le donneur GlcA **48** a, quant à lui, été protégé sous forme d'esters pivaloates (Piv) à partir de l'acide glucuronique et a été préparé en 4 étapes. Après glycosylation, le DTBS a pu être déprotégé afin de réaliser la disulfatation du produit. Finalement, une déprotection a été réalisée pour obtenir le composé **52**. Leur méthode comporte 15 étapes pour obtenir le disaccharide et une étape supplémentaire pour obtenir le composé multivalent.<sup>94</sup>



a) **48** (1,5 eq.), **49** (1,0 eq.), TMSOTf (0,2 eq.), DCM, tamis 4 Å, 0 °C, 30 min, 80 % ; b) excès de (HF)n.Py, THF, 0 °C, 20 h, 95 % ; c) SO<sub>3</sub>.NMe<sub>3</sub> (20,0 eq.), DMF, 100 °C, MW, 30 min, 85 % ; d) LiOH 0,7 M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %, THF, 0 °C à t.a., 24 h puis NaOH 4 M, MeOH./H<sub>2</sub>O, t.a., 36 h puis Ac<sub>2</sub>O (20,0 eq), Et<sub>3</sub>N (13,0 eq.), MeOH./H<sub>2</sub>O, t.a., 2 h, 73 %.

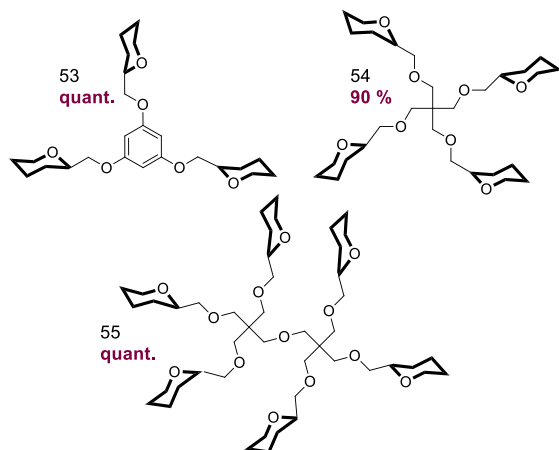
**Schéma 13** : Synthèse du disaccharide de CS-E réalisée par l'équipe de De Paz.<sup>94</sup>

Une première génération de composés a été synthétisée *via* CuAAC avec une valence de 3, 4 ou 6 (*Schéma 14*, violet).<sup>94</sup> En 2020, une seconde génération de composés a été préparée dans les mêmes conditions de réaction. Cela a pu être réalisé grâce à l'utilisation du dendron trivalent **56** avec lequel une première cycloaddition est effectuée. Ce dendron **58** est ensuite greffé aux mêmes plateformes utilisées pour la première génération permettant ainsi d'obtenir 9, 12 et 18 disaccharides sur les composés finaux (*Schéma 14*, bleu).<sup>95</sup>

<sup>94</sup> Domínguez-Rodríguez, P.; Reina, J. J.; Gil-Caballero, S.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23*, 11338–11345.

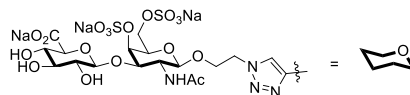
<sup>95</sup> Domínguez-Rodríguez, P.; Vivès, C.; Thepaut, M.; Fieschi, F.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 2726–2734.

### 1ère génération

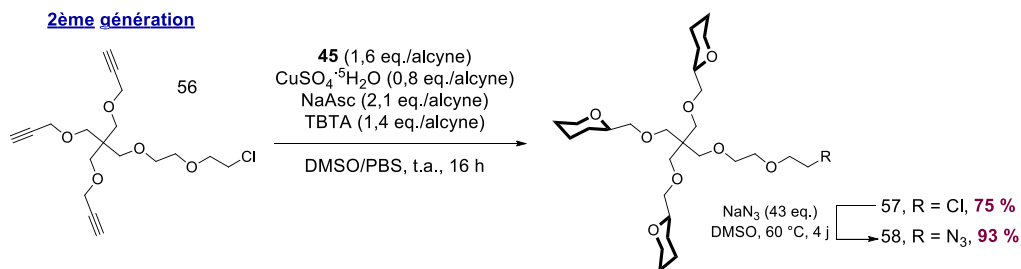


#### Conditions de CuAAC :

52 (1,2-1,6 eq./alcyne)  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (1,0-1,2 eq./alcyne)  
 NaAsc (3,0-3,6 eq./alcyne)  
 TBTA (2,0-2,4 eq./alcyne)  
 DMSO/PBS, t.a., 16 h



### 2ème génération



puis

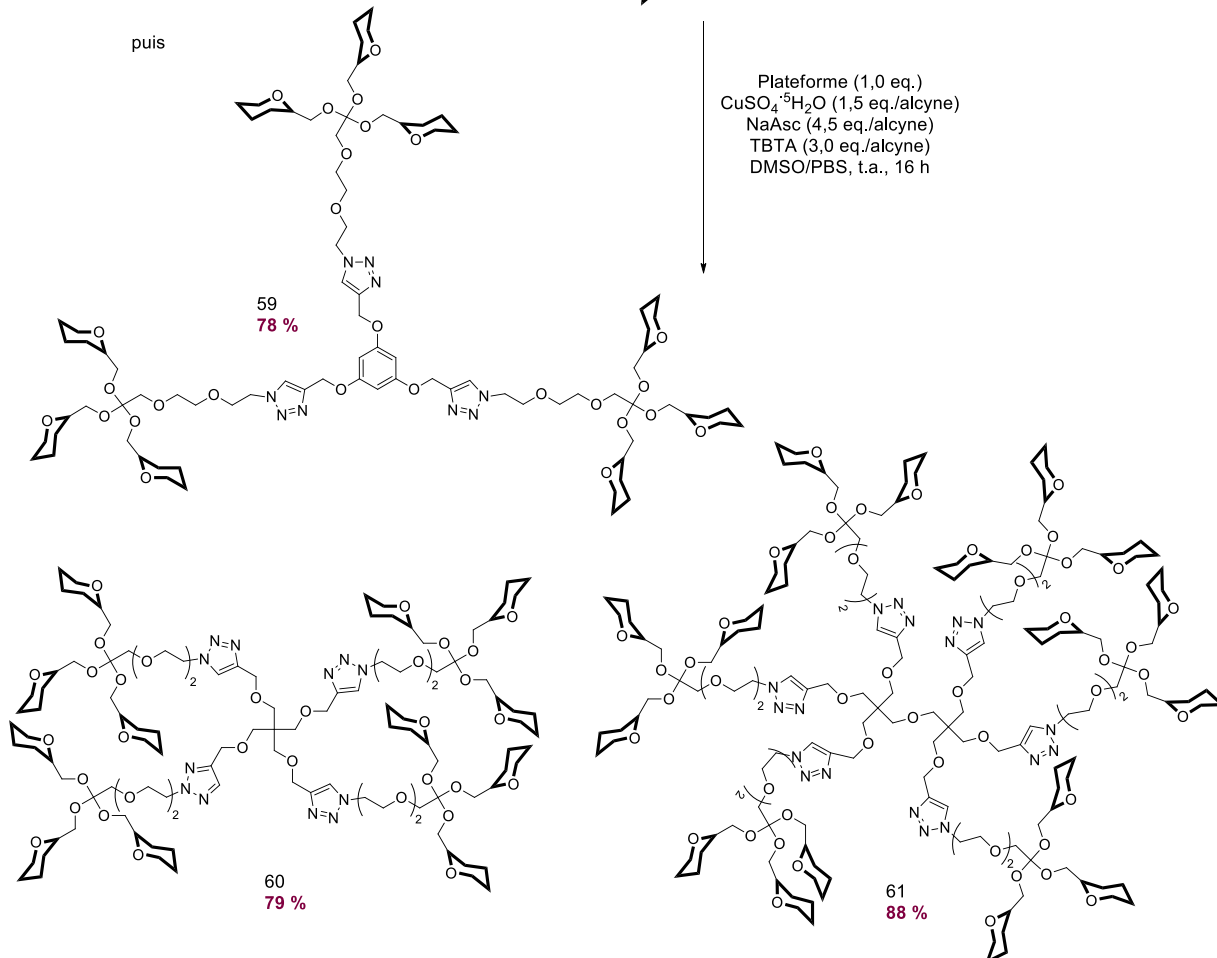
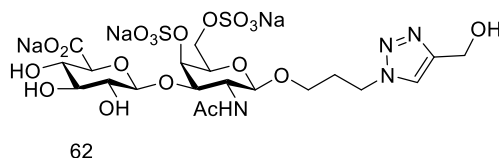


Schéma 14 : Glycoclusters de CS-E de génération 1 et 2 synthétisés par l'équipe de De Paz.<sup>94,95</sup>

Des évaluations biologiques ont été effectuées sur la langérine, une lectine transmembranaire impliquée dans les infections virales, qui interagit naturellement avec les GAGs dont l'héparine et les CS-E. Ils ont alors pu démontrer que les multivalents présentaient une meilleure affinité ( $IC_{50}$  faible) pour le récepteur que le monovalent **62** (de l'ordre du  $\mu M$  au lieu de mM) et que la seconde génération semble plus intéressante que la première ( $10^{-1}$  M de différence) (*Tableau 2*).<sup>95</sup>



| Type de plateforme    | /         | Aromatique |           | Aliphatique |           |           |           |
|-----------------------|-----------|------------|-----------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| Composé               | <b>62</b> | <b>53</b>  | <b>59</b> | <b>54</b>   | <b>60</b> | <b>55</b> | <b>61</b> |
| Valence               | 1         | 3          | 9         | 4           | 12        | 6         | 18        |
| $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) | 1397      | 45,8       | 8,7       | 81,3        | 9,2       | 112,2     | 19,8      |

**Tableau 2** : Valeurs d' $IC_{50}$  obtenus par l'équipe de De Paz sur la langérine.<sup>95</sup>

L'activité des composés de la première génération **53-55** a également été étudiée vis-à-vis d'un facteur de croissance appelé midkine. Là encore, les multivalents ont présenté de bien meilleurs résultats par rapport au monovalent **62** et c'est le composé hexavalent **55** qui a montré la meilleure valeur d' $IC_{50}$ .<sup>94</sup>

En résumé, il existe peu d'exemples de CS multivalents et nous retrouvons principalement des exemples avec des disaccharides et un seul exemple avec un tétrasaccharide. Il n'existe à notre connaissance aucun exemple de CS-A ou -C. En effet, ces oligosaccharides sont soit di-sulfatés en position 4 et 6 de la galactosamine, soit non-sulfatés. Deux méthodes de couplage sont utilisées : la métathèse polymérisante ROMP ou bien la CuAAC. Enfin, différentes plateformes sont utilisées : des peptides, des dendrimères, des polymères ou bien des plateformes « simples » aliphatiques et aromatiques.

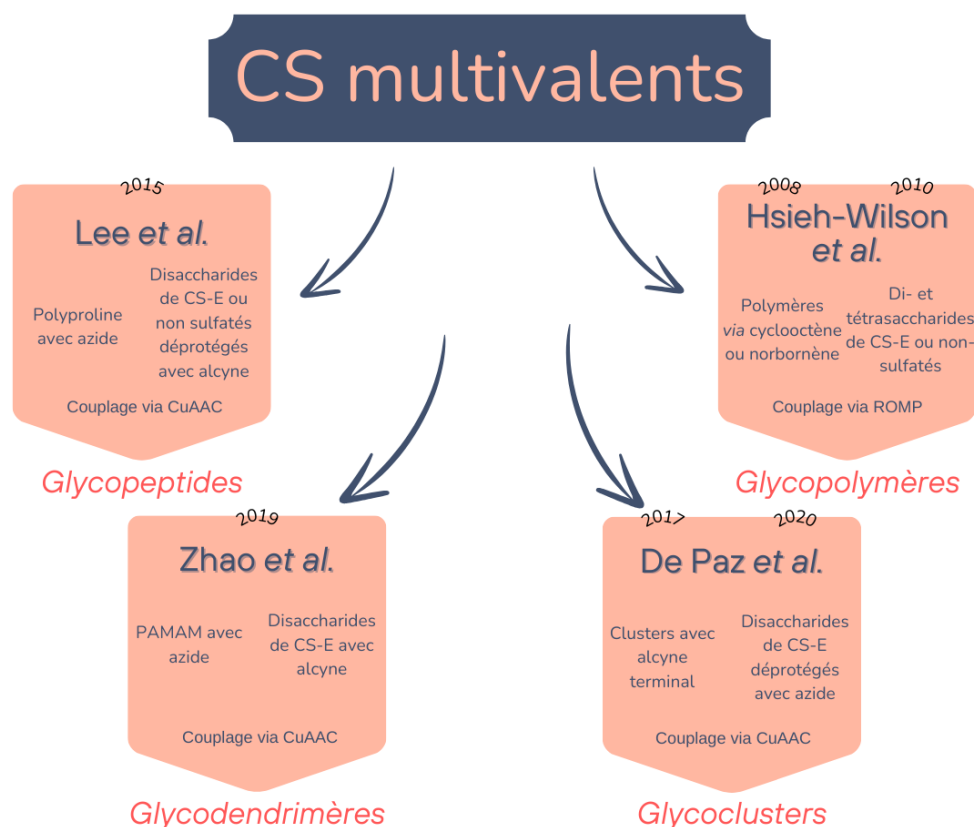


**Figure 25 :** Résumé des CS multivalents synthétisés par différentes équipes.<sup>87-95</sup>

Finalement, notre stratégie reposera sur le greffage d'oligosaccharides de CS-A, -C, -E et non-sulfatés déprotégés portant un groupement azide en aglycone sur des plateformes portant un alcyne terminal *via* CuAAC.

# Résultats et Discussion





Afin d'accéder aux oligosaccharides de CS multivalents, la synthèse d'une librairie d'oligosaccharides (du di- à l'hexasaccharide) non sulfatés ou sulfatés en position 4 et/ou 6 de la D-GalN et possédant un bras azidopropyle en aglycone est nécessaire. La stratégie de greffage choisie étant la cycloaddition de Huisgen avec des sucres déprotégés, ces oligosaccharides seront déprotégés.

Les tétra- et hexasaccharides déprotégés **73** seront obtenus à partir des oligosaccharides protégés **72** (*Schéma 15*). Les groupements protecteurs orthogonaux chloroacétates (AcCl) permettront de masquer temporairement les futures positions à sulfater. L'ester lévulinoate (Lev) permettra, quant à lui, de protéger sélectivement la position 4 pour ensuite réaliser l'élongation de la chaîne du côté non réducteur. Les groupements benzoyles seront choisis pour protéger les autres hydroxyles et l'amine sera protégée par un groupement trifluoroacétyle (TFA). Les oligosaccharides **72** seront préparés par glycosylation séquentielle entre un bloc donneur activé sous forme de trichloroacétimide **70** et un bloc accepteur **71** porteur d'un hydroxyle libre en position 4 du D-GlcA et du bras azidopropyle désiré en position anomère. Ce bloc accepteur proviendra du bloc donneur **70** qui découlera lui-même du diol **69** obtenu à partir du disaccharide **68** possédant un benzylidène qui permettra de différencier les position 4 et 6 de la D-GalN et un naphthylméthyle comme aglycone. Ce bloc intermédiaire **68** sera obtenu à partir du disaccharide activé sous forme de trichloroacétimide **64**. Celui-ci proviendra du composé acétylé **63** qui proviendra lui-même du disaccharide non-protégé estérifié au niveau de l'acide glucuronique **41** obtenu par hémisynthèse à partir d'un polymère de CS commercial.

Le bloc **64** est un bloc clé qui permettra également d'obtenir la série des disaccharides non sulfaté **65** et sulfatés **52**, **66** et **67** après déprotection sélective du benzylidène, sulfatation et déprotection.

Tout d'abord, nous verrons la synthèse des disaccharides **52**, **65**, **66**, **67**, déjà explorée précédemment par le Dr. Pierre Buisson dans sa thèse. Ensuite, nous nous pencherons sur la synthèse des tétrasaccharides.

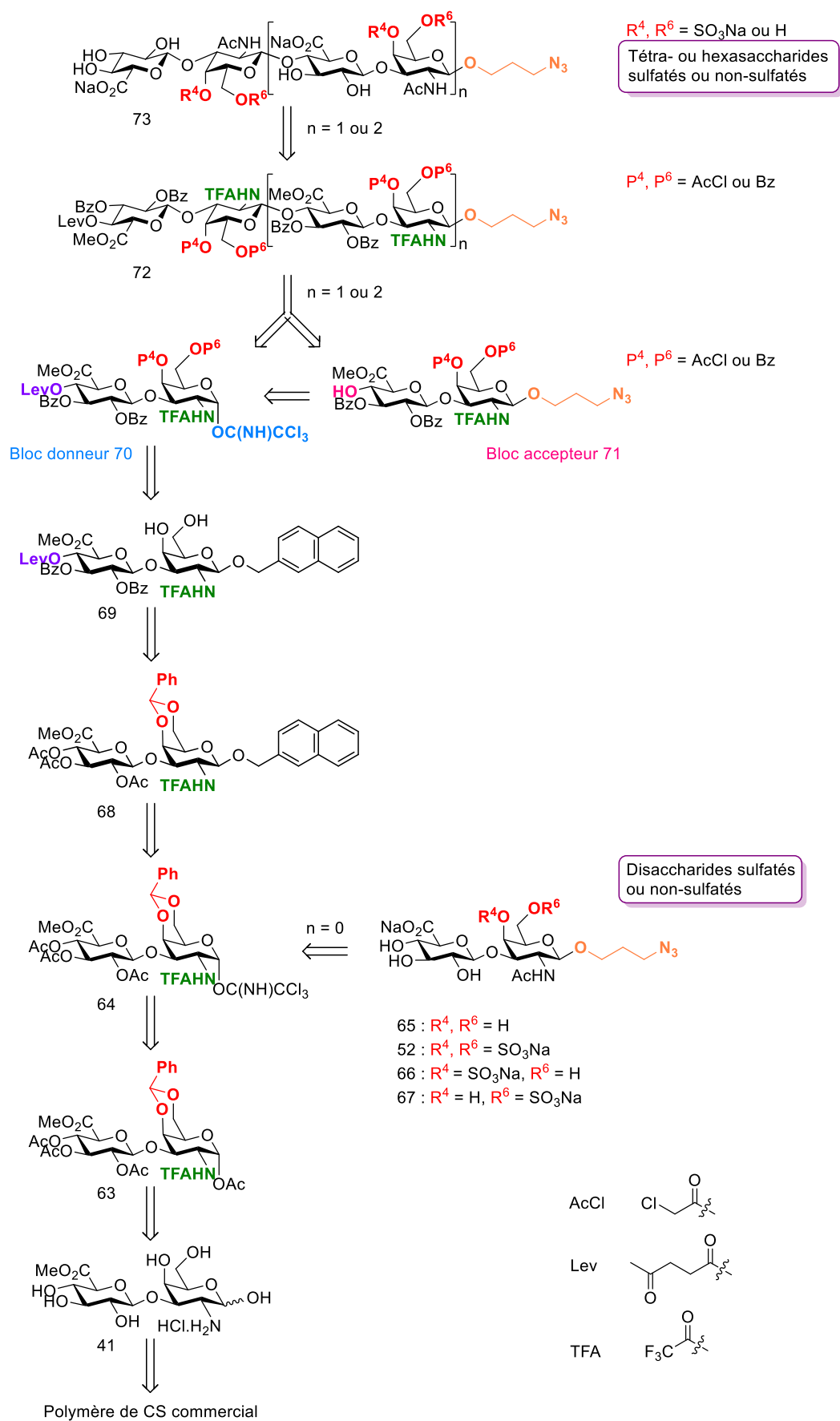


Schéma 15 : Rétrosynthèse générale des oligosaccharides de sulfates de chondroïtine envisagés.

---

# SYNTHESE DES DISACCHARIDES DE CS

Afin d'obtenir les disaccharides diversement sulfatés ou non, la synthèse du disaccharide clé **64** est nécessaire. Pour rappel, ce composé **64** provient d'un bloc intermédiaire **63** lui-même issu de la protection du disaccharide **41**. Ce dernier est obtenu sous la forme de chlorhydrate d'ammonium par hémisynthèse à partir d'un polymère de CS commercial.

## 1. SYNTHESE DU DISACCHARIDE CLE **64**

### 1.1. HEMISYNTHESE ET SYNTHESE DU DISACCHARIDE **41**

Le procédé d'hémisynthèse utilisé existe depuis une vingtaine d'années au laboratoire.<sup>96</sup> En partant d'un polymère de CS commercial, majoritairement sous forme CS-A (4-sulfaté), obtenu par extraction de trachées de bœuf, le disaccharide **41** est obtenu sous la forme de chlorhydrate d'ammonium (*Schéma 16*). La première étape consiste en un échange acide à l'aide de résine Amberlite IR-120 [H<sup>+</sup>] pour transformer les carboxylates et les sulfates en leurs formes protonées. Ensuite, une hydrolyse acide dans de l'acide sulfurique à 100 °C suivie d'une purification sur résine Amberlite IR-120 [H<sup>+</sup>] donne le disaccharide **76** sous sa forme hémiacétal. A partir d'un polymère hétérogène en termes de taille et de degré de sulfatation, on obtient ainsi un disaccharide désulfaté avec l'amine de la GalN libre. Enfin, l'acide carboxylique du GlcA est estérifié dans le méthanol en présence de chlorure d'acétyle pour donner le composé **41**.

Cette stratégie comporte de nombreux avantages. En effet, elle est peu coûteuse (310 € pour 250 g de polymère chez Biosynth), simple et se fait sur grosse échelle : 50 g de produit de départ permettent d'obtenir de 20 à 30 g du composé **41** en 3 étapes seulement et en deux semaines sans purification. Cependant, l'efficacité de cette synthèse repose sur la pureté (assez aléatoire) du lot de polymère utilisé qui est particulièrement rare puisqu'on ne le trouve que chez un seul fournisseur actuellement.

---

<sup>96</sup> Lopin, C. ; Jacquinet, J.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2574-2578.

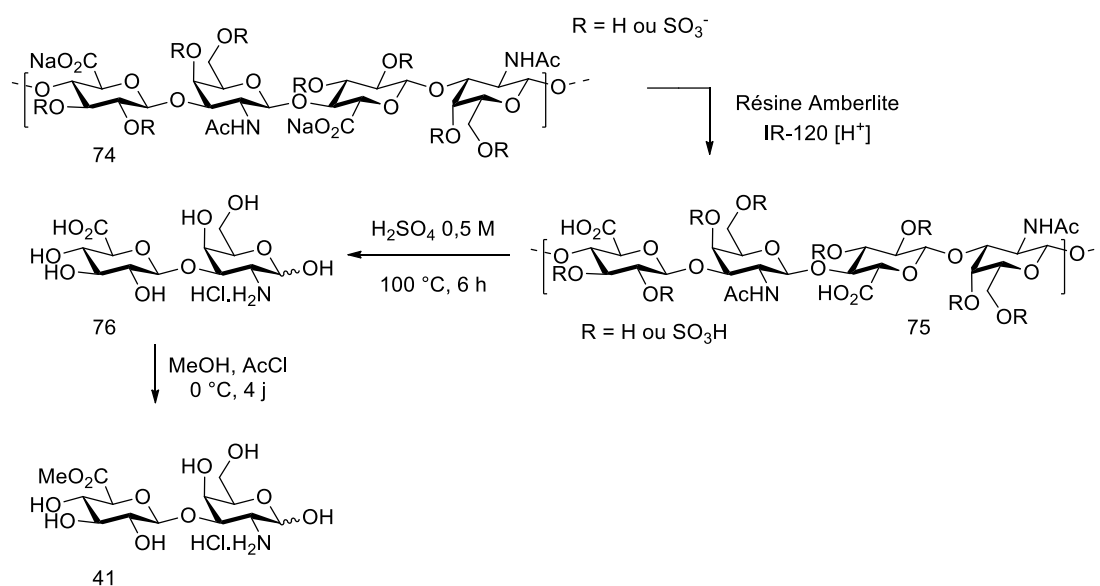


**Schéma 16** : Stratégie de l'hémisynthèse.

## 1.2. SYNTHÈSE DU DISACCHARIDE PROTÉGÉ **63**

Afin d'accéder au disaccharide **63**, la protection de l'amine a d'abord été réalisée. Le groupement protecteur de l'amine choisi va jouer un rôle sur le stéréocontrôle lors des futures glycosylations. Si on reprend le mécanisme de glycosylation simplifié, la liaison formée à la suite de cette réaction peut être soit en 1,2-*cis* soit en 1,2-*trans* puisque l'attaque de l'alcool peut avoir lieu sur les deux faces de l'ion oxocarbénium. Le substituant installé en C-2 de la GalN permet de contrôler/orienter la stéréosélectivité de la réaction. En effet, un groupement participant tel qu'un ester ou un amide permet d'obtenir des liaisons 1,2-*trans* par assistance anchimérique. Sans cette participation, la liaison 1,2-*cis* est largement favorisée car elle est stabilisée par effet anomère (*Schéma 17*).

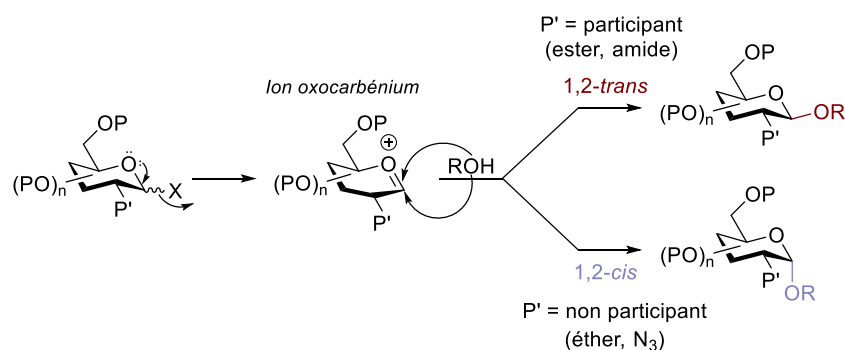


**Schéma 17** : Mécanisme de glycosylation (version simplifiée).

Le polymère naturel de CS ne comporte que des liaisons interglycosidiques 1,2-*trans*. Il est donc nécessaire d'introduire un groupement participant sur l'amine (soit un amide) qui va permettre de contrôler la stéréosélectivité lors des différentes glycosylations, que ce soit pour l'introduction du bras azidopropyle ou pour la formation de liaisons inter-glycosidiques (*Schéma 18*).

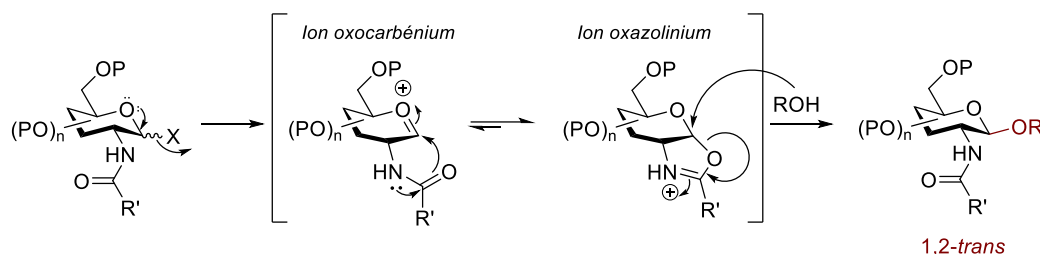


**Schéma 18** : Mécanisme de glycosylation avec présence d'un groupe participant de type amide en C2.

Il serait possible de garder la fonction *NH*-acétyle présente à l'état naturel mais cela n'est pas intéressant dans notre cas puisqu'une oxazoline intermédiaire qui ne s'ouvre qu'en présence de nucléophiles forts serait formée. Or, dans notre cas, l'acide glucuronique est un mauvais nucléophile donc un accepteur peu réactif. Une oxazoline intermédiaire réactive est donc nécessaire. Dans cette optique, le trichloroacétyle (TCA,  $R' = CCl_3$ ) est couramment utilisé au laboratoire.<sup>91,97</sup> Cependant, sa déprotection en conditions réductrices (Zn/Cu ou  $Bu_3SnH$ , AIBN) n'est pas compatible avec la présence d'un groupement azide sur l'aglycone puisqu'elle entraîne également sa réduction en amine.<sup>98</sup> C'est pourquoi le Dr. Buisson a travaillé pendant sa thèse sur l'introduction d'un groupement protecteur différent, le trifluoroacétyle (TFA,  $R' = CF_3$ ).<sup>99</sup> Celui-ci se déprotège en conditions basiques, ce qui est compatible avec le groupement azide. En partant du chlorhydrate d'ammonium **41** issu de l'hémisynthèse (non purifié), la *N*-trifluoroacétylation est réalisée avec du trifluoroacétate d'éthyle en présence de triéthylamine dans du méthanol pendant 24 h pour donner le composé **77** (*Schéma 19*).

L'amine protégée, il reste à protéger les hydroxyles libres afin d'obtenir le composé entièrement protégé **63**. L'utilisation d'un acétal benzylidène permet de bloquer le cycle de la GalN sous forme pyranose mais également d'envisager une déprotection sélective des positions 4 et 6 de GalN par la suite. Cette réaction est réalisée avec du benzaldéhyde en présence d'acide trifluoroacétique pendant 24 h. Enfin, les alcools restants sont protégés sous forme d'acétates avec de l'anhydride acétique dans un mélange pyridine/DCM pendant 24 h pour obtenir le composé **63** principalement sous la forme  $\alpha$ -

<sup>97</sup> Blatter, G.; Beau, J.-M.; Jacquinet, J.-C. *Carbohydr. Res.* **1994**, *260*, 189-202.

<sup>98</sup> a) Kobayashi, D.; Ueki, A.; Yamaji, T.; Nagao, K.; Imamura, A.; Ando, H.; Kiso, M.; Ishida, H. *Molecules* **2016**, *21*, 614. ; b) Vermote, A.; Brackman, G.; Risseuw, M. D. P.; Coenye, T.; Van Calenbergh, S. *Eur J Med Chem* **2017**, *127*, 757-770.

<sup>99</sup> Thèse de Pierre Buisson, Université d'Orléans, **2022**.

D-pyranose. Ces trois étapes se font de manière séquentielle et une seule purification finale permet de s'affranchir de toutes les impuretés accumulées depuis le début de cette synthèse.<sup>100</sup> En partant des 28 g non purifiés obtenus à la fin de l'hémisynthèse, jusqu'à 25 g de produit **63** peuvent être obtenus (Schéma 19).

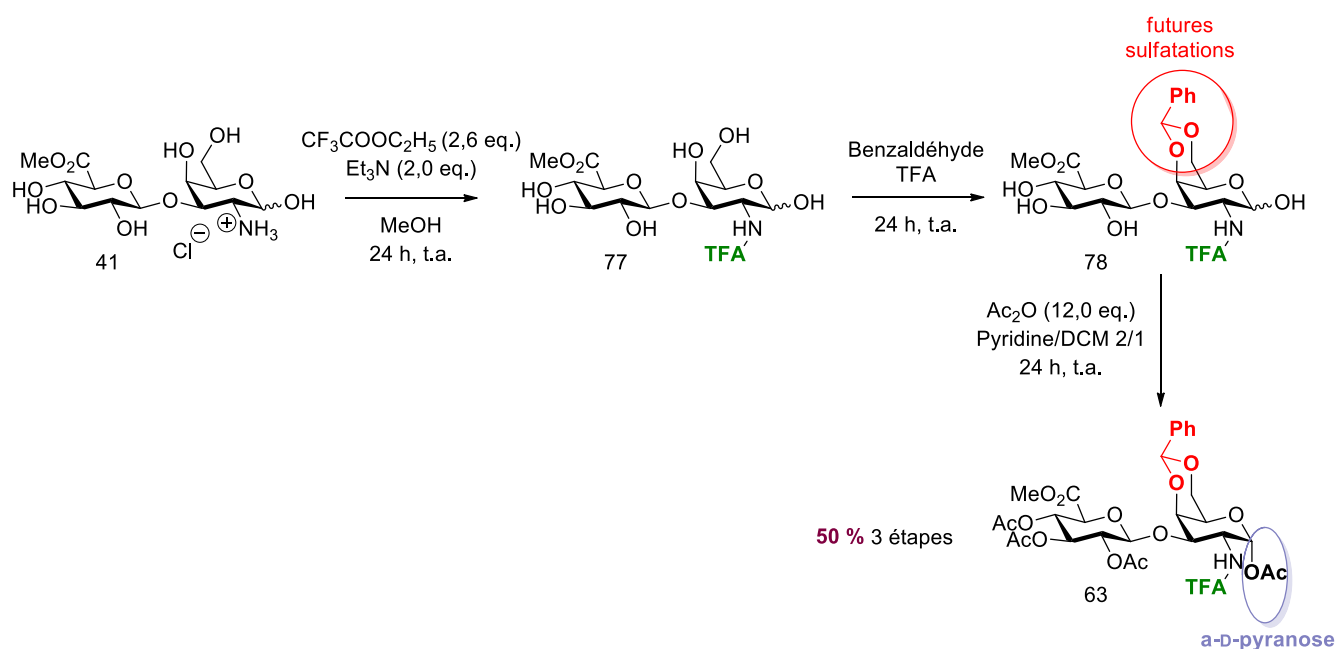


**Schéma 19** : N-trifluoroacétylation et protection des hydroxyles.

Ce disaccharide **63** protégé est un précurseur clé dans la synthèse des futurs oligosaccharides diversement sulfatés.

### 1.3. SYNTHÈSE DE L'IMIDATE **64**

Pour réaliser la glycosylation, la position anomère doit être activée afin d'obtenir un disaccharide donneur. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le trichloroacétimidate, communément utilisé au laboratoire.<sup>101</sup>

Ainsi, à partir du disaccharide **63**, l'hydroxyle anomère est libéré sélectivement avec de l'acétate d'hydrazine dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF) pour donner l'hémiacétal correspondant.<sup>102</sup> Par la suite, le trichloroacétonitrile est utilisé en excès en présence d'une quantité catalytique de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU) dans du dichlorométhane (DCM) afin d'obtenir le donneur

<sup>100</sup> Buisson, P.; Treuillet, E.; Schuler, M.; Lopin-Bon, C. *Carbohydr. Res.* **2022**, 512, 108514.

<sup>101</sup> Schmidt, R. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 25, 212–235.

<sup>102</sup> Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Utile, J.-P. *Carbohydr. Res.* **1975**, 39, 368–373.

activé **64** avec 71 % de rendement sur 2 étapes (Schéma 20). Ce composé est de stéréochimie  $\alpha$  comme le confirme la RMN  $^1\text{H}$  avec la constante de couplage  $^3J_{\text{H1-H2}}$  égale à 3,5 Hz.<sup>101</sup>

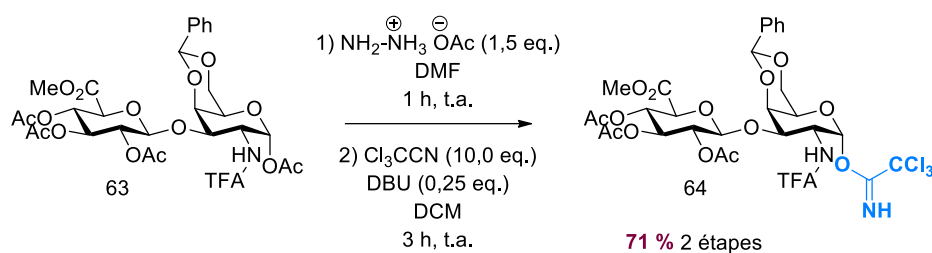


Schéma 20 : Synthèse du trichloroacétimide **64**.

## 2. SYNTHÈSE DES DISACCHARIDES DE CS DIVERSEMENT SULFATES OU NON

La synthèse des disaccharides a été explorée par le Dr. Buisson. Celle-ci a dû être reprise lors de cette thèse dans le but d'avoir suffisamment de chacun des motifs pour réaliser les différents tests de CuAAC que nous verrons en dernière partie.

### 2.1. INTRODUCTION DE L'AGLYCONE AZIDOPROPYLE

Cette glycosylation a pu être réalisée en présence de diéthyléthérate de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) comme acide de Lewis dans le DCM anhydre à  $-60^\circ\text{C}$ . Ces conditions sont nécessaires pour obtenir l'anomère  $\beta$ . En effet, même en présence du groupement participant en C-2 de la GalN, le benzylidène crée de l'encombrement stérique au niveau de la face supérieure lors de l'attaque du nucléophile. L'utilisation d'un acide de Lewis doux à basse température permet à l'imide **64** de réagir selon un mécanisme de type « push-pull » pour donner le composé **79** avec une sélectivité 1,2-*trans*. L'introduction de l'aglycone en position  $\beta$  est vérifiable par RMN  $^1\text{H}$  avec la constante de couplage  $^3J_{\text{H1-H2}}$  égale à 9,0 Hz.

Par la suite, une substitution nucléophile de type  $\text{S}_{\text{N}}2$  sur le dérivé bromé **79** avec l'azoture de sodium en excès permet l'introduction du  $\text{N}_3$  sur l'aglycone, donnant le composé **80** avec 85 % de rendement (Schéma 21).

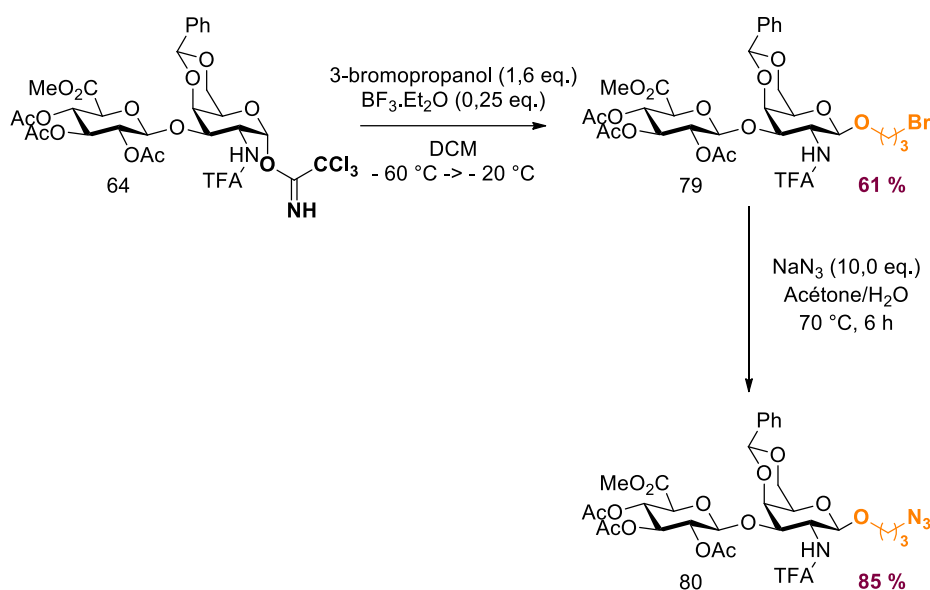


**Schéma 21 :** Glycosylation puis substitution nucléophile pour obtenir le composé **80**.

## 2.2. SULFATATION ET DEPROTECTION DES DISACCHARIDES

Afin d'obtenir les disaccharides diversement ou non-sulfatés, une étape de déprotection du benzylidène est d'abord nécessaire pour libérer les hydroxyles en positions 4 et 6 de la GalN. Celle-ci se réalise dans le DCM avec un mélange TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  3/1 à  $0\text{ }^\circ\text{C}$  pendant 4 h. Le diol **81** est obtenu après précipitation dans l'eau avec 95 % de rendement (*Schéma 22*).

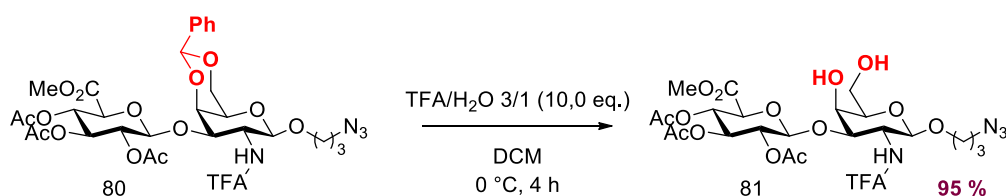


**Schéma 22 :** Déprotection du benzylidène.

A partir de ce diol, nous pouvons atteindre deux objectifs : obtenir le disaccharide non sulfaté déprotégé **65** et obtenir les disaccharides de CS-E, A ou C respectivement **52**, **66** et **67** après sulfatation et déprotection (*Schéma 23*).



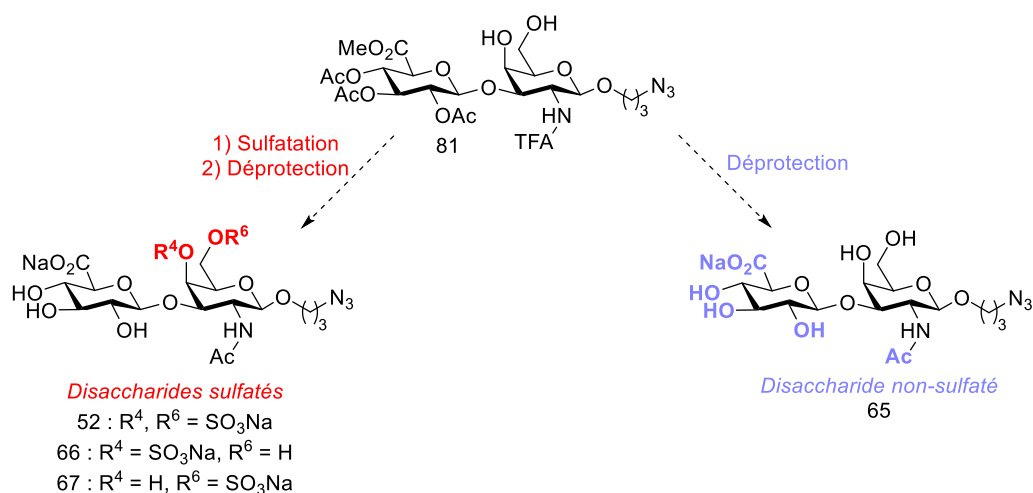


**Schéma 23** : Stratégies envisageables à partir du diol **81** pour obtenir les disaccharides déprotégés.

Pour obtenir le disaccharide non-sulfaté, la déprotection finale se fait en deux étapes. Tout d'abord, l'ester méthylique est déprotégé de manière sélective avec  $LiO_2H$  ( $LiOH + H_2O_2$ ) dans un mélange THF/ $H_2O$ . Puis, les esters sont saponifiés en présence de soude 4M dans un mélange MeOH/ $H_2O$ . Comme un large excès de soude (15,0 eq. par ester) est ajouté, le groupement trifluoroacétyle est également déprotégé à cette étape-ci. Pour finir, une étape de *N*-acétylation est ensuite réalisée afin de retrouver la fonction *NH*-Ac présente dans les CS naturels. Pour ce faire, un excès d'anhydride acétique et de triéthylamine dans un mélange MeOH/ $H_2O$  est utilisé. Un retour à pH = 3.0 est opéré à l'aide de résine Amberlite IR-120  $[H^+]$  puis un échange est réalisé par ajout de soude 0,02M afin d'obtenir le composé souhaité **65** avec le contre-ion d'intérêt, c'est-à-dire le sodium, avec un rendement de 82 % (Schéma 24).

Conditions de déprotection :  $LiO_2H$  (5,0 eq. par  $CO_2Me$ ), THF/ $H_2O$  3/1, 0 °C → t.a., 24 h ; puis NaOH 4M (15,0 eq. par ester), MeOH/ $H_2O$  4/1, t.a., 72 h.

Conditions de *N*-acétylation :  $Ac_2O$  (20,0 eq.),  $Et_3N$  (13,0 eq.) MeOH/ $H_2O$  4/1, 0 °C → t.a., 4 h.

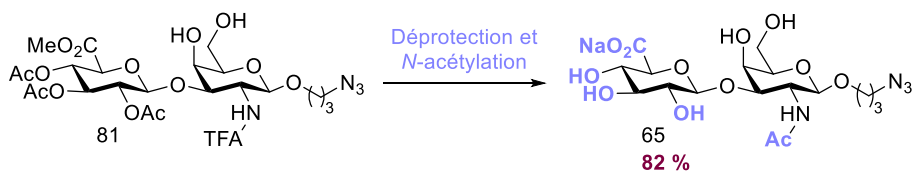


**Schéma 24** : Synthèse du disaccharide non-sulfaté déprotégé **65**.

Le diol **81** permet également d'obtenir les disaccharides 4-sulfaté (CS-A), 6-sulfaté (CS-C) et 4,6-di-sulfaté (CS-E). La réaction de sulfatation se fait, pour chaque motif, à l'aide du complexe de trioxyde de soufre-triméthylamine ( $\text{SO}_3\cdot\text{NMe}_3$ ) dans le DMF en chauffant. Cependant, la quantité de réactif à utiliser ainsi que la température de chauffage diffèrent selon la position à sulfater. Cela s'explique par la différence de réactivité entre l'alcool en C-6 primaire et celui en C-4 secondaire (*Schéma 25*).

Afin de confirmer la mono- ou di-sulfatation, les spectres de masses sont réalisés systématiquement ainsi que les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  afin de vérifier la position des sulfates.

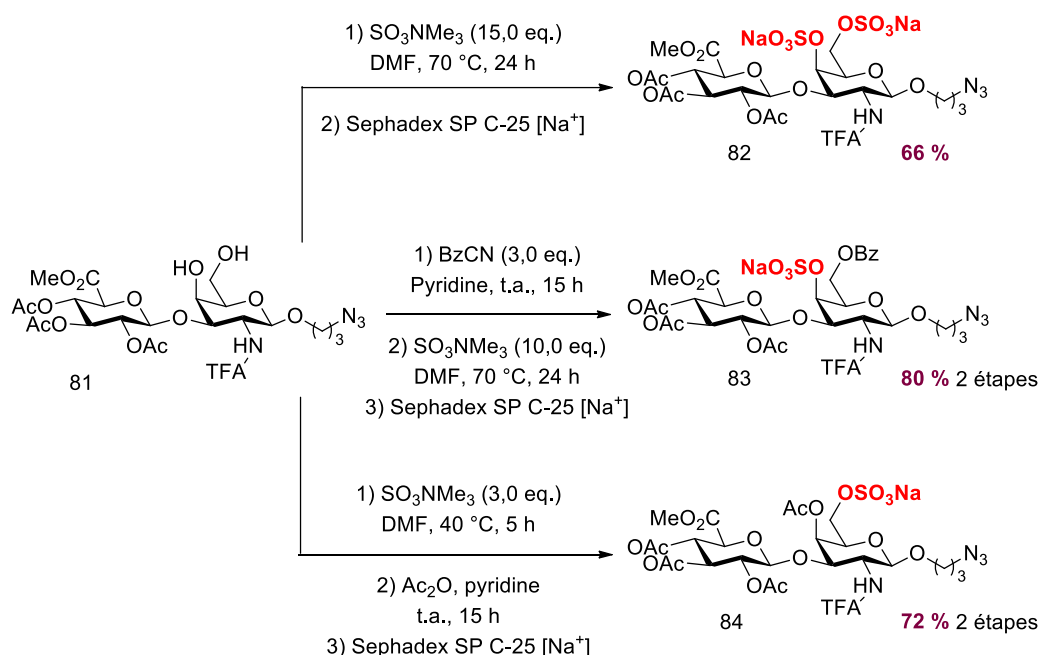


**Schéma 25** : Synthèse des disaccharides 4, 6 et 4,6-sulfatés **82-84**.

Le disaccharide 4,6-disulfaté correspond à la sulfatation des deux hydroxyles libres. Ceci est possible avec un excès de 15.0 eq. de complexe dans le DMF en chauffant à 70 °C pendant 24 h. Afin d'obtenir le composé di-sulfaté pur sous forme d'un sel de sodium, plusieurs colonnes sont réalisées. La première, une colonne Sephadex LH-20 permet d'éliminer l'excès d'agent de sulfatation et le DMF. La seconde, sur silice, permet de purifier le produit. Enfin, l'utilisation de la résine échangeuse d'ions Sephadex SP C-25  $[\text{Na}^+]$  permet d'échanger le contre ion triméthylammonium pour le sodium et donc d'obtenir le disaccharide **82** avec 66 % de rendement (*Schéma 25*). Cette disulfatation peut être facilement observable par RMN du proton  $^1\text{H}$  car les groupements sulfates ont un effet

électroattracteur qui entraîne le déblindage des protons au pied des groupements sulfates tout comme des carbones (Figure 26).

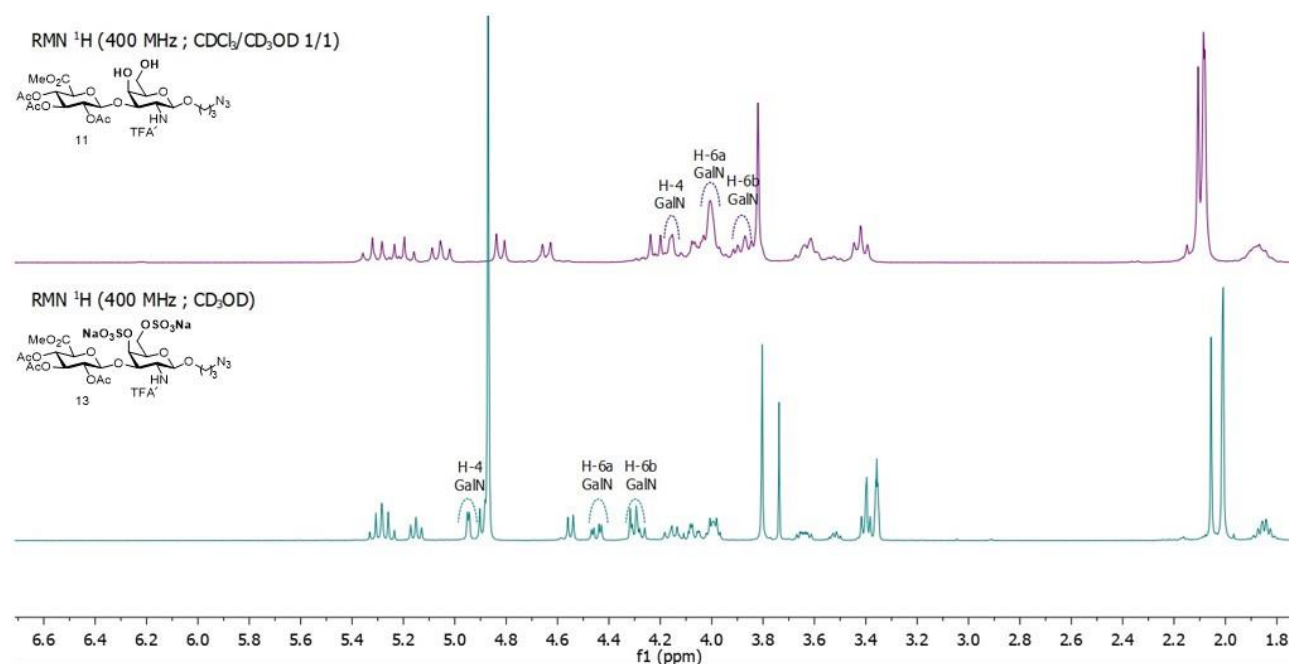


**Figure 26** : Comparaison des spectres de RMN  $^1\text{H}$  du diol **81** et du disaccharide 4,6-OSO<sub>3</sub>Na **82**.

Pour le disaccharide 4-sulfaté, il est nécessaire de protéger au préalable sélectivement l'hydroxyle en position 6. Pour cela, une benzylation régiosélective est réalisée avec le cyanure de benzoyle dans la pyridine.<sup>103</sup> Puis, la sulfatation se fait dans les mêmes conditions que précédemment avec seulement 10.0 eq. de réactif. Le composé **83** est isolé avec 80 % de rendement sur deux étapes (Schéma 25). En comparant avec le composé intermédiaire 6-OBz et 4-OH, on peut observer la sulfatation par RMN  $^1\text{H}$  (Figure 27).

<sup>103</sup> a) Thèse d'Hélène Ledru, Université d'Orléans, 2017. ; b) Li, T.; Li, T.; Sun, Y.; Yang, Y.; Lv, P.; Wang, F.; Lou, H.; Schmidt, R. R.; Peng, P. *Org. Chem. Front.* 2020, 8.

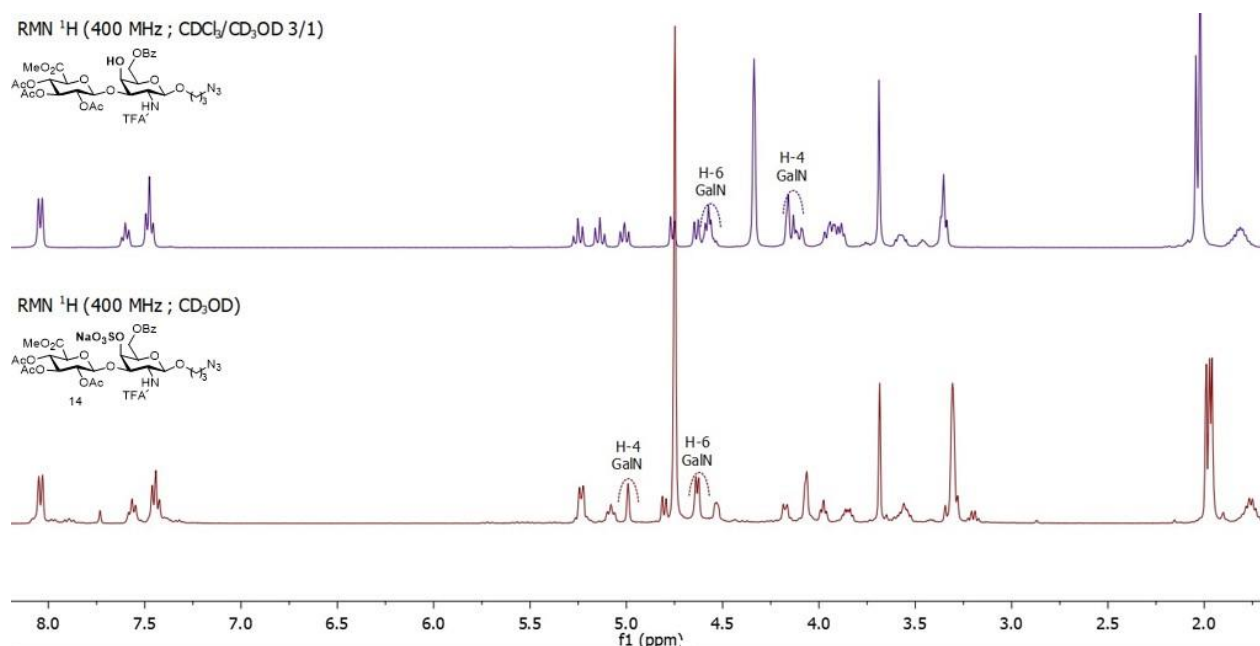


**Figure 27** : Comparaison des spectres de RMN  $^1\text{H}$  des disaccharides 4-OH et 4-OSO<sub>3</sub>Na.

Pour le disaccharide 6-sulfaté, la sulfatation peut se faire dans des conditions plus douces puisque la position est plus réactive. C'est pourquoi seulement 3.0 eq. de complexe SO<sub>3</sub>.NMe<sub>3</sub> en chauffant à 40 °C suffisent. Sans purification intermédiaire, la position 4 est ensuite acétylée avec un excès d'anhydride acétique dans la pyridine. Le disaccharide **84** est isolé avec 72 % de rendement sur deux étapes (Schéma 25). Moins évidente par RMN du proton (les déplacements chimiques des H-6 des composés 6-OH et 6-OSO<sub>3</sub>Na sont proches), la sulfatation est observable par RMN du carbone  $^{13}\text{C}$  en comparant avec le diol (Figure 28).

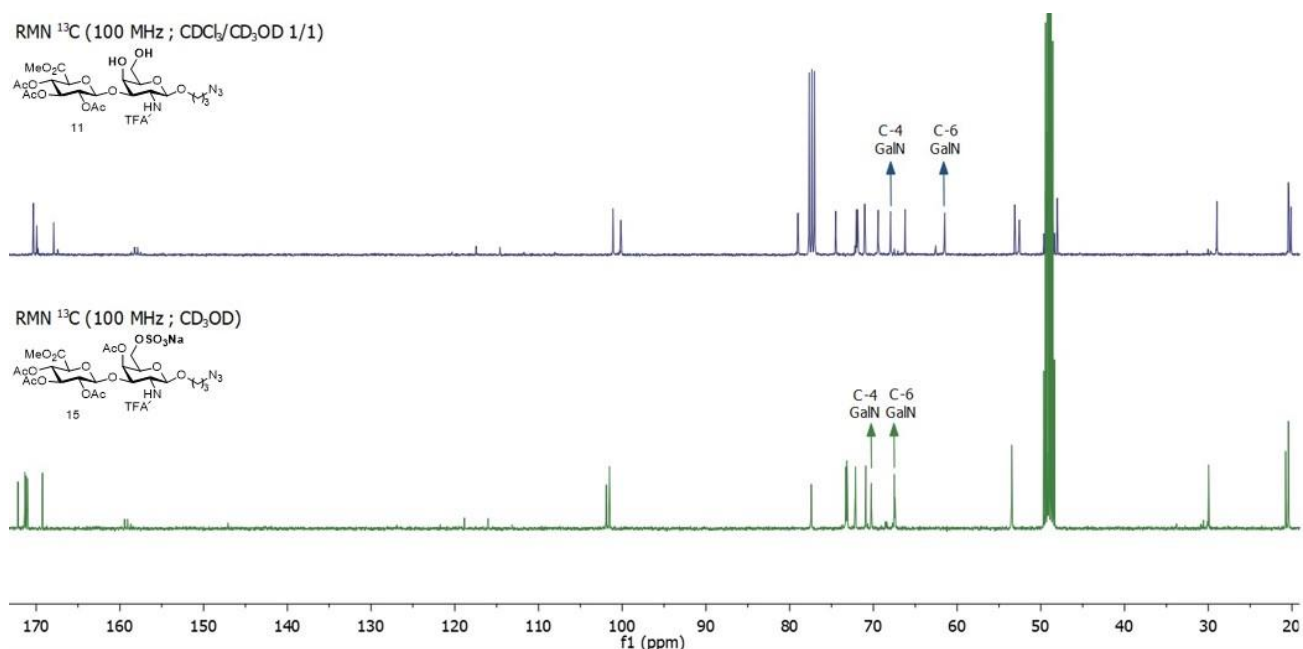
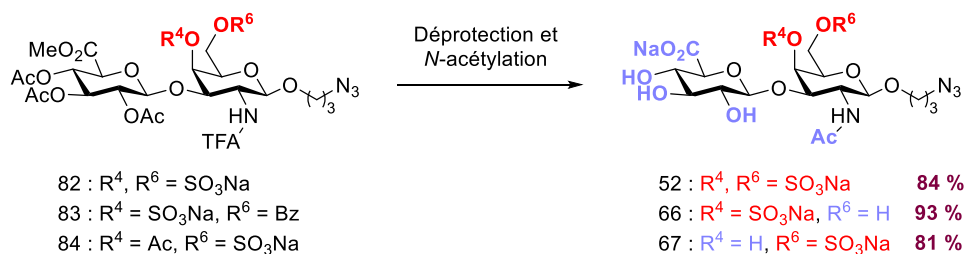


Figure 28 : Comparaison des spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  du diol **81** et du disaccharide 6-OSO<sub>3</sub>Na **84**.

Finalement, les disaccharides **82**, **83** et **84** ont été déprotégés et *N*-acétylés dans les mêmes conditions que le composé non-sulfaté **81**. Les disaccharides 4-, 6- et 4,6-sulfatés finaux ont été obtenus avec des rendements allant de 81 à 93 % (Schéma 26).



Conditions de déprotection :  $\text{LiO}_2\text{H}$  (5,0 eq. par  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), THF/ $\text{H}_2\text{O}$  3/1, 0 °C → t.a., 24 h ; puis NaOH 4M (15,0 eq. par ester), MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  4/1, t.a., 72 h.

Conditions de *N*-acétylation :  $\text{Ac}_2\text{O}$  (20,0 eq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (13,0 eq.) MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  4/1, 0 °C → t.a., 4 h.

Schéma 26 : Déprotection et *N*-acétylation pour obtenir les disaccharides de CS-A, -C et -E déprotégés.

## 4. CONCLUSION

Pour conclure, l'hémisynthèse développée au laboratoire a été utilisée pour obtenir le disaccharide sous la forme de chlorhydrate d'ammonium **41**. Puis, la fonction amine ainsi que les hydroxyles ont été protégés pour obtenir le disaccharide protégé **63**. A partir de l'imidate clé central **64**, le diol commun

**81** a pu être obtenu. Ainsi, quatre disaccharides diversement sulfatés et non-sulfaté portant un azidopropyle comme aglycone ont été synthétisés. Ces 4 composés pourront être engagés dans des réactions de cycloaddition de Huisgen avec différentes plateformes pour obtenir les composés multivalents souhaités (*Schéma 27*).

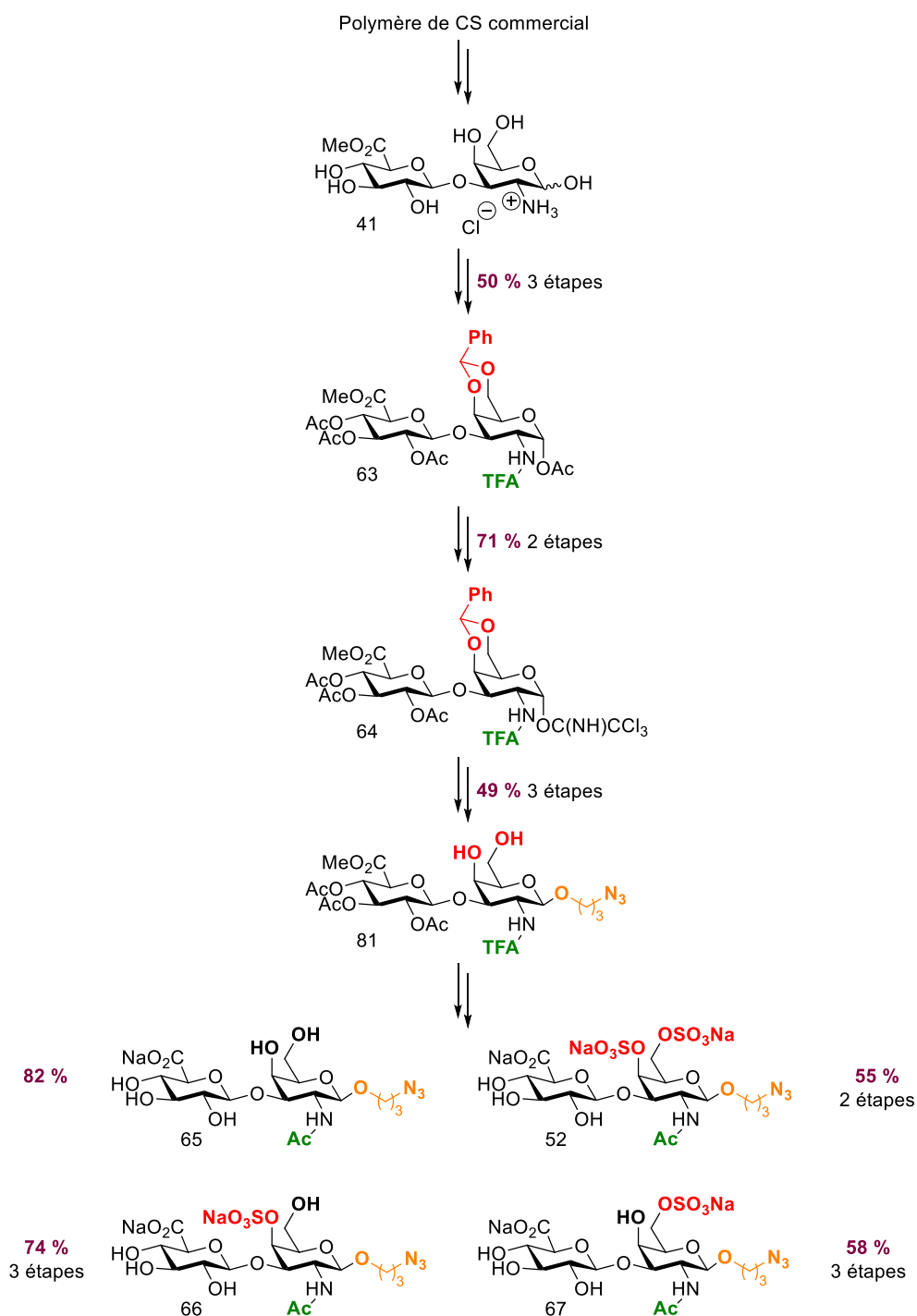


**Schéma 27** : Résumé de la synthèse des disaccharides sulfatés et non-sulfaté.

Nous allons maintenant nous intéresser à la synthèse des tétrasaccharides diversement sulfatés.

---

## SYNTHESE DES TETRASACCHARIDES DE CS

La synthèse de tétrasaccharides diversement sulfatés et non-sulfaté **86** a ensuite été explorée en essayant au maximum d'avoir une voie efficace comportant des blocs communs utiles pour la synthèse des hexasaccharides. Ces oligosaccharides seront obtenus à partir des tétrasaccharides **85** protégés par des groupements chloroacétyles sur les positions à sulfater de la D-GalN (ou des benzoyle), eux-mêmes obtenus après glycosylation [2+2] entre un disaccharide donneur activé **70** et un accepteur **71** portant un bras azidopropyle en aglycone. Le bloc accepteur proviendra du bloc donneur **70** qui découlera lui-même du diol **69** possédant un groupement lévulinoyle permettant d'accéder aux accepteurs et aux hexasaccharides *via* une élongation du côté non réducteur. Ce diol **69** sera obtenu à partir du disaccharide **68** portant un naphthylméthyle comme groupement protecteur temporaire en aglycone et un benzylidène afin de différencier les positions 4 et 6 de la GalN. Ce disaccharide proviendra du bloc clé **64** présenté précédemment (*Schéma 28*).

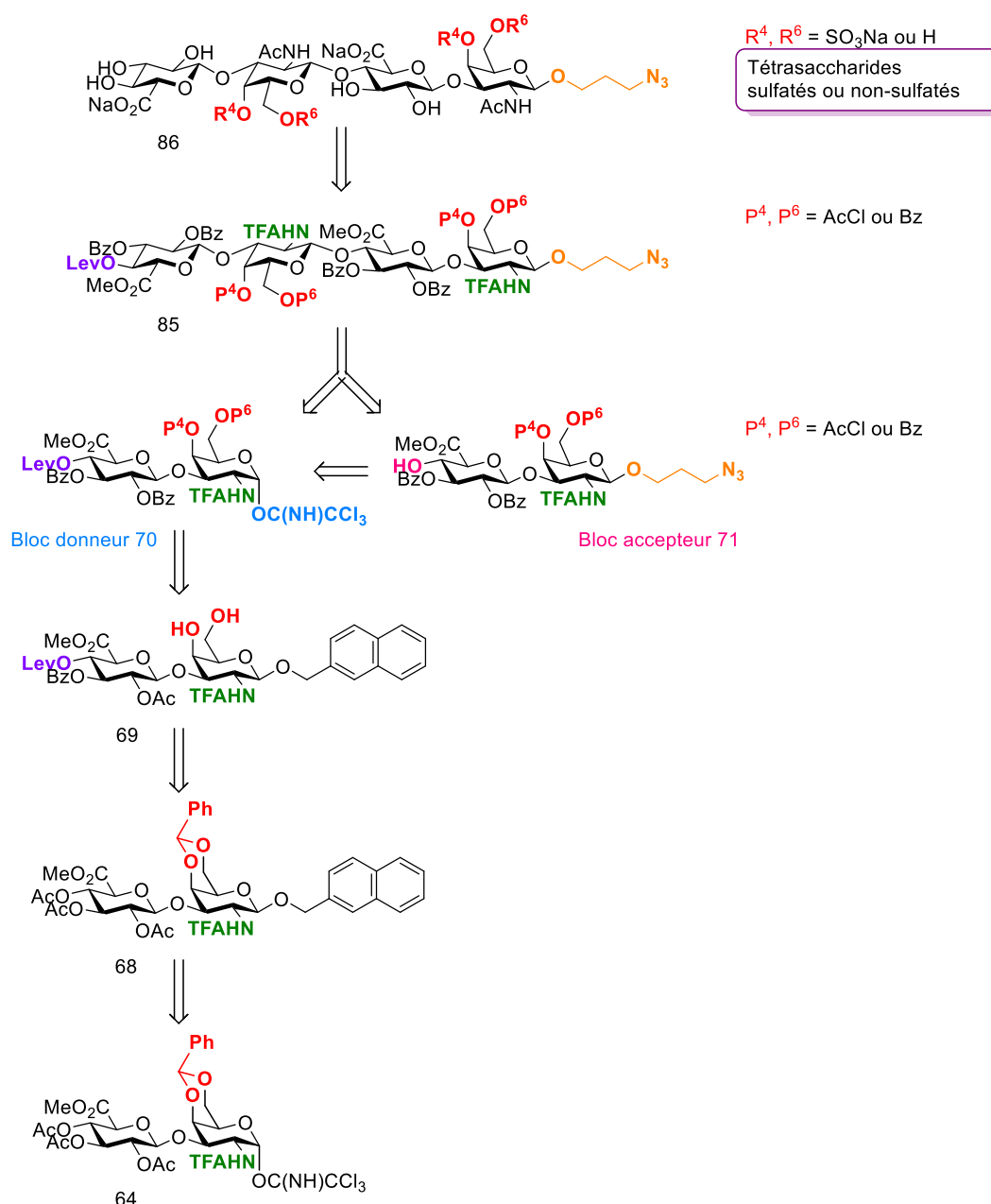


Schéma 28 : Rétrosynthèse des tétrasaccharides de sulfates de chondroïtine.

## 1. SYNTHÈSE DU DIOL 69

### 1.1. SYNTHÈSE DU DISACCHARIDE 68

Le groupement naphthylméthyle (NAP) a été introduit comme groupement protecteur orthogonal de la position anomère. En raison de la présence du benzylidène, la glycosylation est réalisée dans le DCM anhydre à  $-60^\circ C$  avec du 2-naphtalène-méthanol. Cette réaction a été optimisée par le Dr. Buisson pendant sa thèse.<sup>99</sup> Contrairement à la glycosylation avec le 3-bromopropanol, le diéthyléthérate de



trifluorure de bore s'est avéré moins efficace que le triflate de triméthylsilyle (TMSOTf) afin d'obtenir le disaccharide **68** en 1,2-*trans* (Schéma 29).

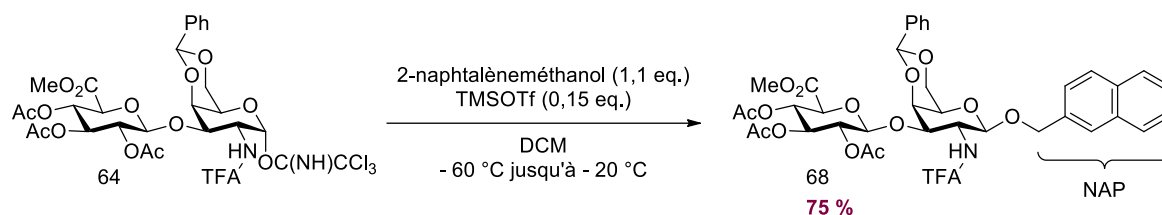


**Schéma 29** : Glycosylation avec le 2-naphtalèneméthanol.

Ensuite, un travail de protection/déprotection de l'acide glucuronique va ensuite être réalisé afin d'isoler la position 4 pour la protéger sélectivement avec un groupement lévulinoyle (Lev). Puis, le benzylidène sera déprotégé.

## 1.2. INTRODUCTION DU GROUPEMENT LEVULINOYLE ET SYNTHÈSE DU DIOL **69**

Tout d'abord, les groupements acétyles sont déprotégés *via* la méthode de Zemplén grâce à une solution de méthanolate de sodium dans le méthanol afin d'obtenir le triol correspondant (Schéma 30). Cependant, un mélange complexe avec notamment un produit de  $\beta$ -élimination a été observé suite à cette réaction lorsque le pH est trop basique (supérieur à 11). C'est pourquoi une méthode plus douce a été envisagée avec du carbonate de potassium ( $K_2CO_3$ ) dans le MeOH ce qui a permis de ne plus observer de  $\beta$ -élimination. Sans purification intermédiaire, la protection régiosélective des alcools en positions 2 et 3 du GlcA sous forme d'acétal isopropylidène est réalisée avec des ajouts séquentiels de 2-méthoxypropène en présence d'acide (1S)-(+)-10-camphosulfonique (CSA) dans le DMF. La formation de l'isopropylidène en positions 3,4 est également observée (ratios variables) mais les deux isomères sont séparables par colonne chromatographique ce qui permet d'obtenir l'isomère désiré **28** avec 73 % de rendement après ces deux étapes (Schéma 30). Le second isomère est, quant à lui, conservé pour être réutilisé. Finalement, l'ester lévulinoylate est formé en position C-4 par estérification de Steglich pour donner le composé **88** avec 81 % de rendement (Schéma 30).

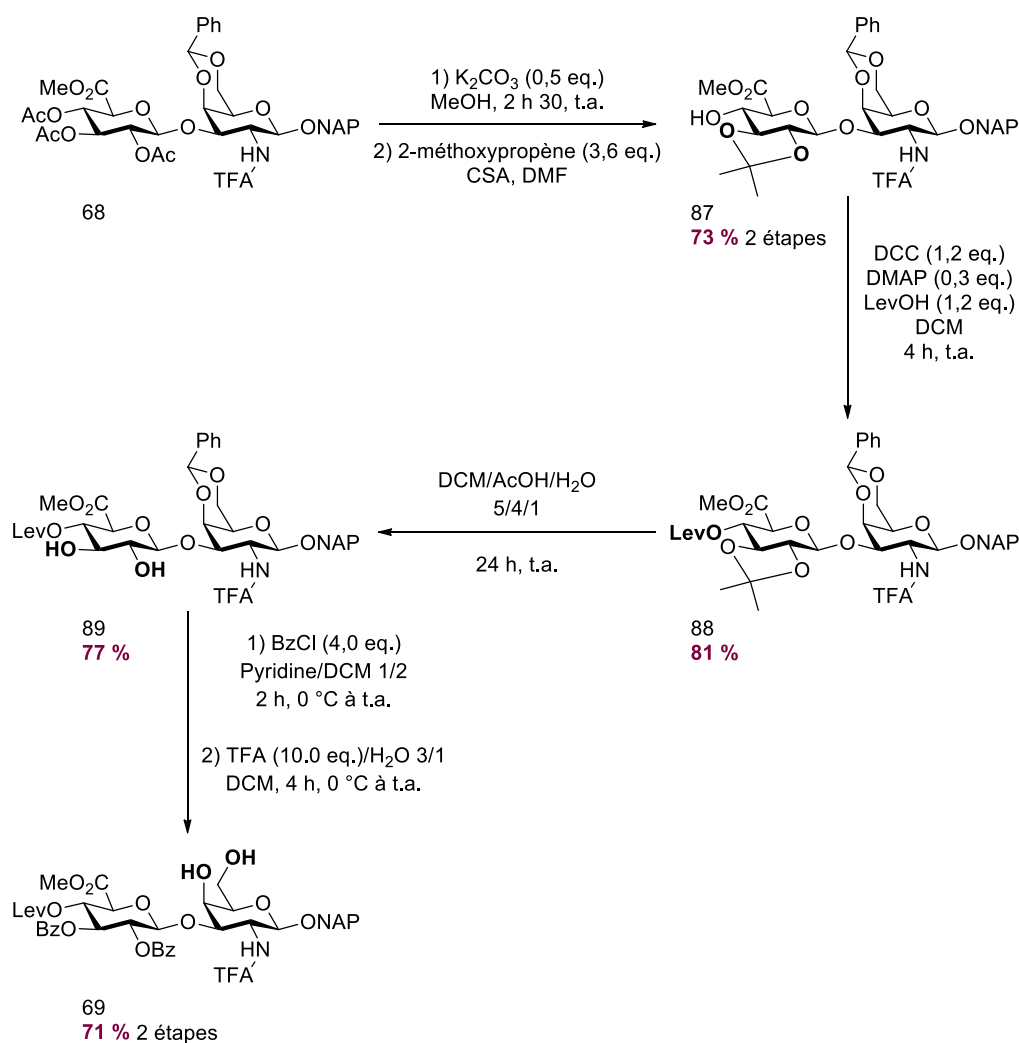


**Schéma 30 : Synthèse du composé 69.**

Afin de protéger les positions 4 et 6 par des groupements chloroacétyles en vue des futures sulfatations, le benzylidène doit d'abord être déprotégé. Pour ce faire, le disaccharide **88** est mis en réaction dans un mélange DCM/AcOH/H<sub>2</sub>O 5/4/1 pendant 24 h à température ambiante. Ces conditions douces permettent d'obtenir le diol **89**, sans pour autant déprotéger le benzylidène, avec 77 % de rendement (Schéma 30). Suite à cela, un excès de chlorure de benzoyle dans un mélange pyridine/DCM est utilisé pour protéger les deux hydroxyles en positions 2 et 3 du GlcA, permettant d'obtenir le composé dibenzoylé. Après traitement, le brut réactionnel est engagé directement dans la réaction de déprotection du benzylidène en présence d'un mélange TFA/H<sub>2</sub>O. Le diol **69** est obtenu avec 71 % de rendement sur 2 étapes (Schéma 30).

## 2. SYNTHÈSE DES DONNEURS CHLOROACÉTYLES

### 2.1. PROTECTION DES FUTURES POSITIONS À SULFATER

A partir du diol **69**, une protection temporaire des futures positions à sulfater avec des groupements chloroacétyle (AcCl) peut être effectuée. Ceux-ci sont utilisés au laboratoire depuis plusieurs années car ce sont des groupements protecteurs orthogonaux à ceux déjà utilisés. Comme pour la sulfatation des disaccharides, la différence de réactivité entre les deux alcools de la GalN (4-OH secondaire, 6-OH primaire) va être exploitée.

Le disaccharide 4,6-dichloroacétylé **90** est obtenu par réaction du diol **69** avec un excès d'anhydride chloroacétique (ClAc)<sub>2</sub>O (6,0 équivalents) dans la pyridine à 0 °C avec un rendement de 57 % (Schéma 31).

Le disaccharide 4-chloroacétylé **91** est obtenu par protection régiosélective de la position 6 avec un benzoate (cyanure de benzoyle dans la pyridine) suivie de la chloroacétylation dans les mêmes conditions que précédemment avec 3,0 équivalents de (ClAc)<sub>2</sub>O. Le composé **91** est obtenu avec un rendement de 40 % en 2 étapes (Schéma 31).

Le disaccharide 6-chloroacétylé **92** est obtenu par chloroacétylation régiosélective de la position 6 avec seulement 2,0 équivalents de (ClAc)<sub>2</sub>O pendant 1h30 suivie de la benzylation de la position 4 avec du chlorure de benzoyle dans un mélange DCM/pyridine. Le composé **92** est obtenu avec un rendement de 35 % en 2 étapes (Schéma 31).

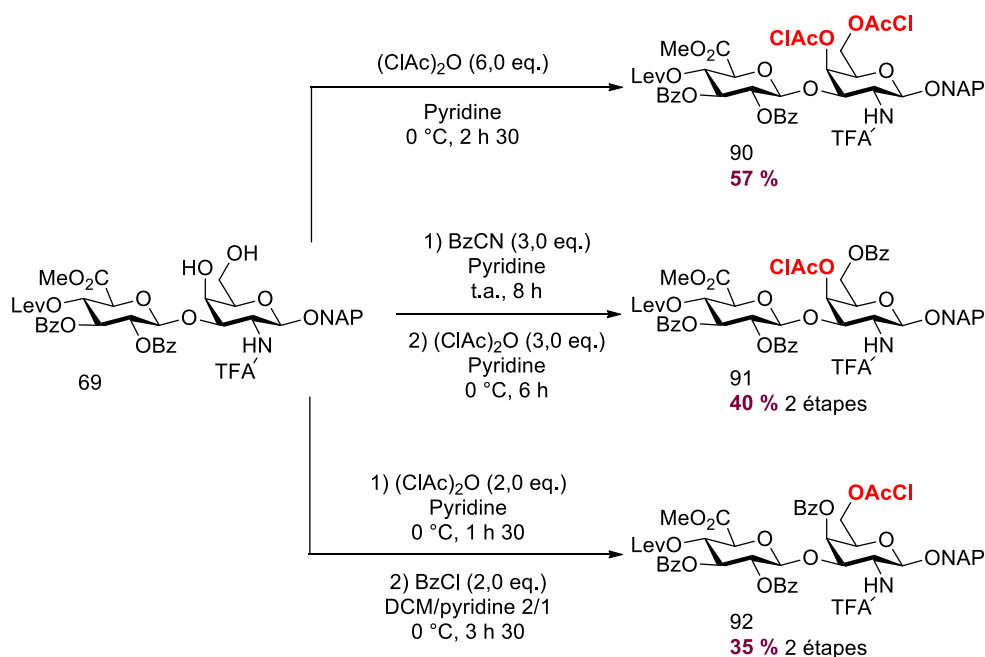


Schéma 31 : Synthèse des disaccharides 4, 6 et 4,6-chloroacétylés **90-92**.

Des rendements faibles à corrects sont obtenus sur ces étapes de chloroacétylation qui arrivent en fin de synthèse ce qui entraîne une perte de produit non négligeable.

L'introduction des groupements chloroacétyles est facilement identifiable par RMN du proton et du carbone : on retrouve des singulets entre 4.0 et 4.5 ppm pour les protons du CH<sub>2</sub>Cl et des pics autour de 40 ppm pour le CH<sub>2</sub> ainsi que des C=O supplémentaires.

## 2.2. SYNTHÈSE DU DONNEUR 4,6-DICHLOROACÉTYLE

Puisqu'il s'agit d'un composé non-synthétisé par le Dr. Buisson, nous nous sommes focalisés sur la synthèse du donneur 4,6-dichloroacétylé. Cette synthèse se déroule en deux étapes. Tout d'abord, l'hémiacétal est obtenu par déprotection du groupement NAP puis cette position est activée sous forme de trichloroacétimide. Le composé **90** est mis en réaction avec du 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) pour donner le composé **93** avec 59 % de rendement (*Schéma 32*). Le donneur activé **94** est obtenu dans les conditions usuelles (Cl<sub>3</sub>CCN, DBU, DCM) avec un rendement n'excédant pas 22 %. En effet, soit la purification du mélange réactionnel était difficile, soit la réaction était incomplète malgré l'ajout de réactifs (*Schéma 32*).

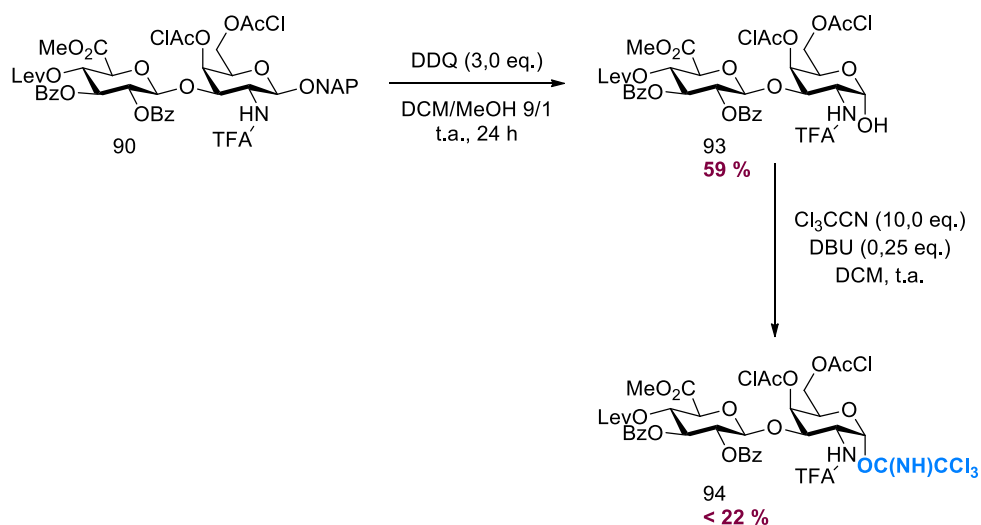


**Schéma 32** : Synthèse du disaccharide donneur **94**.

Même si cette synthèse n'a pas été réalisée sur les autres motifs, les problèmes de protection avec les groupements chloroacétyles et d'activation de la position anomère nous ont conduits à changer de voie. En effet, on compte 10 étapes à partir du disaccharide **64** alors et seulement 7,4 % de rendement

sur les 3 dernières. En partant de 10 g d'imidate **64**, on obtient finalement moins de 100 mg de disaccharide donneur dichloroacétylé **94** (Schéma 33).

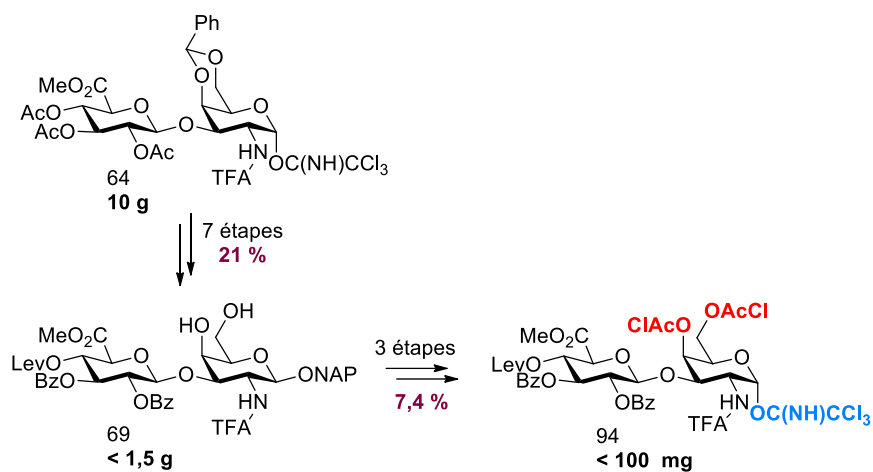


**Schéma 33** : Conclusion sur la synthèse du donneur **94**.

Une nouvelle voie de synthèse pour atteindre des disaccharides donneurs plus efficacement a donc été explorée ce qui implique également le changement de voie de synthèse de l'accepteur.

### 3. NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE DES TÉTRASACCHARIDES

Afin d'accéder aux tétrasaccharides, nous avons envisagé une voie de synthèse alternative utilisant un autre donneur dont la synthèse nécessite moins d'étapes. En revanche, il est à noter que cette nouvelle voie ne permettra pas d'accéder aux hexasaccharides (Schéma 34).

Les tétrasaccharides **85** seront alors obtenus à partir d'une glycosylation [2+2] entre un disaccharide donneur acétylé sur le GlcA activé par un trichloroacétimide et un disaccharide accepteur avec un hydroxyle libre en position C-4 du GlcA. Les disaccharides donneurs et accepteurs chloroacétylés proviendront du même disaccharide clé **63**.

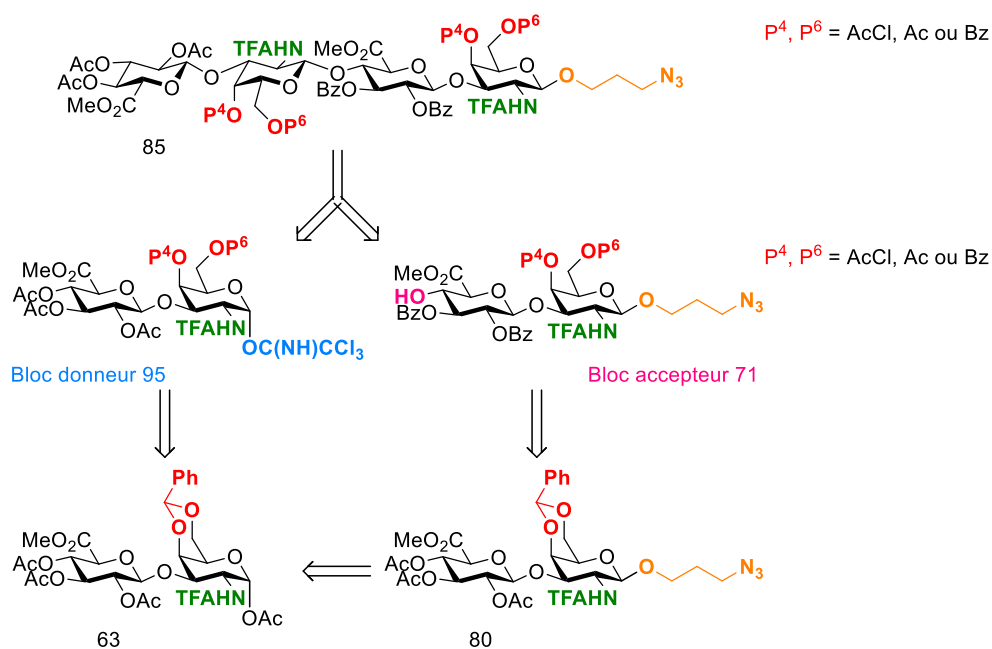


**Schéma 34** : Nouvelle voie de synthèse envisagée pour atteindre les tétrasaccharides.

### 3.1. SYNTHÈSE DES DISACCHARIDES DONNEURS ACÉTYLES

La première étape correspond à l'hydrolyse du benzylidène avec, à nouveau, un mélange TFA/H<sub>2</sub>O 3/1 dans le DCM à 0 °C pour obtenir le disaccharide **96** avec 47 % de rendement (*Schéma 35*). Cependant, un second produit correspondant à l'hydrolyse de l'acétate anomère **97** est isolé. Il est à noter que ce produit peut être réengagé dans une séquence acétalisation/acétylation pour reformer le composé **63**.

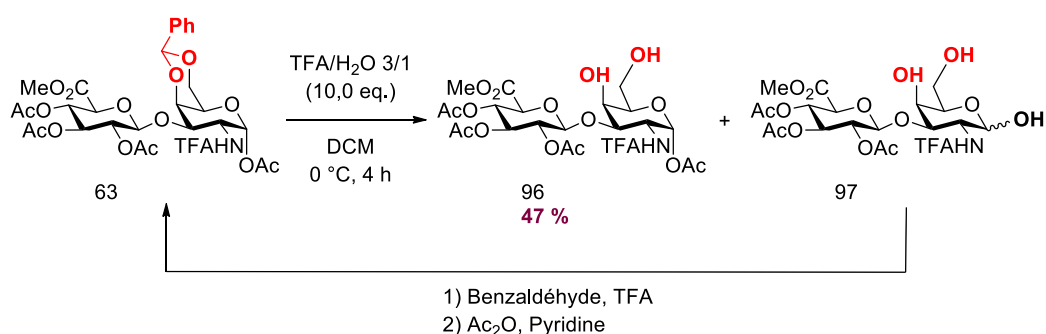


**Schéma 35** : Hydrolyse du benzylidène du composé **7**.

A partir du diol **96**, deux stratégies sont envisageables : la per-acétylation permettra d'aller vers les tétrasaccharides non-sulfatés tandis que la protection avec les chloroacétates permettra d'envisager les tétrasaccharides sulfatés.

Pour obtenir le composé **99**, la réaction d'hydrolyse du benzylidène (*Schéma 36*) est réalisée et le brut est ensuite mis en réaction avec de l'anhydride acétique dans la pyridine pour donner le composé per-acétylé **98**. La déprotection régiosélective de l'acétate anomère suivie de l'activation sous forme de trichloroacétimide permettent d'obtenir le disaccharide donneur **99** avec 56 % de rendement sur 2 étapes.

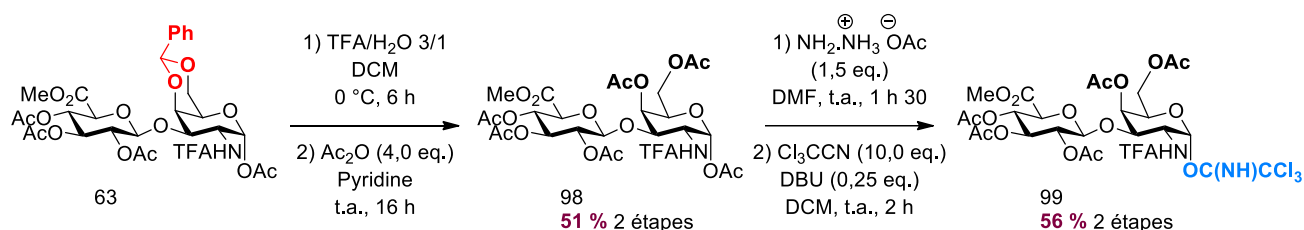
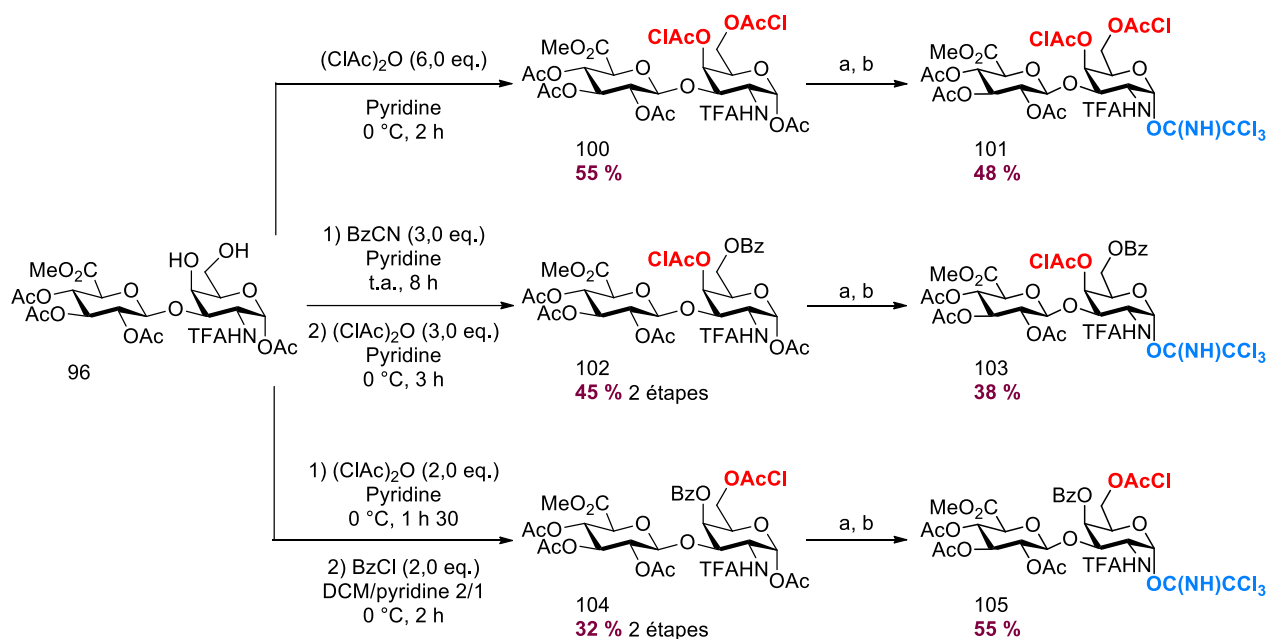


**Schéma 36** : Synthèse du donneur per-acétylé **99**.

La chloroacétylation des différentes positions de la GalN peut être réalisée dans les mêmes conditions que précédemment afin de donner les composés **100**, **102** et **104** respectivement 4,6-, 4-, et 6-chloroacétylés (*Schéma 37*). A nouveau, des rendements moyens ont été obtenus.

La position anomère est ensuite activée avec un trichloroacétimide après déprotection de l'acétate dans les conditions habituellement utilisées au laboratoire afin de donner les disaccharides donneurs **101**, **103** et **105** avec des rendements respectifs de 48 %, 38 % et 55 % sur deux étapes (*Schéma 37*).



Conditions a, b : a) acétate d'hydrazine (1,5 eq.), DMF, t.a., 1 h 30 ; b) Cl<sub>3</sub>CCN (10,0 eq.), DBU (0,25 eq.), DCM, 2 h, t.a.

**Schéma 37** : Synthèse des disaccharides donneurs chloroacétylés **101**, **103** et **105**.

### 3.2. SYNTHÈSE DES DISACCHARIDES ACCEPTEURS

La synthèse des disaccharides accepteurs se fait à partir du disaccharide **80** possédant l'azidopropyle comme aglycone, précédemment décrit (cf partie disaccharides, *Schéma 21*). Comme précédemment, un travail de protection/déprotection du GlcA va d'abord être réalisé afin d'isoler la position 4 pour la protéger sélectivement avec un groupement Lev puis le benzylidène sera déprotégé afin de protéger les futures positions à sulfater.

#### A- INTRODUCTION DE L'ESTER LEVULINOATE

Les acétates sont déprotégés avec du carbonate de potassium dans le MeOH puis le brut est mis en réaction avec le 2-méthoxypropène dans le DMF. Le composé **106** est obtenu avec 80 % de rendement sur 2 étapes. L'acétal en position 3,4 est à nouveau observé, isolé et conservé pour une utilisation ultérieure. Ensuite, l'alcool en position 4 du GlcA est protégé en Lev en présence de DCC, DMAP et acide lévulinique afin d'obtenir le composé **107** avec 86 % de rendement (*Schéma 38*).



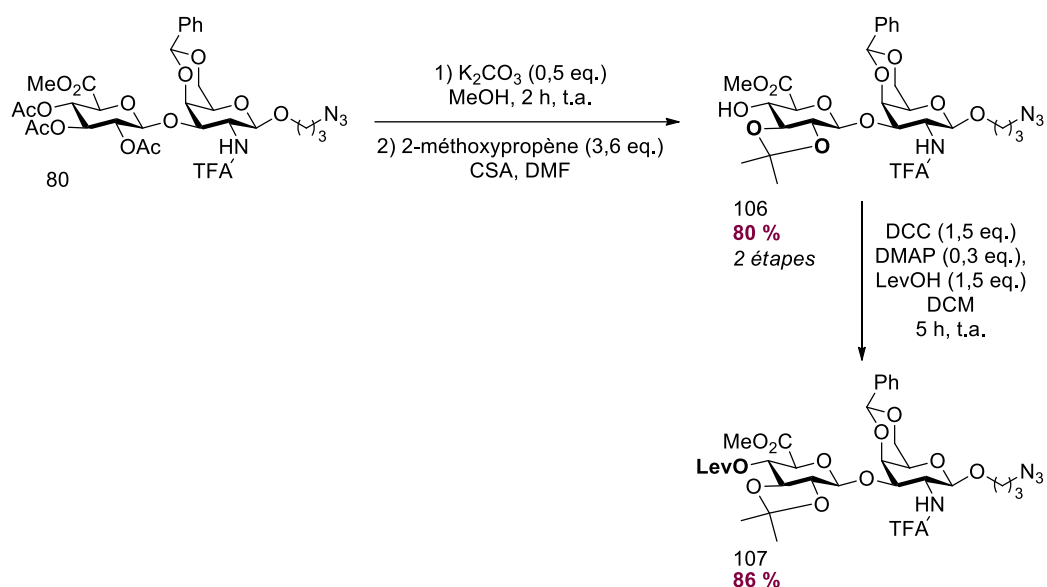


**Schéma 38** : Synthèse du composé **107**.

#### B- SYNTHÈSE DES DIFFÉRENTS ACCEPTEURS

A partir du composé **107**, deux stratégies de synthèse sont possibles : soit seul l'isopropylidène est déprotégé puis les 2 hydroxyles libérés sont benzoylés pour ensuite accéder aux positions 4 et 6 de la GalN après déprotection du benzylidène ; soit l'isopropylidène et le benzylidène sont déprotégés simultanément puis les 4 hydroxyles libérés sont benzoylés. La première voie donnera accès aux accepteurs diversement chloroacétylés en vue d'une future sulfatation tandis que la seconde permettra d'obtenir l'accepteur non sulfaté (*Schéma 39*).

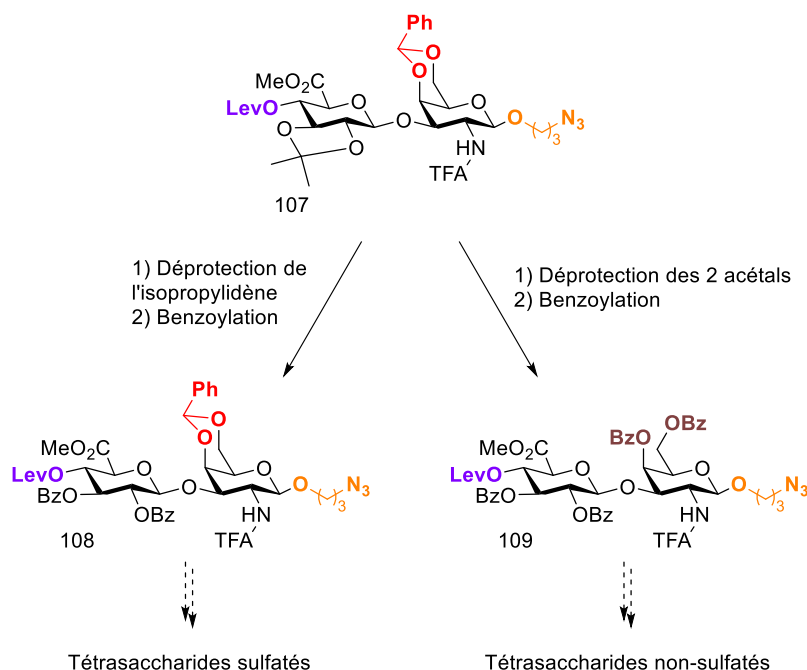


**Schéma 39** : Stratégies de synthèse envisagées à partir du disaccharide **107**.

#### SYNTHESE DE L'ACCEPTEUR TETRABENZOYLE

Pour obtenir le composé tétrabenzoylé **109**, le disaccharide **107** est d'abord mis en réaction dans un mélange TFA/H<sub>2</sub>O dans du DCM pour donner le tétrol **110** avec 93 % de rendement. Ensuite, la perbenzylation s'effectue avec un excès de chlorure de benzoyle dans un mélange pyridine/dichlorométhane pendant 2 h pour donner le composé **109** avec 40 % de rendement (*Schéma 40*). Ce faible rendement de benzylation s'explique par le fait que la réaction n'est pas complète même après ajout de réactif et un temps de réaction plus long. En effet, des sous-produits tribenzoylés ont été récupérés et la benzylation a pu être à nouveau réalisée sur ces composés.

Pour obtenir l'accepteur **111**, il ne reste qu'à déprotéger l'ester lévulinoate afin d'obtenir l'hydroxyle libre en C-4 du GlcA grâce à de l'acétate d'hydrazine. Le composé **111** est obtenu avec 90 % de rendement (*Schéma 40*).

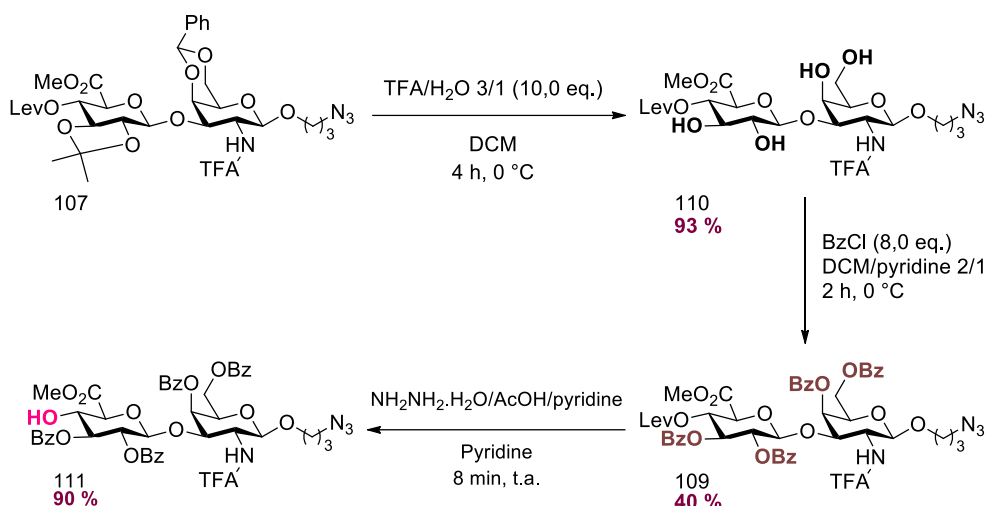


**Schéma 40** : Synthèse du disaccharide accepteur tétrabenzoylé **111**.

#### SYNTHÈSE DES ACCEPTEURS CHLOROACÉTYLES

Les accepteurs diversement chloroacétylés peuvent être obtenus à partir du disaccharide **107** qui a été préparé dans les mêmes conditions que précédemment (*Schéma 41*).

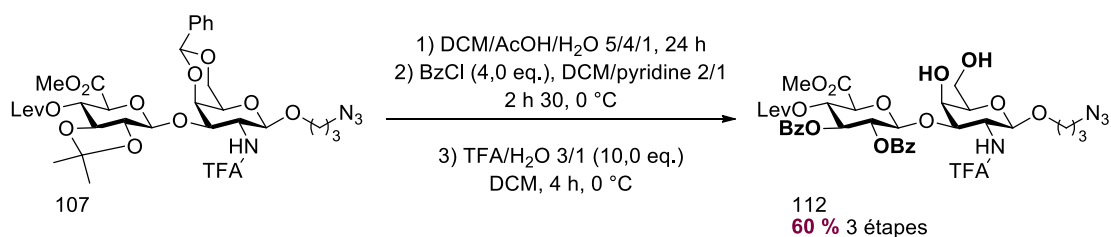


**Schéma 41** : Synthèse du diol **112**.

Comme précédemment, le diol **112** permet d'accéder aux différents motifs chloroacétylés. Cependant, seuls les disaccharides 4- et 4,6-chloroacétylés ont été synthétisés.

Ainsi, la dichloroacétylation avec un excès d'anhydride chloroacétique (ClAc)<sub>2</sub>O permet d'obtenir le disaccharide **113** qui est ensuite mis en réaction avec un mélange d'hydrate d'hydrazine/acide acétique/pyridine pour obtenir l'accepteur 4,6-dichloroacétylé **114** correspondant avec 56 % de rendement (*Schéma 42*).

Le composé **115** est obtenu après benzylation sélective de la position 6 avec du cyanure de benzoyle et chloroacétylation de la position 4 avec l'anhydride chloroacétique avec 44 % de rendement sur 2

étapes. Enfin, la déprotection du Lev est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment afin d'obtenir l'accepteur 4-chloroacétylé **116** avec 79 % de rendement (*Schéma 42*).

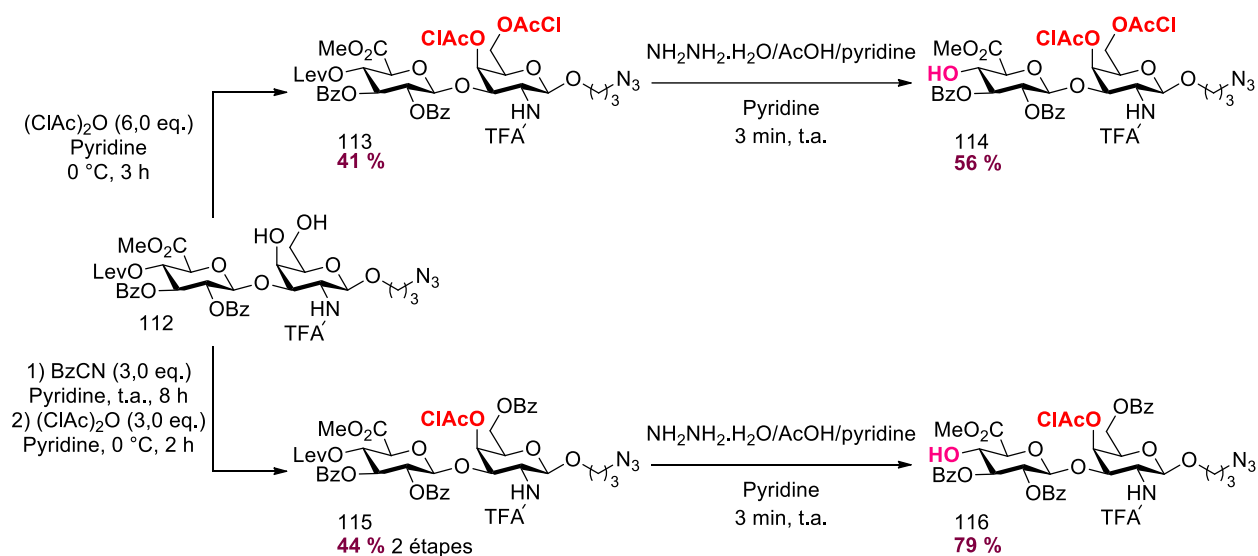


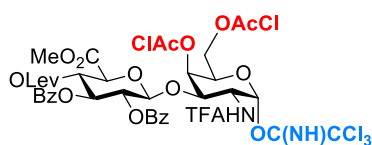
**Schéma 42** : Synthèse des accepteurs chloroacétylés **114** et **116**.

### 3.3. CONCLUSION

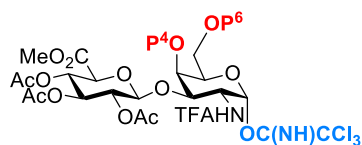
A partir de la stratégie initiale, seul le disaccharide donneur 4,6-dichloroacétylé **94** a été synthétisé en petite quantité après 10 étapes. Dans le but de gagner en temps et en matière, une stratégie alternative a été envisagée permettant de synthétiser trois donneurs 4 et/ou 6 chloroacétylés **101**, **103** et **105** ainsi qu'un donneur per-acétylé **99**. En parallèle, les disaccharides accepteurs chloroacétylés sur les positions 4 et/ou 6 de la GalN **114** et **116** et un accepteur per-benzoylé **112** ont été synthétisés (*Schéma 43*).

La seconde voie de synthèse est finalement préférable puisqu'elle permet de synthétiser les différents composés de manière plus efficace et plus rapide. Par exemple, à partir du composé **63**, les donneurs 4,6-dichloroacétylés **94** et **101** sont obtenus en 12 et 4 étapes avec 5,2 % et 12 % de rendement respectivement.

### Blocs donneurs

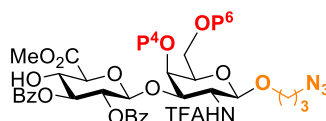


94\* 174 mg



99 : P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> = Ac 1,6 g  
 101 : P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> = AcCl 550 mg  
 103 : P<sup>4</sup> = AcCl, P<sup>6</sup> = Bz 217 mg  
 105 : P<sup>4</sup> = Bz, P<sup>6</sup> = AcCl 150 mg

### Blocs accepteurs



112 : P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> = Bz 361 mg  
 114 : P<sup>4</sup>, P<sup>6</sup> = AcCl 67 mg  
 116 : P<sup>4</sup> = AcCl, P<sup>6</sup> = Bz 79 mg

**Schéma 43** : Blocs disaccharidiques donneurs et accepteurs synthétisés.

\* non reproductible

## 4. SYNTHÈSE DES TÉTRASACCHARIDES

Les blocs donneurs et accepteurs étant préparés, il est désormais possible de synthétiser les tétrasaccharides correspondants *via* une glycosylation de type [2+2]. Pour cela, un disaccharide donneur chloroacétylé (ou acétylé) et son analogue accepteur sont donc mis en réaction avec un acide de Lewis dans le dichlorométhane. Explorons les différents tests réalisés au cours de cette thèse.

### 4.1. VERS LA SYNTHÈSE DES TÉTRASACCHARIDES SULFATES

Différents tests de glycosylation ont été réalisés avec des donneurs et accepteurs chloroacétylés dans le but d'aller vers la synthèse des tétrasaccharides sulfatés (*Schéma 44, Tableau 3*).

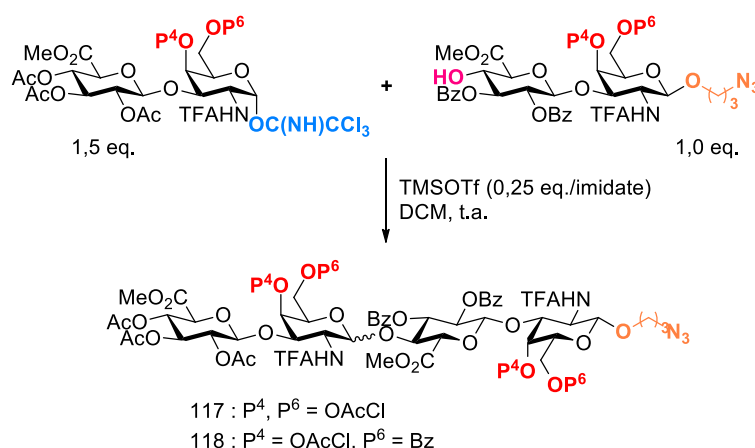


**Schéma 44** : Synthèse des tétrasaccharides par glycosylation [2+2].

|   | Donneur                 | Accepteur               | Durée  | Rendement |
|---|-------------------------|-------------------------|--------|-----------|
| 1 | <p><b>101</b> 98 mg</p> | <p><b>114</b> 67 mg</p> | 1 h    | n.d.      |
| 2 | <p><b>103</b> 97 mg</p> | <p><b>116</b> 66 mg</p> | 30 min | < 10 %    |

**Tableau 3** : Réactions de glycosylation réalisées pour la synthèse de tétrasaccharides chloroacétylés.

Dans un premier temps, un essai a été réalisé avec le donneur dichloroacétylé **101** et l'accepteur **114**. Tous deux ont été mis en réaction pendant 1 h à température ambiante avec 0,25 équivalents de TMSOTf (par rapport à l'imidate) dans le DCM (*Tableau 3, entrée 1*). Plusieurs tâches difficilement séparables ont été observées sur CCM mais la tâche majoritaire correspondait à l'accepteur de départ, indiquant que la réaction n'a pas eu lieu. En effet, 62 mg d'accepteur sur les 67 engagés ont été récupérés après colonne. Le donneur n'a pas été obtenu, ce qui prouve que l'acide de Lewis a réagi mais également que l'alcool n'a pas attaqué. Ayant peu de produit dichloroacétylé, cette synthèse n'a pas pu être effectuée à nouveau.

Dans un second temps, un essai a été réalisé avec le donneur **103** et l'accepteur **116**, tous deux 4-chloroacétylés (*Tableau 3, entrée 2*). Cette fois-ci, le produit **118** a été obtenu avec un faible rendement mais n'a pas pu être isolé pur. De plus, quelques sous-produits ont pu être identifiés : à nouveau, de

l'accepteur n'ayant pas réagi a été isolé ainsi que de l'accepteur silylé **119** et l'acide glucuronique **120** dérivant du donneur (*Figure 29*).

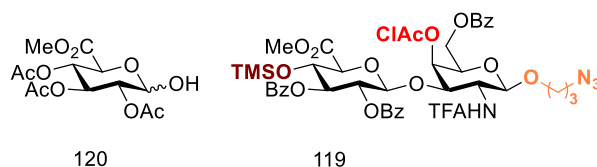


**Figure 29** : Sous-produits de la glycosylation [2+2] avec les composés 4-chloroacétylés.

Ces deux glycosylations n'ont pas donné de résultats encourageants et une optimisation de ces réactions n'a pas pu être réalisée en raison de la faible quantité de composés disponible. Nous nous sommes alors penchés sur la synthèse d'un tétrasaccharide non-sulfaté.

#### 4.2. VERS LA SYNTHÈSE D'UN TÉTRASACCHARIDE NON-SULFATE

Les deux tests avec les chloroacétates n'étant pas concluant, nous avons décidé de réaliser plusieurs tests avec le donneur per-acétylé **99** et l'accepteur tétrabenzoylé **112**, plus rapides et faciles à obtenir ce qui conduit au tétrasaccharide non-sulfaté (*Schéma 45, Tableau 4*). Chacun de ces tests a été réalisé avec environ 100 mg d'accepteur **112**.

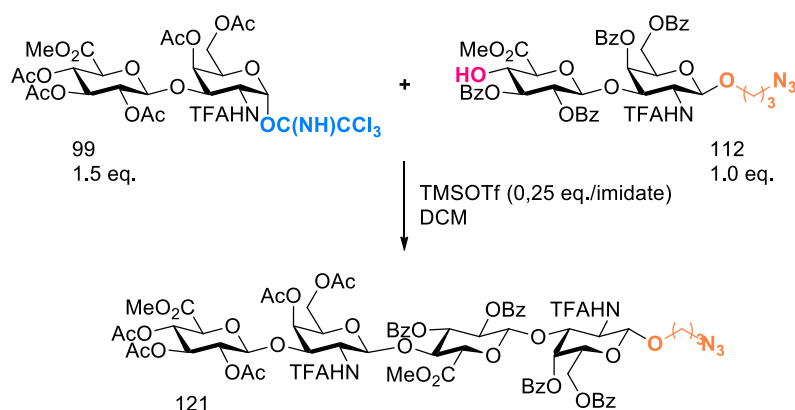


**Schéma 45** : Synthèse du composé **121** par glycosylation [2+2].

|   | Température | Durée  | Produits isolés            |                      |                      |
|---|-------------|--------|----------------------------|----------------------|----------------------|
|   |             |        | Tétrasaccharide <b>121</b> | Accepteur <b>112</b> | Oxazoline <b>122</b> |
| 1 | t.a.        | 1 h    | 19 %                       | 32 %                 | 28 %*                |
| 2 | t.a.        | 1 h 45 | 11 %                       | 40 %                 | /                    |
| 3 | 0 °C        | 1 h    | 6 %                        | 42 %                 | 42 %*                |

**Tableau 4** : Conditions utilisées pour la glycosylation de **99** et **112**.

\* rendements calculés à partir du donneur **99**.

Dans un premier temps, les deux disaccharides ont été mis en réaction pendant 1 h à t.a. avec le TMSOTf dans le DCM et seulement 19 % du produit a été isolé (*Tableau 4, entrée 1*). Allonger la durée de la réaction (*entrée 2*) ou diminuer la température (*entrée 3*) n'a pas permis d'améliorer le rendement. En plus de l'accepteur, l'oxazoline **122** dérivant du donneur **99** a été isolée comme le confirment les analyses RMN  $^1\text{H}$  (H-1 GalN à 6,25 ppm,  $^3J_{1-2} = 7.0$  Hz),  $^{13}\text{C}$  (C-1 GalN à 105,6 ppm) et HRMS (*Figure 30*).<sup>104</sup>

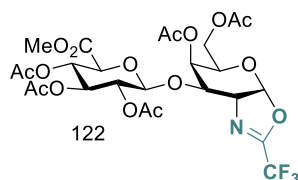
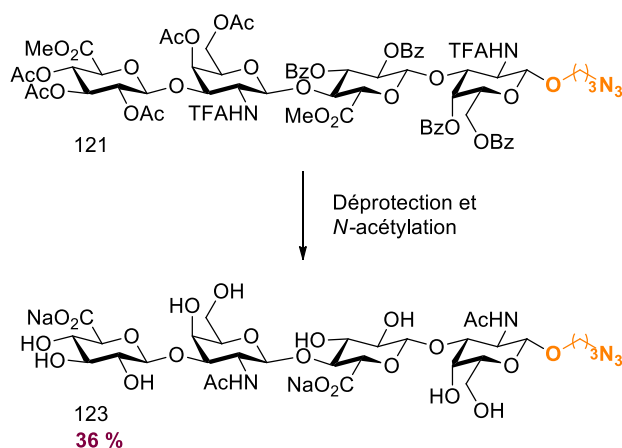


**Figure 30** : Oxazoline dérivant du disaccharide **99**.

Cette glycosylation sur des partenaires non-chloroacétylés n'étant pas efficace, cela laisse supposer que l'échec rencontré précédemment n'est pas dû à la présence de ces groupements protecteurs.

Malgré les faibles rendements de glycosylation, 50 mg de composé **121** ont pu être isolés ce qui nous a permis de réaliser la déprotection finale dans les mêmes conditions que pour les disaccharides. Ainsi, le tétrasaccharide déprotégé **123** a été obtenu avec 36 % de rendement (*Schéma 46*).



Conditions de déprotection : LiO<sub>2</sub>H (10.0 eq., 5.0 eq. par CO<sub>2</sub>Me), THF/H<sub>2</sub>O 3/1, 0 °C → t.a., 24 h ; puis NaOH 4M (135.0 eq., 15.0 eq. par ester), MeOH/H<sub>2</sub>O 3/1, t.a., 72 h.

Conditions de N-acétylation : Ac<sub>2</sub>O (20.0 eq.), Et<sub>3</sub>N (13.0 eq.) MeOH/H<sub>2</sub>O 4/1, 0 °C → t.a., 4 h.

**Schéma 46** : Synthèse du tétrasaccharide déprotégé **123**.

<sup>104</sup> Li, Z.; Li, Z.; Sun, X.; Wang, Y.; Meng, X.; Yu, Y.; Sun. CN115381844A, **2022**.



Cette stratégie présente donc plusieurs désavantages : la chloroacétylation est une étape limitante, les différents donneurs sont difficiles à synthétiser en grande quantité et la glycosylation [2+2] fonctionne mal. Une voie alternative a donc été envisagée afin de voir si le problème venait du groupement azide en aglycone et si les rendements de glycosylation pouvaient être améliorés.

#### 4.3. VOIE ALTERNATIVE POUR LA SYNTHÈSE DES TÉTRASACCHARIDES

Une voie alternative a alors été envisagée grâce à des produits disponibles issus de la première voie de synthèse (composés **90** et **94**). Utiliser un disaccharide accepteur avec un NAP en aglycone permet de voir si un changement peut être observé. C'est pourquoi la glycosylation [2+2] a été réalisée entre le disaccharide 4,6-dichloroacétylé donneur **94** et le disaccharide 4,6-dichloroacétylé accepteur **124** (obtenu après délévulinoylation du composé **90** avec un rendement de 64 %) afin de donner le tétrasaccharide désiré **125** avec 47 % de rendement (*Schéma 47*). Cependant, la sélectivité  $\beta$  du composé n'a pas pu être vérifiée car les constantes de couplage des H-1 et H-2 GalN2 ne peuvent pas être calculées (protons observés dans des massifs).

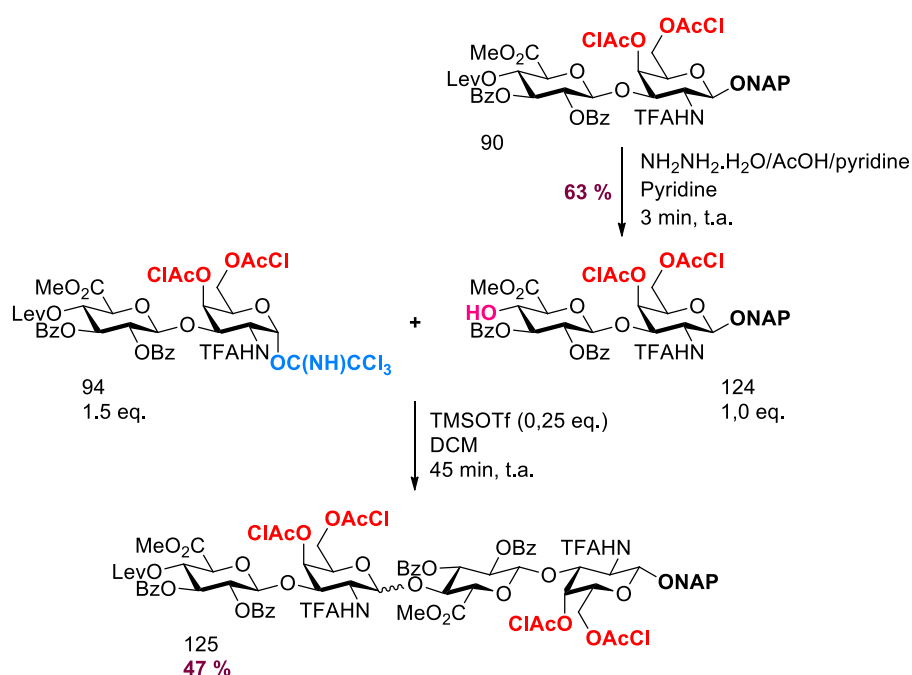


**Schéma 47** : Synthèse du composé **125** par glycosylation [2+2].

Ce test semble démontrer que le groupement azide pose problème dans les réactions de glycosylation. Il est à noter que le tétrasaccharide **125** pourrait permettre d'obtenir le tétrasaccharide dichloroacétylé avec le bras azidopropyle en aglycone par la suite. Cette stratégie n'a pas pu être explorée par manque de produit.

#### 4.4. CONCLUSION

Avec le bras azidopropyle, seuls les tétrasaccharides **118** et **121** ont été obtenus avec de faibles rendements. Le composé **121** a pu être déprotégé et 10 mg de tétrasaccharide non-sulfaté **123** ont pu être obtenus (Figure 31). Un test de glycosylation en changeant l'aglycone azidopropyle par un naphthylméthyle nous laisse supposer que le groupement azide pose problème.

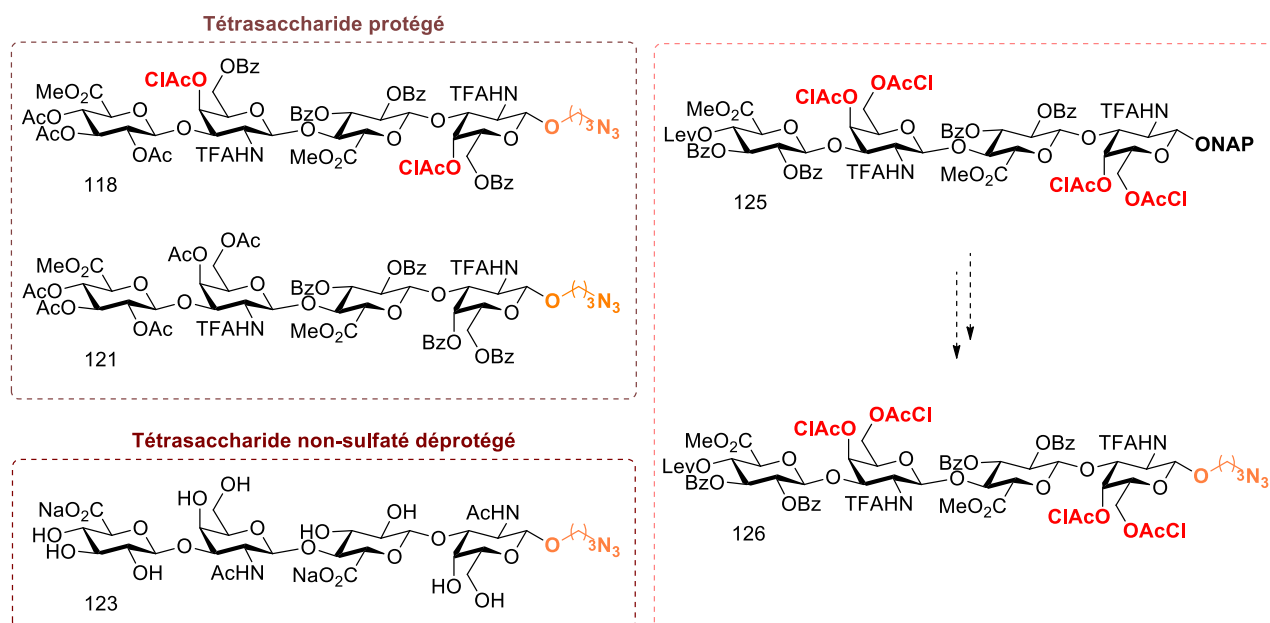


Figure 31 : Résumé des tétrasaccharides synthétisés.

A ce stade, nous n'avons donc pas réussi à synthétiser les tétrasaccharides déprotégés sulfatés en raison de plusieurs étapes limitantes dont la chloroacétylation et la [2+2]. Les blocs disaccharidiques étant trop long à obtenir, nous avons décidé de mettre en pause cette synthèse. Afin d'obtenir tout de même de nouveaux oligosaccharides, nous nous sommes penchés sur la synthèse de trisaccharides puisqu'ils présentent l'avantage d'utiliser un monosaccharide disponible au laboratoire. Nous allons donc maintenant nous intéresser à la synthèse des trisaccharides diversement sulfatés.

# SYNTHESE DES TRISACCHARIDES

Les trisaccharides **133-136** diversement sulfatés proviendront de leurs homologues protégés 129-132. Ces trisaccharides résulteront de la glycosylation [2+1] entre le monosaccharide accepteur **128** et un des disaccharides donneurs précédemment synthétisés (**99**, **101**, **103** ou **105**) en fonction du futur motif de sulfatation visé. L'accepteur sera obtenu à partir du monosaccharide activé avec un trichloroacétimide **127** disponible au laboratoire (Schéma 48).

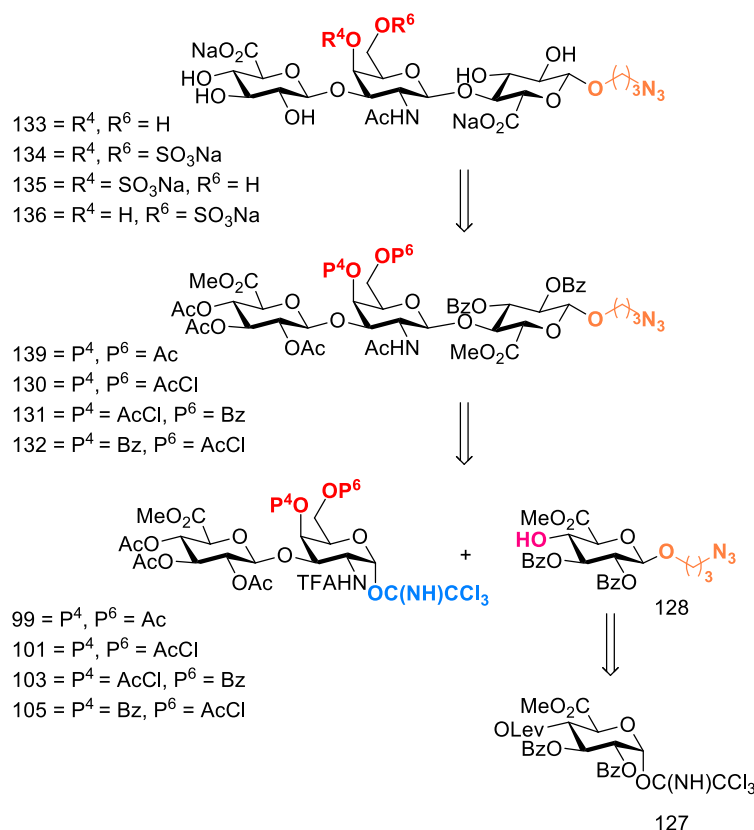


Schéma 48 : Rétrosynthèse des trisaccharides de sulfates de chondroïtine.

## 1. SYNTHESE DU MONOSACCHARIDE ACCEPTEUR 128

Le monosaccharide accepteur **128** a été obtenu en 3 étapes à partir du monosaccharide **127** disponible au laboratoire. Ainsi, une glycosylation avec le 3-bromopropanol suivie d'une S<sub>N</sub>2 avec l'azoture de sodium a conduit au composé **138** avec 74 % de rendement en 2 étapes. La délévulinoylation de ce monosaccharide avec un mélange d'hydrate d'hydrazine/acide acétique/pyridine permet d'obtenir l'accepteur correspondant **128** avec 92 % de rendement (Schéma 49).

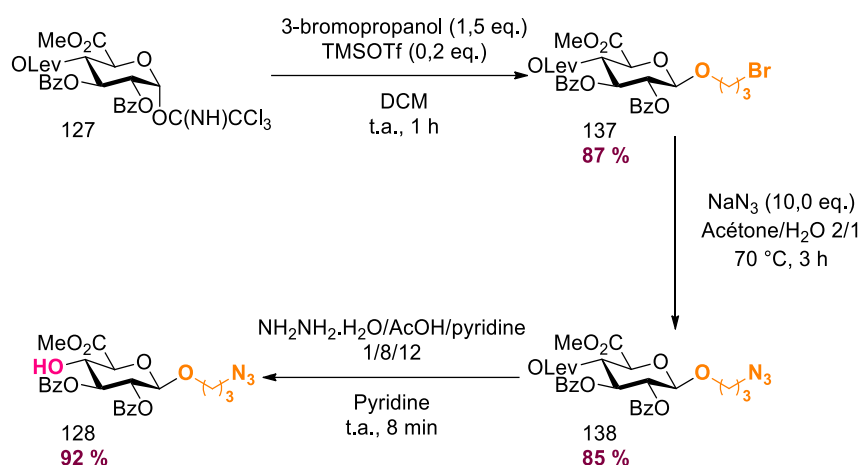


**Schéma 49** : Synthèse du monosaccharide accepteur **128**.

## 2. SYNTHÈSE DU TRISACCHARIDE NON-SULFATE PROTEGE

### 2.1. GLYCOSYLATION [2+1] AVEC L'IMIDATE PER-ACÉTYLE

Afin d'obtenir le trisaccharide non-sulfaté protégé **139**, une réaction de glycosylation [2+1] a été effectuée entre le disaccharide donneur per-acétylé **99** et l'accepteur monosaccharidique **128** (*Schéma 50, Tableau 5*).

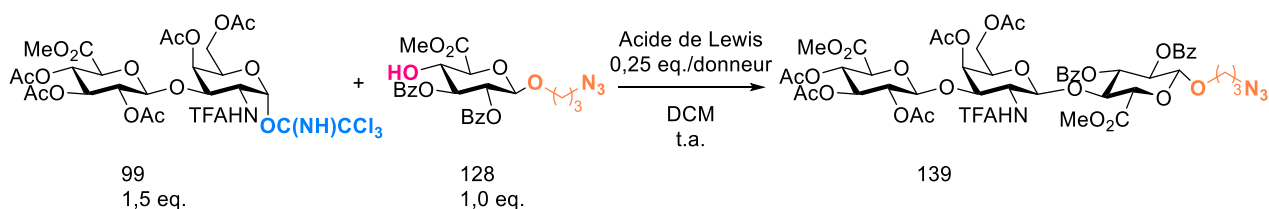


**Schéma 50** : Synthèse du trisaccharide non-sulfaté protégé.

|   | Acide de Lewis                     | Durée  | Rendement |
|---|------------------------------------|--------|-----------|
| 1 | TMSOTf                             | 30 min | 14 %      |
| 2 | TMSOTf                             | 1 h 30 | 18 %      |
| 3 | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O | 30 min | 10 %      |

**Tableau 5** : Conditions utilisées pour la glycosylation des composés **99** et **128**.

Tout d'abord, la réaction a été réalisée en utilisant un excès de donneur (1,5 eq.) et 0,25 équivalents de TMSOTf par donneur pendant 30 min à température ambiante mais, comme pour les tétrasaccharides auparavant, seulement 14 % d'isomère  $\beta$  ont été obtenus (*Tableau 5, entrée 1*). Allonger la durée de la réaction (*entrée 2*) ou changer d'acide de Lewis (*entrée 3*) n'a pas permis

d'augmenter le rendement de réaction. Lors de tous ces essais, de l'accepteur n'ayant pas réagi a été isolé et, dans le cas de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , l'oxazoline **122** a aussi été observée.

Notons que le composé obtenu est bien l'anomère  $\beta$ , comme cela est prouvé par RMN ( $^3J_{1-2} = 8.0 \text{ Hz}$  pour H-1 GalN).

On remarque alors que, comme lors de la glycosylation [2+2] utilisant un accepteur azido, les rendements sont faibles, ce qui questionne sur l'impact du groupement azide sur la glycosylation. Nous avons alors décidé de réaliser un test en utilisant un espaceur plus long de type polyéthylène glycol (PEG), pour « éloigner » le groupement azide de l'alcool accepteur.

De même que précédemment, une glycosylation entre le monosaccharide **127** et le bras polyéthylène glycol-azido (PEG- $\text{N}_3$ ) suivie d'une délévulinoxylation ont été réalisées afin d'obtenir l'accepteur **141** (Schéma 51).

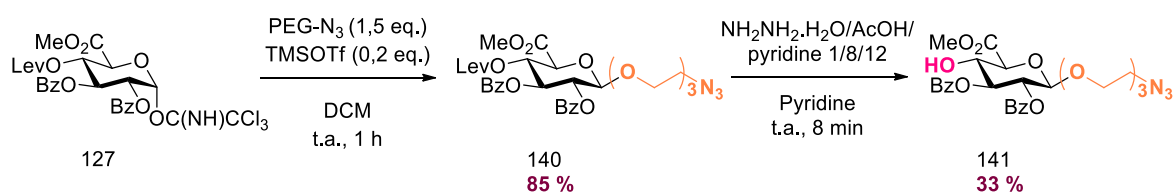


Schéma 51 : Synthèse du monosaccharide accepteur **141**.

Ensuite, la glycosylation de type [2+1] a pu être réalisée avec le même donneur per-acétylé **99** mais, à nouveau, un faible rendement de 16 % a été obtenu en anomère  $\beta$  (Schéma 52).

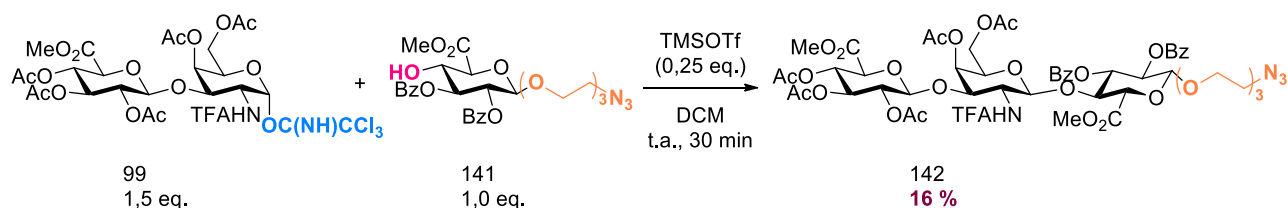


Schéma 52 : Synthèse du trisaccharide **81** portant un PEG- $\text{N}_3$ .

Nous pouvons donc conclure que la longueur de l'espaceur entre le sucre et le groupement azide n'a pas d'influence sur l'efficacité de la glycosylation.

Afin de vérifier que le problème ne vient pas du groupement trifluoroacétylé, un second donneur disponible au laboratoire et dont l'amine est protégée avec un groupement trichloroacétylé a été utilisé. La glycosylation entre l'accepteur **128** et le donneur **143** a conduit à un résultat similaire

(rendement de 14 %) à la réaction utilisant un groupement TFA (Schéma 53). Cela prouve donc que le groupement participant choisi n'influe pas sur l'efficacité de la réaction.

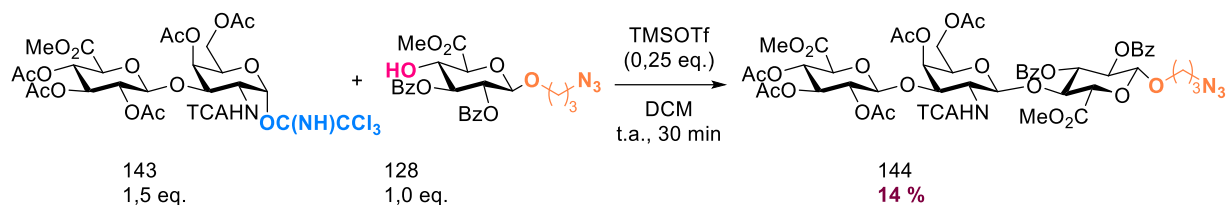


Schéma 53 : Synthèse du trisaccharide **141**.

En résumé, les glycosylations avec un accepteur portant un groupement azide sur l'aglycone posent problème et conduisent à de mauvais rendements. Il a donc été nécessaire de trouver une voie alternative qui permettrait d'introduire la fonction azide après avoir glycosylé afin d'obtenir les trisaccharides désirés.

## 2.2. NOUVELLE STRATEGIE DE SYNTHÈSE DU TRISACCHARIDE NON-SULFATE

Deux voies sont envisagées afin d'introduire le groupement azide après avoir construit le motif trisaccharidique. La première voie passe par le 2-naphtylméthyle et la seconde par le dérivé bromé (Schéma 54).

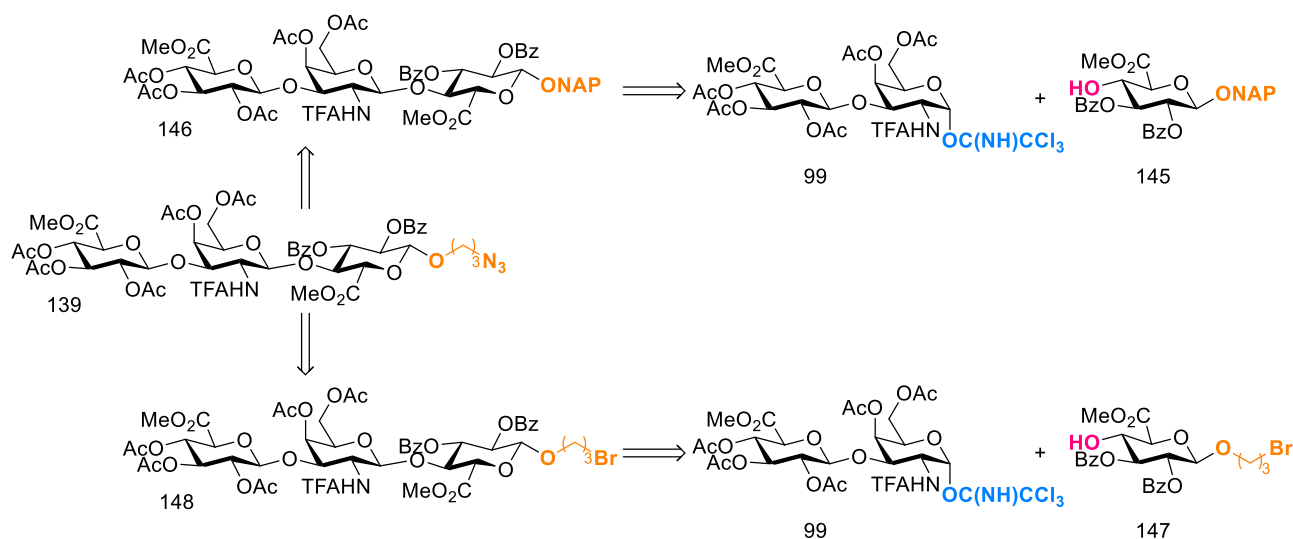


Schéma 54 : Voies alternatives permettant de synthétiser le trisaccharide **139**.

## A- A PARTIR DU TRISACCHARIDE NAP

### SYNTHÈSE DE L'ACCEPTEUR

A partir de l'imidate **127**, une glycosylation avec le 2-naphtalénométhanol suivie d'une délévulinoylation permettent d'obtenir l'accepteur **145** avec 81 % de rendement sur deux étapes (Schéma 55).

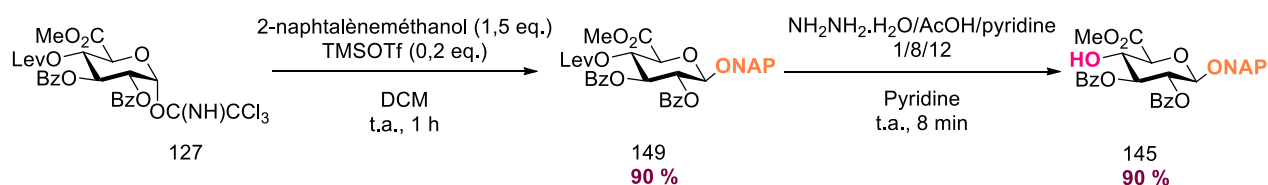


Schéma 55 : Synthèse de l'accepteur **145** portant le NAP comme aglycone.

### GLYCOSYLATION [2+1]

La glycosylation [2+1] entre le disaccharide per-acétylé **99** et l'accepteur **145** a ensuite été testée (Schéma 56, Tableau 6). Les isomères  $\alpha$  et  $\beta$  ont été obtenus ce qui n'est pas surprenant puisque ce problème de sélectivité a déjà été observé lors de glycosylations avec des oligosaccharides de CS dont l'amine est protégée par un groupement trifluoroacétylé.<sup>105</sup> Cependant, le ratio en composés  $\alpha/\beta$  n'a pas pu être calculé sur les produits bruts mais les deux anomères ont pu être séparés *via* colonne chromatographique.

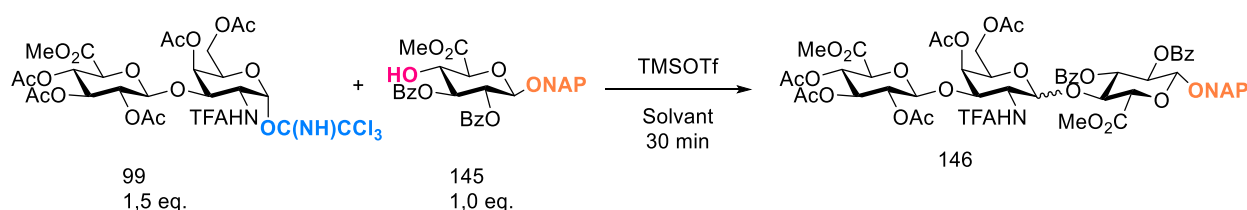


Schéma 56 : Synthèse du trisaccharide **146** portant le groupement NAP.

<sup>105</sup> Ramadan, S.; Li, T.; Yang, W.; Zhang, J.; Rashidijahanabad, Z.; Tan, Z.; Parameswaran, N.; Huang, X. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 913–920.

|                | TMSOTf<br>(eq./donneur) | Solvant        | T°C         | Durée         | $\alpha/\beta$          | Rendement<br>en <b>146</b> ( $\beta$ ) | Rendement<br>global     |
|----------------|-------------------------|----------------|-------------|---------------|-------------------------|----------------------------------------|-------------------------|
| 1              | 0,25                    | DCM            | t.a.        | 30 min        | 1/2,1                   | 34 %                                   | 50 % <sup>a</sup>       |
| 2              | 0,15                    | DCM            | t.a.        | 30 min        | 1/3,4                   | 37 %                                   | 48 %                    |
| 3              | 0,15                    | DCM            | 0 °C        | 30 min        | n.d. <sup>2</sup>       | 30 %                                   | n.d. <sup>2</sup>       |
| 4              | 0,15                    | ACN            | t.a.        | 1 h           | 1/1,4                   | 19 %*                                  | 32 %*                   |
| 5              | <b>0,15</b>             | <b>Toluène</b> | <b>t.a.</b> | <b>30 min</b> | <b>n.d.<sup>2</sup></b> | <b>45 %</b>                            | <b>n.d.<sup>2</sup></b> |
| 6 <sup>1</sup> | 0,25                    | Toluène        | t.a.        | 30 min        | n.d. <sup>2</sup>       | 32 %*                                  | n.d. <sup>2</sup>       |

**Tableau 6** : Optimisation de la réaction de glycosylation donnant le trisaccharide **146**.

<sup>1</sup> : 1,0 eq. de donneur et 1,5 eq. d'accepteur ; <sup>2</sup> non déterminé car fractions impures ; <sup>a</sup> glycal **91** isolé ; \* impur.

Plusieurs paramètres ont été étudiés : la température, le solvant, la durée de la réaction ainsi que le nombre d'équivalents de TMSOTf par rapport au donneur. Dans les conditions de réactions utilisées pour les précédentes [2+1], un mélange de diastéréoisomères  $\alpha/\beta$  en ratio 1/2,1 a été obtenu avec 50 % de rendement. Les deux isomères sont séparables et 34 % de composé  $\beta$  ont été isolés (*Tableau 6, entrée 1*). Le glycal **91** a également été isolé comme cela a été prouvé par RMN <sup>1</sup>H (H-1 GalN singulet à 7,33 ppm et pas de H-2 GalN), <sup>13</sup>C (C-1 GalN à 142,0 ppm et C-2 GalN à 109,3 ppm) et HRMS (*Figure 32*). Le nombre d'équivalents de TMSOTf a été diminué à 0,15 eq. et, dans ce cas, le rendement n'a pas réellement été impacté mais la proportion de trisaccharide  $\alpha$  isolé était moins importante (*entrée 2*). C'est pourquoi le nombre d'équivalents a été fixé à 0,15 pour la suite des tests. Abaisser la température à 0 °C a diminué le rendement de réaction à 30 % (*entrée 3*). Deux autres solvants ont ensuite été testés (acétonitrile et toluène) mais seul le toluène a donné des résultats intéressants, permettant d'augmenter le rendement en  $\beta$  à 45 % (*entrées 4 et 5*). Finalement, un dernier essai a été réalisé en inversant les équivalents de donneur et d'accepteur, plaçant désormais le monosaccharide en excès (*entrée 6*). Cependant, ce résultat n'a pas été concluant, et le composé désiré n'a pas pu être isolé pur.

Finalement, les meilleures conditions retenues correspondent à l'*entrée 5* : 1,5 eq. de disaccharide donneur **99** et 1,0 eq. de monosaccharide accepteur **145** avec 0,15 eq. de TMSOTf dans le toluène pendant 30 min à température ambiante.



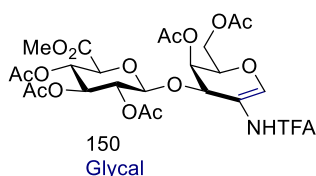


**Figure 32** : Sous-produit obtenu lors de la glycosylation de **99** et **145**.

#### INTRODUCTION DU BRAS AZIDOPROPYLE

Afin d'introduire le groupement azide, le NAP a été déprotégé avec du DDQ dans un mélange DCM/MeOH pour synthétiser le trisaccharide **151** correspondant avec 68 % de rendement. Celui-ci a ensuite été activé par le trichloroacétonitrile et le DBU afin d'obtenir le trisaccharide **152** avec 78 % de rendement. La glycosylation a pu être effectuée avec l'azidopropanol et le trisaccharide non-sulfaté protégé **138** portant le bras azidopropyle a été obtenu avec 59 % de rendement (Schéma 57). Il est à noter que seul l'anomère  $\beta$  a été obtenu ( $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz).

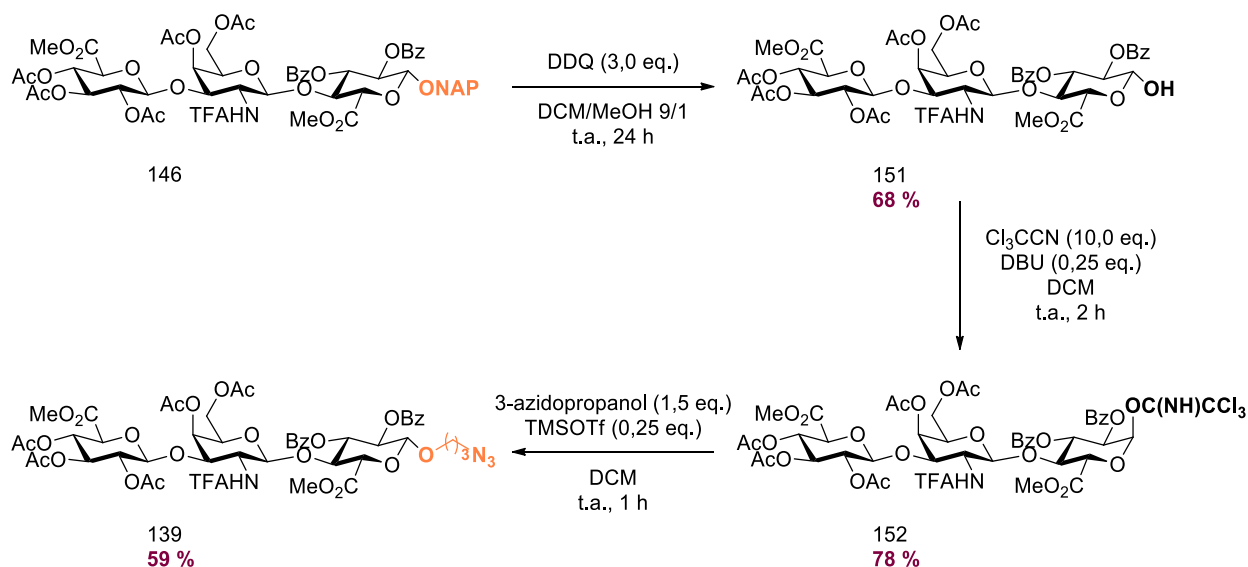


**Schéma 57** : Synthèse du trisaccharide **139** à partir du trisaccharide **146**.

Ainsi, cette stratégie de synthèse est efficace puisqu'elle permet d'obtenir le trisaccharide non-sulfaté protégé **139** portant le bras azidopropyle avec un rendement global de 14 % sur 4 étapes.

#### B- A PARTIR DU TRISACCHARIDE PORTANT LE BROMOPROPYLE

Afin d'obtenir le trisaccharide **139**, nous avons également exploré une voie passant par le dérivé bromé.

## SYNTHESE DE L'ACCEPTEUR

A partir du composé **137** obtenu précédemment, une délévulinoylation a permis d'obtenir l'accepteur **147** avec 85 % de rendement (Schéma 58).

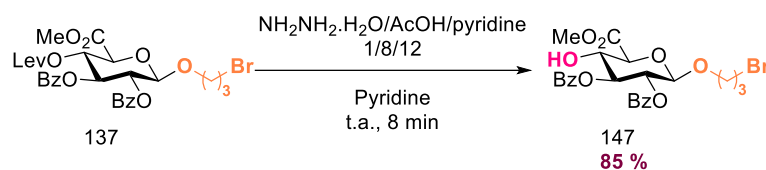


Schéma 58 : Synthèse de l'accepteur bromé **147**.

## GLYCOSYLATION [2+1]

La réaction de glycosylation entre l'accepteur bromé **147** et le donneur peracétylé **99** permettant d'obtenir le trisaccharide **148** a été étudiée (Schéma 59, Tableau 7). Comme précédemment, les trisaccharides  $\alpha/\beta$  synthétisés ont pu être séparés *via* colonne chromatographique mais le composé  $\alpha$  n'a pas toujours été isolé pur car son rapport frontal est proche de celui des autres sous-produits. De plus, moins de composé  $\alpha$  a été observé. C'est pourquoi les rendements globaux ainsi que les ratios  $\alpha/\beta$  ne sont pas indiqués.

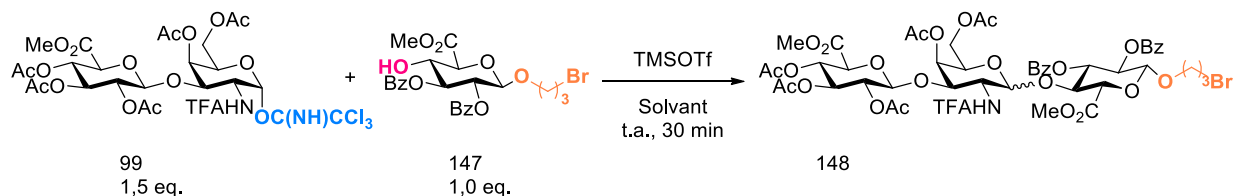


Schéma 59 : Synthèse du composé **148**.

|                | TMSOTf<br>(eq./donneur) | Solvant | Durée  | Rendement<br>en <b>148</b> ( $\beta$ ) | Sous-produits<br>observés |
|----------------|-------------------------|---------|--------|----------------------------------------|---------------------------|
| 1              | 0,25                    | DCM     | 30 min | 43 %                                   | Glycal <b>150</b>         |
| 2              | 0,25                    | DCM     | 45 min | 37 %                                   | /                         |
| 3 <sup>1</sup> | 0,25                    | DCM     | 1 h    | 29 %*                                  | /                         |
| 4 <sup>1</sup> | 0,25                    | Toluène | 1 h    | 44 %*                                  | /                         |
| 5              | 0,15                    | DCM     | 30 min | 31 %                                   | Oxazoline <b>122</b>      |
| 6              | 0,15                    | Toluène | 30 min | 38 %                                   | Oxazoline <b>122</b>      |

Tableau 7 : Optimisation de la réaction de glycosylation donnant le trisaccharide **148**.

<sup>1</sup> 1,0 éq. de donneur et 1,5 éq. d'accepteur, \* impur.

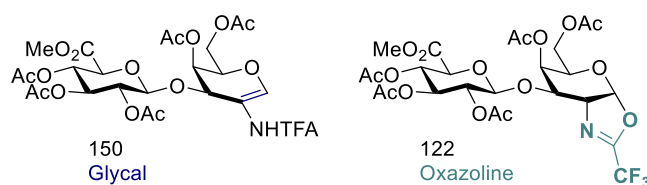


**Figure 33** : Sous-produit obtenu lors de la glycosylation de **99** et **147**.

Dans les conditions de réactions utilisées pour les glycosylations avec le groupement azide, un mélange de diastéréoisomères  $\alpha/\beta$  a été obtenu tout comme le glycal **150**. Le composé  $\beta$  a été isolé avec 43 % de rendement (*Tableau 7, entrée 1*). Allonger la durée de la réaction (*entrée 2*) ou inverser les équivalents des partenaires de glycosylation en mettant l'accepteur en excès que ce soit dans le DCM ou le toluène (*entrées 3 et 4*) n'a pas permis d'améliorer le rendement. Lorsque la quantité de TMSOTf a été abaissée à 0,15 eq., l'oxazoline **122** a été identifiée et seulement 31 % de composé  $\beta$  ont été isolés (*entrée 5*). Les conditions optimales (0,15 eq. de TMSOTf dans le toluène) utilisées pour le trisaccharide **146** portant le NAP n'ont pas permis ici d'améliorer le rendement de 43 % obtenu en premier lieu (*entrée 6*).

Finalement, le meilleur rendement a été obtenu en utilisant 1,5 eq. de disaccharide **99** et 1,0 eq. de monosaccharide **147** avec 0,25 eq. de TMSOTf dans le DCM pendant 30 min à température ambiante (*entrée 1*).

### SYNTHÈSE DU TRISACCHARIDE **139**

A partir du trisaccharide bromé, une substitution nucléophile de type  $S_N2$  a été réalisée avec l'azoture de sodium. Le trisaccharide **139** désiré a été obtenu avec 74 % de rendement (*Schéma 60*).

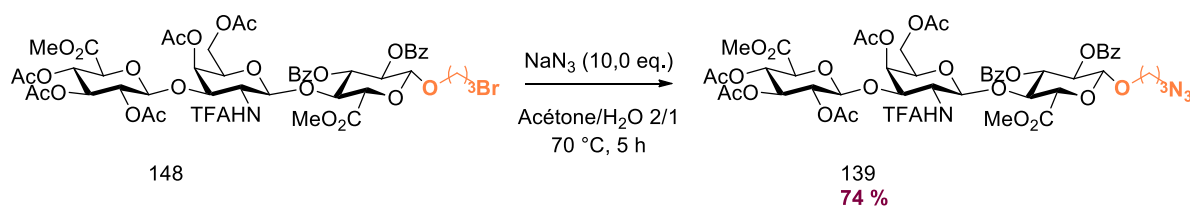


**Schéma 60** : Introduction du groupement azide.

Cette seconde stratégie a également permis d'atteindre l'objectif en synthétisant le composé **139** avec un rendement global de 32 % en 2 étapes.

## 2.3. COMPARAISON DES STRATEGIES

La synthèse du trisaccharide **139** peut ainsi être réalisée *via* deux stratégies différentes (Schéma 61). D'un côté, le composé a été obtenu à partir de l'accepteur **145** portant le 2-naphtylméthyle en 4 étapes avec 14 % de rendement. De l'autre côté, le composé a été obtenu à partir de l'accepteur bromé **147** en deux étapes avec 32 % de rendement. La voie utilisant l'accepteur bromé nécessite moins d'étapes et génère moins de composé  $\alpha$  lors de la glycosylation. Cette voie sera donc retenue pour la synthèse des analogues sulfatés.

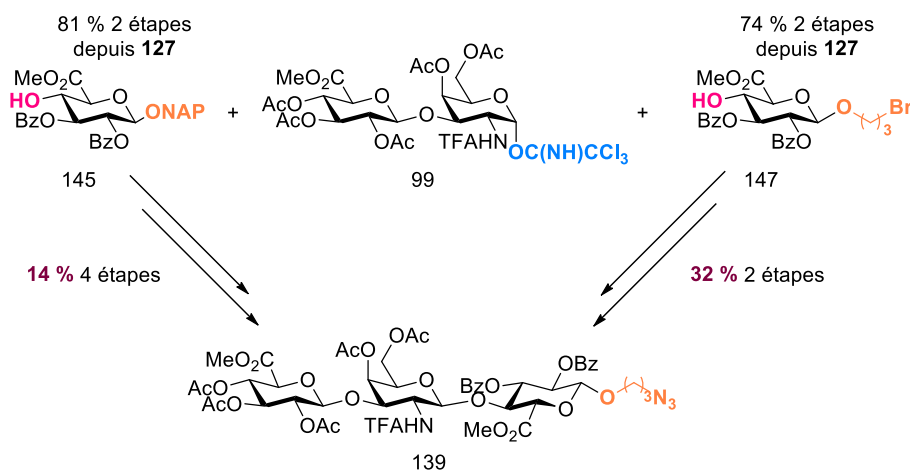
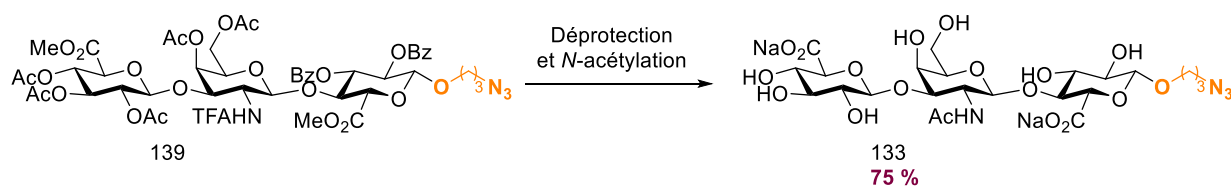


Schéma 61 : Bilan et comparaison des deux stratégies de synthèse pour obtenir le composé **139**.

## 2.4. DEPROTECTION DU TRISACCHARIDE NON-SULFATE

Les composés **139** synthétisés selon les deux voies ont été rassemblés et engagés dans la réaction de déprotection pour obtenir le trisaccharide non-sulfaté **133** avec 75 % de rendement (Schéma 62).



Conditions de déprotection :  $\text{LiO}_2\text{H}$  (10,0 eq., 5,0 eq. par  $\text{CO}_2\text{Me}$ ), THF/ $\text{H}_2\text{O}$  3/1, 0 °C  $\rightarrow$  t.a., 24 h ; puis NaOH 4M (135,0 eq., 15,0 eq. par ester), MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  3/1, t.a., 72 h.

Conditions de N-acétylation :  $\text{Ac}_2\text{O}$  (20,0 eq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (13,0 eq.) MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  4/1, 0 °C  $\rightarrow$  t.a., 4 h.

Schéma 62 : Déprotection du trisaccharide **139**.

### 3. SYNTHÈSE DES TRISACCHARIDES DIVERSEMENT SULFATES

La stratégie mise au point pour la synthèse du trisaccharide non-sulfaté va être appliquée pour la série des trisaccharides sulfatés. Cependant, les groupements orthogonaux en position 4 et 6 doivent être compatibles avec la  $SN_2$  ( $Br \rightarrow N_3$ ), ce qui n'est pas le cas des chloroacétates initialement envisagés. En effet, une  $SN_2$  a été testée sur le disaccharide **153** portant des chloroacétates et le bras bromopropyle (*Schéma 63*). Nous avons pu observer un échange total des chlores et du brome par le groupement azide. Cela a pu être confirmé par RMN  $^{13}C$  (plus de  $CH_2Cl$  à 40 ppm au profit de nouveaux  $CH_2N_3$  à 50 ppm) ainsi que par HRMS.

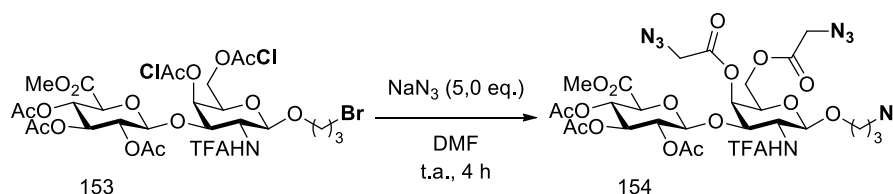


**Schéma 63** : Test de substitution du brome par l'azoture de sodium en présence de chloroacétates.

Nous avons donc dû réfléchir à l'utilisation de nouveaux groupements protecteurs sur les positions 4 et/ou 6 de GalN compatibles avec notamment la substitution nucléophile.

#### 3.1. SYNTHÈSE DES DONNEURS

##### *A- PROTECTION DES POSITIONS 4 ET/OU 6 DE LA D-GALN*

Nous avons choisi d'utiliser le groupement lévulinoyle comme groupement protecteur orthogonal. En effet, celui-ci a déjà été utilisé au laboratoire pour protéger des positions les positions 4 et/ou 6 de manière sélective d'un D-galactose.<sup>106</sup> Ainsi, à partir du diol **96**, les trois disaccharides **155**, **156** et **157** protégés en 4 et/ou en 6 par un groupement lévulinoyle (Lev) ont été obtenus (*Schéma 64*). Le disaccharide **155** a été obtenu après une double lévulinoylation sur les positions 4 et 6 de la GalN avec un excès d'acide lévulinique pendant 4 h. Le disaccharide **156** a été obtenu par la benzylation régiosélective de la position 6 suivie de la lévulinoylation de la position 4 avec 77 % de rendement sur deux étapes. Afin d'obtenir le disaccharide **157**, 1,1 équivalents d'acide lévulinique et de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ont été utilisés ce qui a conduit à un mélange de composés 6- et 4,6-

<sup>106</sup> a) Jacquinet, J.-C. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339, 349–359. ; b) Jacquinet, J.-C. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1630–1644.

Lev et de diol en seulement 1 h 30. Afin d'augmenter la régiosélectivité en position 6, la réaction a été réalisée à nouveau avec le même nombre d'équivalents mais cette fois-ci à 0 °C. A nouveau, le diol n'a pas été entièrement consommé mais le composé désiré a été majoritairement formé. Une purification par colonne chromatographique permet d'isoler le diol mais les rapports frontaux des composés 6 et 4,6-Lev formés sont trop proches pour rendre possible leur séparation. C'est pourquoi la benzoylation a été réalisée sur le mélange de ces deux disaccharides et les composés **155** et **157** ont ensuite pu être séparés par colonne chromatographique. Le disaccharide 6-Lev **157** a finalement été obtenu avec 53 % de rendement sur deux étapes.

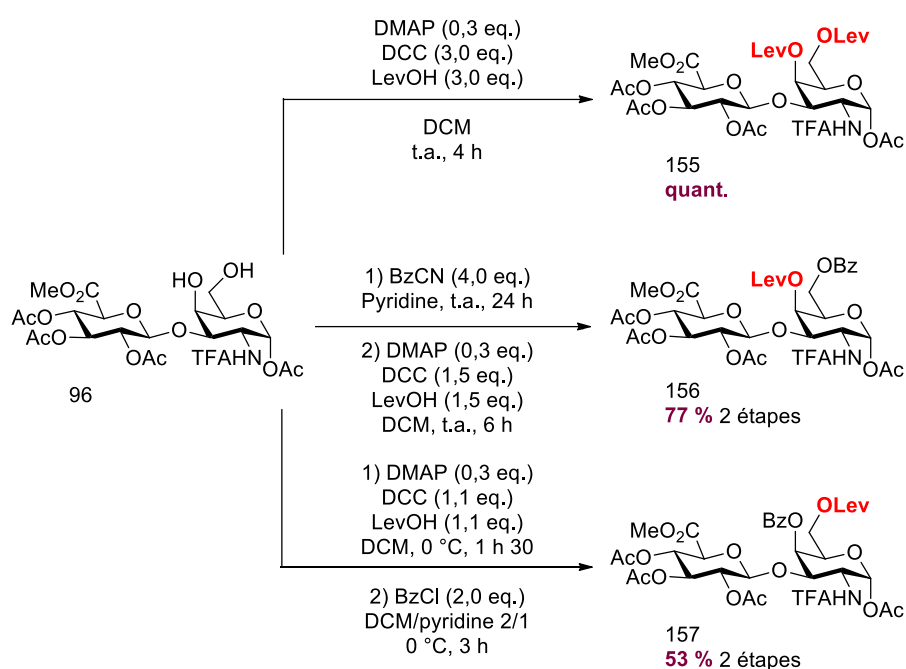


**Schéma 64** : Protection des positions 4 et/ou 6 de la D-GalN avec des esters lévulinoates.

#### B- ACTIVATION DE LA POSITION ANOMERE

Une fois les disaccharides protégés obtenus, l'activation par un trichloroacétimide a été explorée. Cependant, la présence du Lev ne permet pas l'utilisation de l'acétate d'hydrazine. Une nouvelle méthode doit donc être utilisée pour déprotéger l'acétate anomère. Nous avons alors choisi trois autres méthodes : les triflates de lanthanides ( $\text{Ln}(\text{OTf})_3$ ), la diméthylaminopropylamine (DMAPA) et la benzylamine ( $\text{BnNH}_2$ ). Ces méthodes présentent l'avantage qu'elles se réalisent dans des solvants plus volatiles que le *N,N*-diméthylformamide à savoir le méthanol et le tétrahydrofurane.

### METHODE AVEC LES TRIFLATES DE LANTHANIDES ( $\text{Ln}(\text{OTf})_3$ )

La première méthode testée correspond aux triflates de lanthanides  $\text{Ln}(\text{OTf})_3$  qui réagissent à température ambiante, dans le méthanol. Ils ont été utilisés sur différents monosaccharides dont des acides glucuroniques.<sup>107</sup> Plusieurs triflates de lanthanides peuvent être utilisés mais nous avons choisi de tester le samarium Sm. Dans un premier temps, la réaction a été essayée sur le disaccharide **63** portant le benzylidène mais deux fractions impures ont été récupérées : le produit désiré **158** ainsi qu'un sous-produit **159** correspondant à la perte de l'acétal qui n'a donc pas résisté à l'acidité du réactif (Schéma 65). Le rendement de la réaction n'a pas pu être déterminé. Puis, le composé 4,6-Lev **155** a été mis en réaction pendant 16 h avec  $\text{Sm}(\text{OTf})_3$  dans le méthanol (Schéma 65). Du produit de départ a été récupéré, montrant que la réaction n'était pas totale, et le bon produit a été récupéré avec un rendement inférieur à 48 % (présence d'impuretés non identifiées). En effet, les RMNs  $^{19}\text{F}$  et  $^{13}\text{C}$  montrent clairement la présence de plusieurs produits qui n'ont pas pu être séparés ni identifiés. Cette méthode n'a donc pas été retenue.

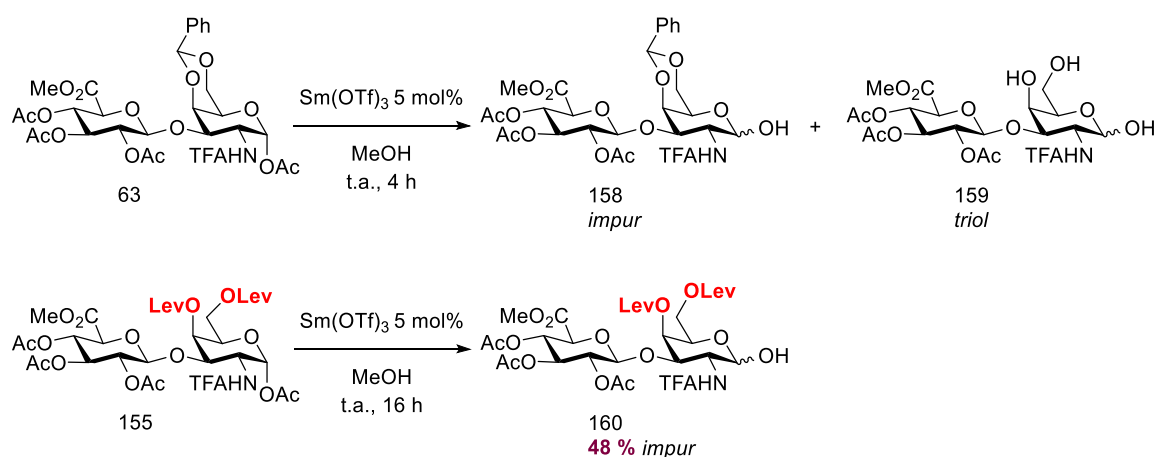


Schéma 65 : Tests de déprotection de l'acétate anomère avec les triflates de lanthanides.

### METHODE AVEC LA DIMETHYLAMINOPROPYLAMINE (DMAPA)

La DMAPA est un réactif décrit pour permettre la désacétylation sélective de l'acétate anomère de manière rapide, efficace et peu onéreuse sur différents sucres diversement protégés. De plus, le sous-produit *N*-acétylé **161** formé peut être facilement éliminé par un lavage aqueux acide (Figure 34).<sup>108</sup>

<sup>107</sup> Tran, A. T.; Deydier, S.; Bonnafe, D.; Le Narvor, C. *Tetrahedron Letters* **2008**, 49, 2163–2165.

<sup>108</sup> Andersen, S. M.; Heuckendorff, M.; Jensen, H. H. *Org. Lett.* **2015**, 17, 944–947.

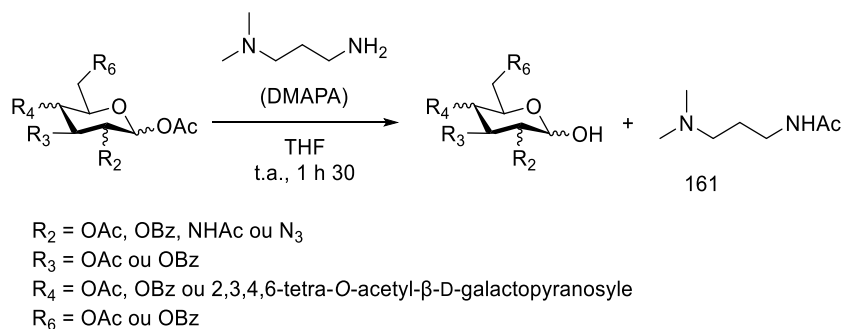


**Figure 34** : Exemples de déprotection de l'acétate anomère avec la DMAPA.<sup>107</sup>

Nous avons testé ce réactif sur deux disaccharides de CS disponibles en grande quantité afin de voir si elle pouvait être appliquée aux composés lévulinoylés ensuite (*Schéma 66*). Le DMAPA a été mis en réaction avec le disaccharide **63** mais la CCM de suivi de réaction a montré plusieurs tâches et seulement 47 % d'hémiacétal impur ont été isolés après colonne chromatographique. Enfin, la réaction a été réalisée sur le disaccharide per-acétylé disponible **162** suivie de l'activation par le trichloroacétonitrile en présence de DBU afin d'obtenir le disaccharide activé **143** avec un rendement de 22 % sur 2 étapes. En raison de ce faible rendement, aucun test n'a été réalisé sur les disaccharides lévulinoylés.

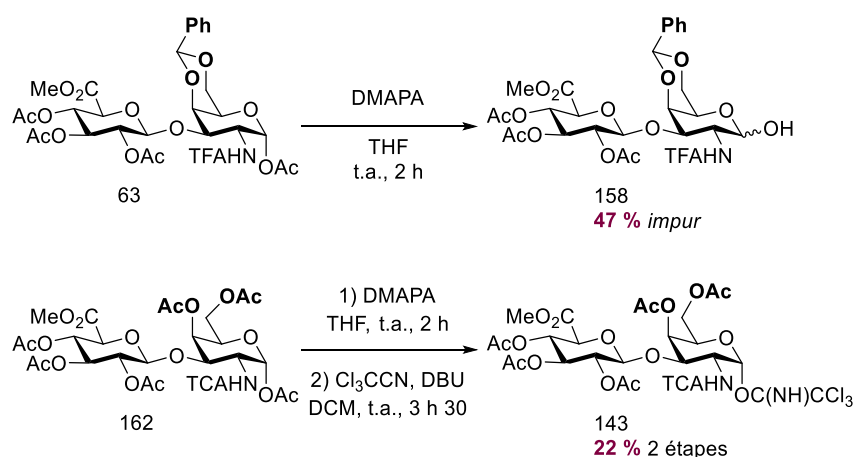


**Schéma 66** : Tests de déprotection de l'acétate anomère avec la DMAPA.

#### METHODE AVEC LA BENZYLAMINE (BNNH<sub>2</sub>)

La troisième méthode envisagée utilise la benzylamine.<sup>109</sup> Contrairement à l'approche avec le DMAPA, celle-ci engendre la formation de benzylacétamide qui ne peut être éliminé que par colonne

<sup>109</sup> a) Makino, A.; Kurosaki, K.; Ohmae, M.; Kobayashi, S. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 950–957. ; b) Huang, Y.; Shaw, M. A.; Mullins, E. S.; Kirley, T. L.; Ayres, N. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4455–4466.



chromatographique. Un premier essai a été effectué sur le disaccharide per-acétylé disponible **162** suivie de l'activation par le trichloroacétonitrile afin d'obtenir le disaccharide désiré avec un bon rendement de 63 % après deux étapes (*Schéma 67*). Aucune purification intermédiaire de l'hémiacétal n'a été réalisée ce qui montre que le benzylacétamide formé ne gêne pas la réaction avec le trichloroacétonitrile et le DBU. Nous pouvons noter que le benzylacétamide est séparable de l'imide par chromatographie.

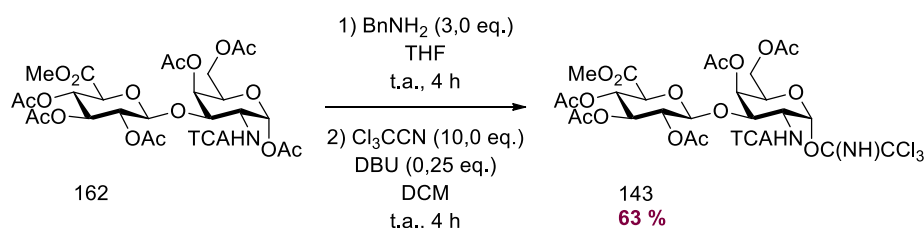


**Schéma 67** : Synthèse du composé **143** via la méthode avec la benzylamine.

Cette méthode a donc finalement été appliquée aux disaccharides protégés par des groupements Lev. Les composés 4,6-Lev **163**, 4-Lev **164** et 6-Lev **165** ont ainsi été obtenus avec des rendements respectifs de 47, 52, et 47 % sur deux étapes (*Schéma 68*).

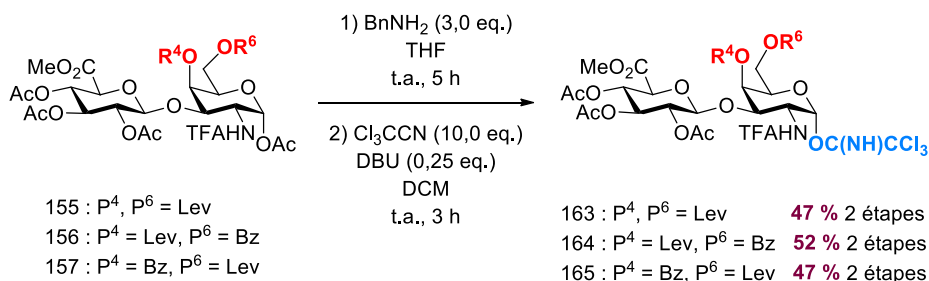


**Schéma 68** : Synthèse des disaccharides donneurs **163-165**.

Nous pouvons noter que, pour les composés 4- et 6-Lev, l'intermédiaire hémiacétal n'a pas été purifié puisqu'à nouveau le benzylacétamide a été séparable de l'imide par chromatographie. Cependant, le donneur 4,6-Lev **163** a, quant à lui, été plus difficile à obtenir pur : le composé final étant plus polaire que les précédents, il s'est avéré plus difficile à séparer du benzylacétamide. Plusieurs essais de purification (différents éluants, colonne C18) ont été effectués après déprotection de l'acétate anomère mais n'ont pas été efficaces. En se basant sur la différence de masse molaire entre le benzylacétamide et l'hémiacétal, la purification par exclusion stérique (Sephadex LH-20, DCM/MeOH 1/1) a été considérée et s'est révélée être un bon outil de séparation de ces deux composés.

En raison de la difficulté à purifier le disaccharide donneur 4,6-Lev **163**, une voie alternative a été envisagée en parallèle afin de contourner ce problème de purification.

#### C- A PARTIR DU DISACCHARIDE 68 PORTANT LE 2-NAPHTHYLMETHYLE

Comme nous l'avons déjà vu plus tôt dans ce manuscrit, le groupement naphthylméthyle peut être utilisé comme un groupement protecteur temporaire de la position anomère car il peut être déprotégé sélectivement. En effet, au départ du disaccharide **68**, le benzylidène a d'abord été déprotégé pour donner le diol **166** avec 84 % de rendement puis la dilévulinoylation a été réalisée afin d'obtenir le composé **167** avec 69 % de rendement. La déprotection du NAP suivie de l'activation de la position anomère sous forme de trichloroacétimide a permis de retrouver le composé **163** avec 49 % de rendement sur deux étapes (*Schéma 69*). Cette synthèse permet d'accéder facilement au disaccharide désiré mais comporte des étapes supplémentaires.

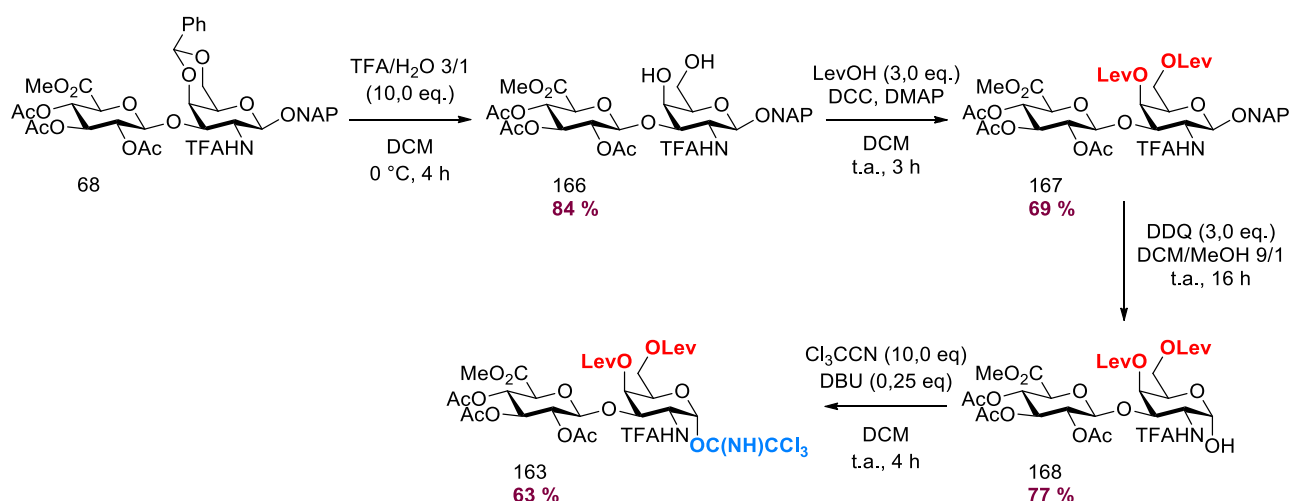


**Schéma 69** : Synthèse du donneur **163** via le composé portant le groupement 2-naphtylméthyle.

### 3.2. SYNTHÈSE DES TRISACCHARIDES PROTÉGÉS

Les donneurs protégés par des groupements Lev ainsi obtenus vont pouvoir être engagés dans une glycosylation avec le monosaccharide accepteur bromé (*Schéma 70, Tableau 8*). Comme précédemment, les trisaccharides  $\alpha/\beta$  synthétisés ont pu être séparés *via* colonne chromatographique mais le composé  $\alpha$  n'a pas toujours été isolé pur car son rapport frontal est proche de celui des autres sous-produits.

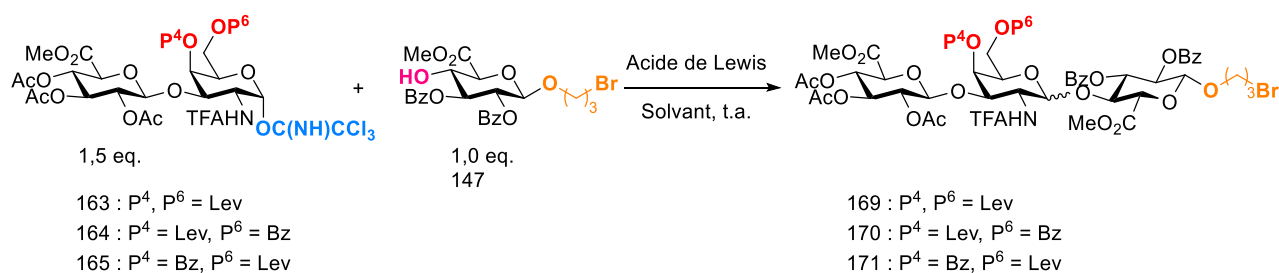


**Schéma 70** : Glycosylation des disaccharides donneurs **163-165** et du monosaccharide accepteur **147**.

|                  | Donneur    | Acide de Lewis<br>(eq./donneur)               | Solvant | Durée  | Ratio<br>$\alpha/\beta$ | Rendement $\beta$ | Rendement global  |
|------------------|------------|-----------------------------------------------|---------|--------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| 1                | 4-Lev      | TMSOTf (0,25 eq.)                             | DCM     | 1 h    | 1/5,25                  | 32 %              | 38 % <sup>a</sup> |
| 2                |            | TMSOTf (0,15 eq.)                             | DCM     | 30 min | 1/3                     | 24 %              | 32 % <sup>a</sup> |
| 3                |            | TMSOTf (0,15 eq.)                             | Toluène | 30 min | n.d.                    | 21 %              | n.d. <sup>a</sup> |
| 4 <sup>1</sup>   | <b>164</b> | TMSOTf (0,25 eq.)                             | DCM     | 1 h    | 1/2                     | 23 %              | 34 %              |
| 5 <sup>1</sup>   |            | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O (0,25 eq.) | DCM     | 1 h    | 1/2,2                   | 17 %              | 25 %              |
| 6 <sup>1,2</sup> |            | BF <sub>3</sub> .Et <sub>2</sub> O (0,25 eq.) | DCM     | 2 h    | 1/5,3                   | 29 %              | 35 %              |
| 7                | 6-Lev      | TMSOTf (0,25 eq.)                             | DCM     | 1 h    | n.d.                    | 29 %              | n.d.              |
| 8                | <b>165</b> | TMSOTf (0,15 eq.)                             | DCM     | 1 h    | n.d.                    | 36 %              | n.d.              |
| 9                | 4,6-Lev    | TMSOTf (0,25 eq.)                             | DCM     | 1 h    | 1/1,5                   | 20 %              | 38 % <sup>b</sup> |
| 10               | <b>163</b> | TMSOTf (0,15 eq.)                             | DCM     | 1 h    | 1/2,6                   | 35 %              | 49 %              |

**Tableau 8** : Optimisation des réactions de glycosylation [2+1] des donneurs **162-165** et de l'accepteur **147**.

<sup>1</sup> 1,5 équivalents d'accepteur et 1,0 équivalent de donneur ; <sup>2</sup> - 60 °C jusqu'à - 20 °C ; <sup>a</sup> glycal **172** obtenu ; <sup>b</sup> glycal **173** obtenu.

Tout d'abord, la réaction de glycosylation a été optimisée avec le donneur 4-Lev **164**. La réaction a d'abord été effectuée dans les conditions optimisées pour le trisaccharide non-sulfaté per-acétylé **148** mais seulement 32 % de composé  $\beta$  ( $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz) ont été obtenus (*Tableau 8, entrée 1*). Diminuer le nombre d'équivalents de TMSOTf n'a pas permis d'augmenter le rendement, que ce soit dans le DCM ou le toluène (*entrées 2 et 3*). Ensuite, l'accepteur a été mis en excès mais le ratio  $\alpha/\beta$  était moins bon (*entrée 4*). Enfin, un changement d'acide de Lewis a été effectué mais le rendement s'est trouvé diminué, que ce soit à température ambiante ou à basse température (*entrées 5 et 6*). Lors de ces différents tests, le glycal **172** a également été isolé comme l'ont confirmé la RMN et la masse (*Figure 35*). Finalement, les meilleures conditions correspondent à l'entrée 1 : 1,5 eq. de disaccharide **164** et

1,0 eq. de monosaccharide **147** avec 0,25 eq. de TMSOTf par imidate dans le DCM pendant 1 h à température ambiante.

Ces conditions ont ensuite été appliquées aux donneurs 6-Lev et 4,6-Lev. Pour le composé 6-Lev, 29 % de trisaccharide  $\beta$  ( $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz) ont été isolés et ce rendement a pu être amélioré en diminuant le nombre d'équivalents de TMSOTf à 0,15 eq. par donneur et 36 % ont alors été obtenus (*entrées 7 et 8*). L'anomère  $\alpha$  et le glycal dérivant du disaccharide **165** n'ont pas été isolés, seul un mélange complexe a été obtenu en plus de l'anomère  $\beta$  désiré. Pour le composé 4,6-Lev, 0,25 équivalents de TMSOTf dans le DCM à température ambiante pendant 1 h ont d'abord été utilisés et 20 % en composé  $\beta$  ont été obtenus ( $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz) (*entrée 9*). Le rendement et le ratio  $\alpha/\beta$  ont pu être améliorés en diminuant le nombre d'équivalents de TMSOTf à 0,15 eq. par donneur puisque 35 % de trisaccharide **169**  $\beta$  ont été obtenus dans ces conditions. Lors de ces deux tests, le glycal 4,6-Lev **173** a été obtenu et les RMN ainsi que la masse ont pu le confirmer (*Figure 35*).

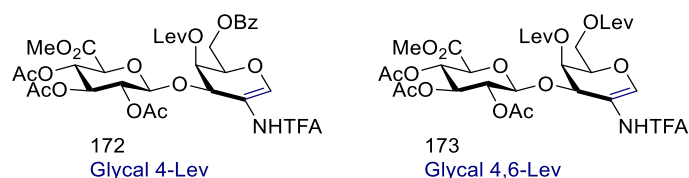


**Figure 35** : Sous-produits observés lors des glycosylations avec les donneurs lévulinoylés.

Enfin, l'échange brome/azide a pu être réalisé afin d'obtenir les trisaccharides azidopropyles désirés avec de bons rendements allant de 88 à 94 % (*Schéma 71*).

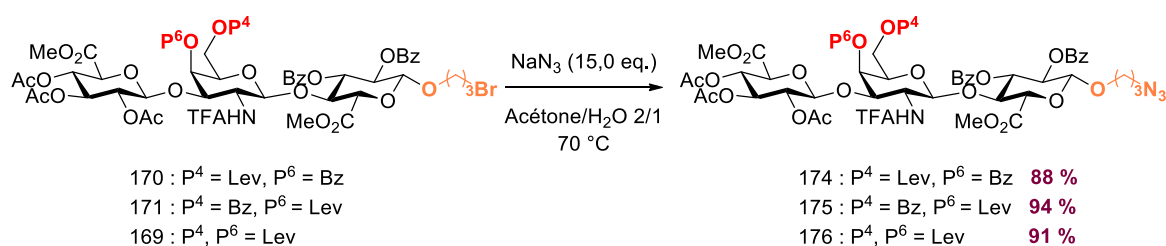


**Schéma 71** : Substitution nucléophile pour insérer le groupement azide.

### 3.3. SULFATATION AFIN D'ACCEDER AUX COMPOSES SULFATES

Les groupements lévulinoyles ont été déprotégés de manière sélective avec le mélange acétate d'hydrazine/acide acétique/pyridine (*Schéma 72*). Les composés 4-OH **177** et 6-OH **178** ont été

obtenus avec de très bons rendements (77 et 73 % respectivement) mais le 4,6-OH **179** a été obtenu avec un moins bon rendement de 45 %.

Finalement, les sulfatations des différentes positions ont pu être réalisées pour obtenir les trisaccharides **180**, **181** et **182** avec des rendements de 70 %, 78 % et 69 % respectivement (*Schéma 72*).

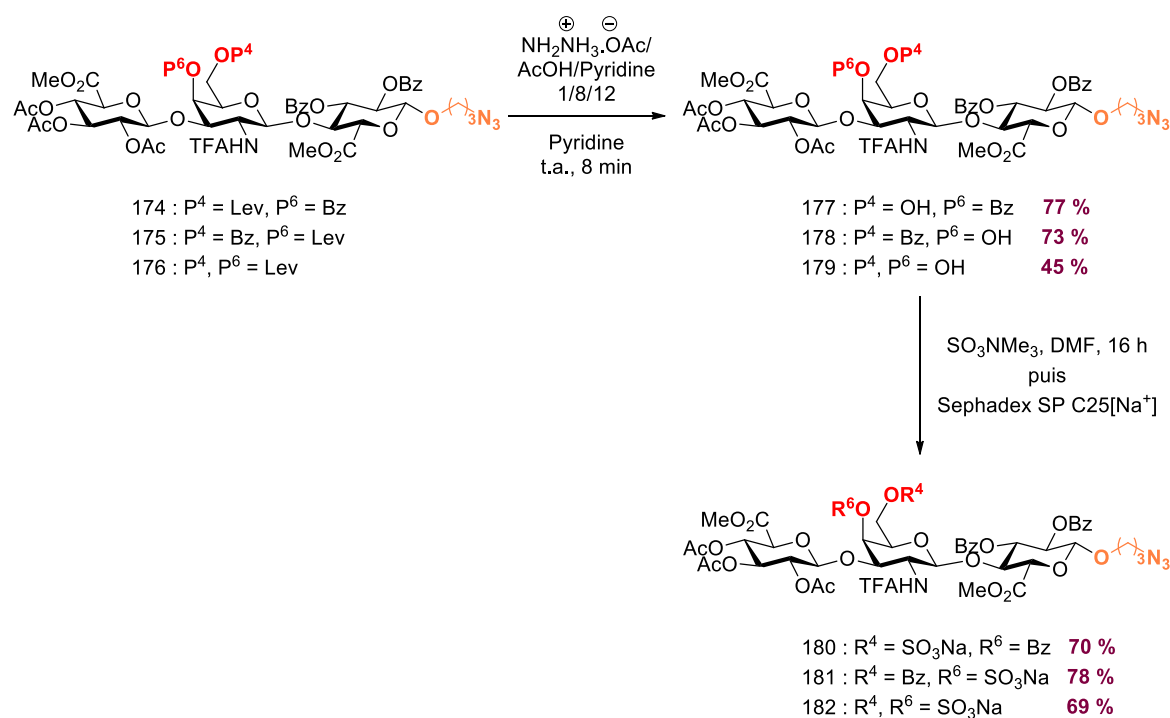
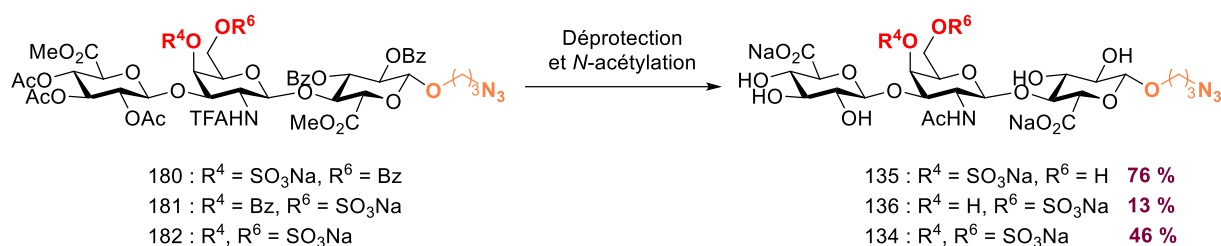


**Schéma 72** : Synthèse des trisaccharides diversement sulfatés.

Les sulfatations ont été confirmées par HRMS ainsi que grâce aux déplacements chimiques des protons et carbones des positions 4 et/ou 6. En effet, les H-4/C-4 et/ou les H-6/C-6 de la D-GalN sont plus déblindés lorsque ces positions sont sulfatées.

### 3.4. DEPROTECTION

Enfin, les trisaccharides sulfatés ont pu être déprotégés afin d'obtenir les composés finaux **134**, **135**, et **136** avec des rendements respectifs de 46 %, 76 % et 13 % (*Schéma 73*).



Conditions de déprotection :  $\text{LiO}_2\text{H}$  (10,0 eq., 5,0 eq. par  $\text{CO}_2\text{Me}$ ),  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  3/1,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 24 h ; puis  $\text{NaOH}$  4M (15,0 eq. par ester),  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  3/1, t.a., 72 h.

Conditions de N-acétylation :  $\text{Ac}_2\text{O}$  (20,0 eq.),  $\text{Et}_3\text{N}$  (13,0 eq.)  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  4/1,  $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$ , 4 h.

**Schéma 73** : Synthèse des trisaccharides finaux.

Le faible rendement de la déprotection du trisaccharide 6-sulfaté peut s'expliquer par le fait que seule une petite quantité de produit a pu être isolée, et une fraction reste impure (impureté non identifiée).

Pour résumer, de nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de la glycosylation avec un composé azide mais nous avons contourné le problème en changeant de voie et 4 nouveaux trisaccharides diversement sulfatés ou non-sulfaté portant un groupement azide ont pu être synthétisés. Toute la synthèse des trisaccharides non-sulfaté **133** et 4-sulfaté **135** a pu être optimisée mais les trisaccharides 6- et 4,6-sulfatés **136** et **134** n'ont été synthétisés qu'une seule fois, les faibles rendements parfois obtenus peuvent donc encore être améliorés. Toutefois, ces 4 composés pourront être engagés dans des réactions de CuAAC avec différentes plateformes pour obtenir les composés multivalents.

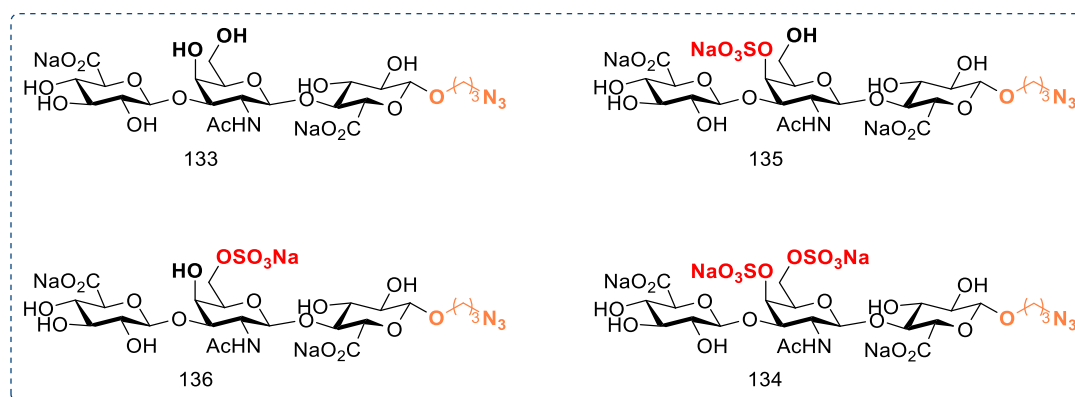


**Figure 36** : Résumé des trisaccharides synthétisés.

---

# COMPOSES MULTIVALENTS

Les oligosaccharides de CS précédemment synthétisés vont à présent pouvoir être greffés sur différentes plateformes afin d'obtenir des composés multivalents. Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, la méthode de synthèse choisie est l'utilisation de la chimie click, et plus précisément de la cycloaddition de Huisgen permettant de faire réagir des sucres fonctionnalisés par un groupement azide et des plateformes fonctionnalisées par des alcynes.

## 1. LA CYCLOADDITION AZOTURE-ALCYNE CATALYSEE AU CUIVRE (CUAAC)

### 2.1. HISTORIQUE

Le terme chimie « click » a été introduit au début des années 2000 par Sharpless. Pour qu'une réaction soit considérée comme telle, elle doit vérifier plusieurs critères. Par exemple, il faut que les nouvelles molécules soient synthétisées rapidement, avec le minimum de déchets et des solvants respectueux de l'environnement mais également de manière efficace, sélective et avec un rendement optimal.<sup>110</sup> De nombreuses réactions permettent cela, on retrouve alors des réactions de substitutions nucléophiles de type ouverture d'époxyde, des transformations de carbonyles en oxime, en hydrazone, en amide, des additions sur des liaisons multiples ou encore des réactions de cycloaddition dont les cycloadditions 1,3-dipolaires font partie.

Les cycloadditions 1,3-dipolaires regroupent plusieurs réactions mais nous nous intéressons ici à la cycloaddition de Huisgen qui est une cycloaddition de type (3+2) entre un alcyne et un azoture.<sup>111</sup> Ce type de réaction a été développé en 1963. Cependant, dans les conditions utilisées, c'est-à-dire fort chauffage (> 150 °C) et longue durée de réaction, deux triazoles régioisomères disubstitués en position 1,4 ou 1,5 sont synthétisés avec un ratio de 1/1 (*Figure 37*).

---

<sup>110</sup> Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.

<sup>111</sup> Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1963**, 2, 633–645.

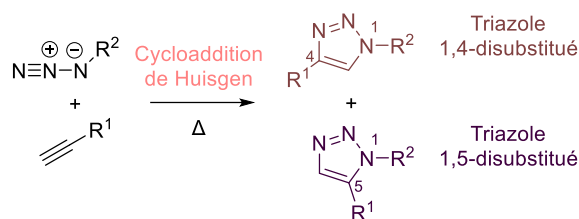


**Figure 37** : Cycloaddition de Huisgen.<sup>111</sup>

Suite à cela, Sharpless *et al* ont découvert que l'utilisation de cuivre (I) comme catalyseur permettait d'abaisser l'énergie de l'état de transition et donc d'accélérer la formation du produit désiré. Le chauffage n'était donc plus nécessaire. C'est pourquoi les cycloadditions de type (3+2) entre un alcyne terminal et un azoture catalysées par le cuivre (CuAAC) sont adoptées depuis 2002 par un grand nombre d'équipes.<sup>112</sup> Le complexe cuivre-acétylénure formé est plus réactif vis-à-vis des azotures et cela permet, contrairement à la réaction de Huisgen, d'obtenir un seul régioisomère, le 1,2,3-triazole 1,4-disubstitué (Figure 38, en violet). Ces derniers sont particulièrement intéressants en chimie médicinale puisqu'ils sont des bioisostères de la liaison amide.

Sur le même principe et afin d'obtenir uniquement le composé 1,5-disubstitué, une méthode utilisant le ruthénium (RuAAC) a vu le jour permettant de catalyser la réaction tout en l'orientant vers l'obtention de l'autre régioisomère, c'est-à-dire le triazole 1,5-disubstitué (Figure 38, en bleu).<sup>113</sup>

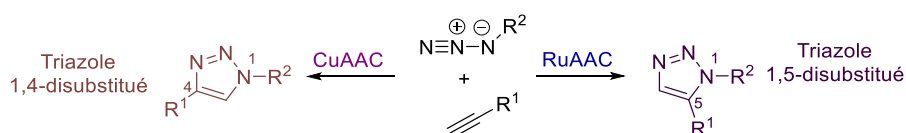


**Figure 38** : Cycloadditions envisageables en fonction du composé désiré.<sup>3,4</sup>

Le 05 octobre 2022, l'académie royale des sciences de Suède a décerné le prix Nobel de Chimie à Sharpless, Meldal et Bertozzi pour leur travail dans le développement de la CuAAC et de la chimie bioorthogonale (pouvant se reproduire à l'échelle cellulaire). En effet, Meldal s'est penché sur la synthèse de peptidotriazoles en phase solide *via* la méthode de CuAAC.<sup>114</sup> Bertozzi, quant à elle, souhaitait développer une réaction suffisamment efficace et sélective pour pouvoir être utilisée dans des milieux biologiques pour, par exemple, marquer et visualiser des molécules comme des sucres,

<sup>112</sup> Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.

<sup>113</sup> a) Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15998–15999. ; b) Rasmussen, L. K.; Boren, B. C.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5337–5339.

<sup>114</sup> Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.



délivrer des médicaments ou étudier les processus de certaines maladies. Pour cela, il était important d'avoir une nouvelle méthode qui ne nécessite pas de cuivre, élément qui a un effet cytotoxique au niveau des cellules. Les cycloadditions azoture-alcyne favorisées par la contrainte (strain-promoted alkyne-azide cycloadditions, SPAAC) ont permis de s'affranchir de l'utilisation du cuivre par réaction entre un cyclooctyne et une fonction azido dans des conditions physiologiques sans interférer avec les processus biologiques environnants (*Schéma 74*).<sup>115</sup> En effet, en raison du cycle, les carbones hybridés sp sont « tirés vers l'arrière » mais dès lors que la réaction a lieu, la contrainte disparaît. Cette contrainte permet donc d'atteindre plus facilement l'état de transition et donc d'accélérer la réaction.

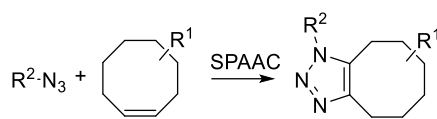


**Schéma 74** : Cycloadditions azoture-alcyne favorisées par la contrainte (SPAAC).

## 2.2. MECANISME DE LA CUAAC

Différentes études ont permis de mettre en avant plusieurs voies mécanistiques envisageables mais l'une d'entre elles a été supportée par l'isolement d'intermédiaires (*Figure 39*). Bertrand *et al* ont réussi à isoler deux intermédiaires réactionnels, démontrant ainsi que deux mécanismes semblent co-exister dans la réaction mais que l'un d'eux semble favorable cinétiquement. En effet, il apparaît que l'alcyne forme d'abord un complexe avec le cuivre puis un acétylure de cuivre est obtenu suite à la déprotonation de l'alcyne. Ce composé dinucléaire **I(Cu<sub>2</sub>)**, isolé par l'équipe de Bertrand, est décrit comme plus actif catalytiquement que le composé mononucléaire. Puis, le triazole bismétallé **II(Cu<sub>2</sub>)** est formé et a également été isolé. Pour finir, la protodémétallation a lieu en présence d'alcyne ce qui permet de régénérer l'espèce réactive de départ tout en libérant le triazole formé.

Les profils cinétiques des deux réactions ont été calculés, mettant en évidence que l'activité catalytique des composés mononucléaires **I** et **II(Cu)** est bien moins importante que celle des composés binucléaires **I** et **II(Cu<sub>2</sub>)** : seulement 12 % de composé final ont été obtenus en 10 h contre 99 % avec les composés fortement actifs.

<sup>115</sup> Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047.

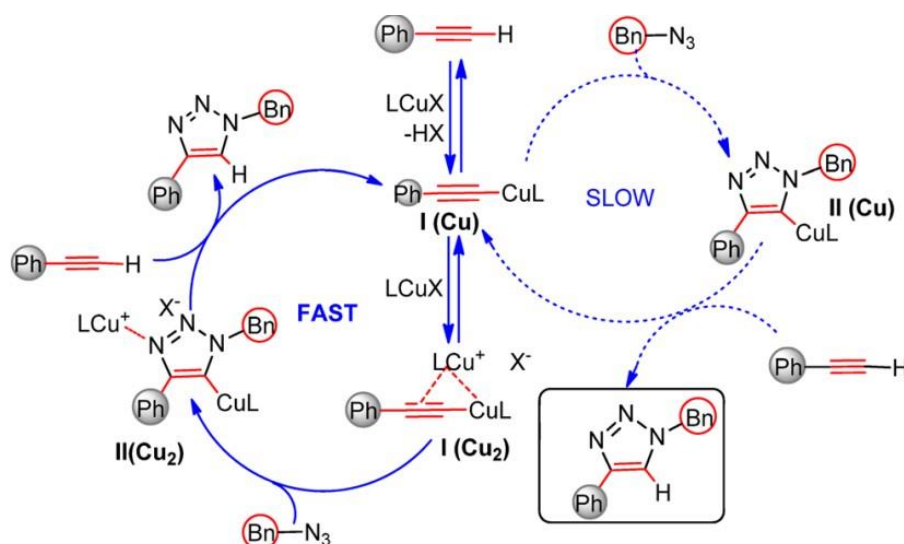


**Figure 39** : Mécanisme de la CuAAC proposé par Fokin et confirmé par Bertrand *et al.*<sup>116,117</sup>

### 2.3. CONDITIONS DE REACTION

Comme nous l'avons vu précédemment, une source de cuivre (I) est indispensable pour catalyser la réaction à température ambiante. Celle-ci peut provenir d'une source directe de Cu (I) ou bien d'une source obtenue indirectement à partir d'un état d'oxydation inférieur ou supérieur en présence d'un oxydant ou d'un réducteur. Les deux sources utilisées pour la synthèse de GAGs multivalents sont l'iodure de cuivre CuI et le sulfate de cuivre (II) CuSO<sub>4</sub> en présence d'ascorbate de sodium (NaAsc) comme réducteur. La présence de charges sur les sucres peut rendre nécessaire l'utilisation d'un tampon phosphate salin à pH = 7,4 (PBS) or le cuivre (I) s'oxyde en cuivre (II) au contact de l'oxygène présent dans l'eau (dismutation). Il est donc important d'utiliser un ligand qui joue le rôle de stabilisateur et de dégazer les solvants. Depuis l'essor de l'utilisation de ce type de réaction en chimie organique, une grande librairie de ligands du cuivre a été synthétisée (*Figure 40*). Parmi eux, on retrouve le tris(benzyltriazolylméthyl)amine (TBTA) **183a** développé par Fokin et Sharpless en 2004 et utilisé notamment par l'équipe de De Paz dans la synthèse de disaccharides de CS-E multivalents.<sup>118</sup> Ce composé est reconnu pour être un puissant stabilisateur du cuivre grâce à son rôle de protecteur face à l'oxydation et la dismutation tout en augmentant son pouvoir de catalyse. Cependant, il n'est pas soluble dans l'eau, alors on peut parfois préférer un composé similaire comme le tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA) **183c** qui, lui, est soluble dans l'eau.

<sup>116</sup> Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. *Sci Adv* **2015**, *1*, e1500304.

<sup>117</sup> Tiwari, V. K.; Mishra, B. B.; Mishra, K. B.; Mishra, N.; Singh, A. S.; Chen, X. *Chem Rev* **2016**, *116*, 3086–3240.

<sup>118</sup> Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855.

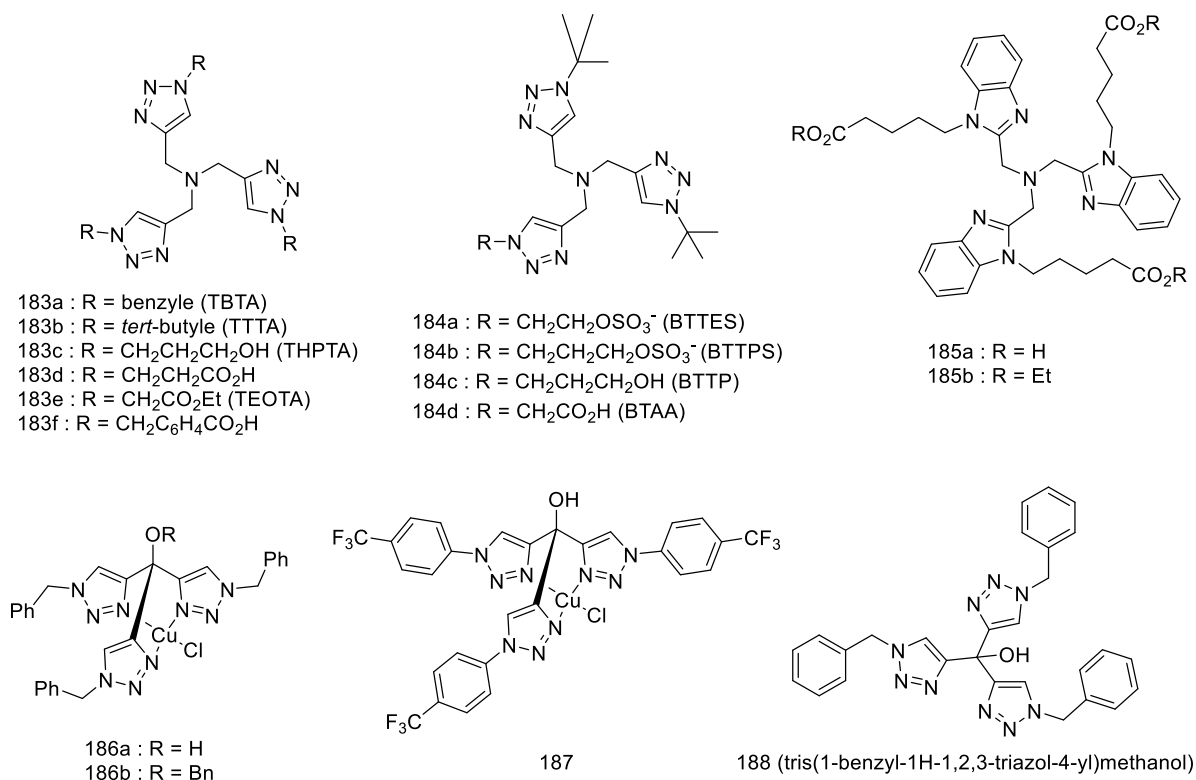


**Figure 40** : Exemples de ligands utilisés pour stabiliser le cuivre sous sa forme oxydée (I) dans les CuAAC.<sup>117,119</sup>

Le réactif limitant de la réaction est la plateforme tandis que le nombre d'équivalents de sucre, de cuivre (et réducteur ou oxydant si nécessaire) et de ligand dépendent du nombre d'alcynes sur la plateforme (valence). Lorsqu'aucune charge et aucun hydroxyle libre sont observés sur le sucre à greffer, le cuivre est utilisé en quantité catalytique. Cependant, choisir de greffer des sucres déprotégés et sulfatés implique que plusieurs fonctions peuvent complexer le cuivre. Dans ce cas, il est donc nécessaire d'augmenter les équivalents de cuivre/ligand/ascorbate de sodium.

Par exemple, lors du greffage du disaccharide de CS-E **52** sur une plateforme trivalente aromatique, l'équipe de De Paz a utilisé 4,2 équivalents de disaccharide soit 1,4 équivalents/alcyne et 3,6/7,3/10,9 équivalents de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/TBTA/NaAsc soit 1,2/2,4/3,6 équivalents/alcyne. Lorsqu'ils ont réalisé la synthèse du composé tétravalent, on constate que, cette fois-ci, 4,9 équivalents de disaccharide (1,2 éq./alcyne) ainsi que 4,3/8,6/12,6 équivalents de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/TBTA/NaAsc (1,1/2,2/3,2) ont été utilisés. Les solvants et leur proportion (DMSO/PBS 1,6/1), la concentration en plateforme (1 mg/mL soit 4,2.10<sup>-3</sup> M) et le temps de réaction (16 h) restent similaires dans les deux cas.<sup>94</sup>

<sup>119</sup> Li, L.; Zhang, Z. *Molecules* **2016**, *21*, 1393.

## 2. PLATEFORMES UTILISEES

Différentes plateformes ont été envisagées pour ce projet afin d'explorer diverses orientations et valences : des plateformes simples synthétisées au laboratoire avec une faible valence de 3 à 4, et des  $\beta$ -cyclodextrines synthétisées au laboratoire COBRA avec une valence de 6 ainsi que des protéines fonctionnalisées avec une trentaine d'alcyne par GLYcoDiag.

Deux plateformes à faible valence différentes ont été synthétisées : une plateforme trivalente sur un squelette aromatique et une plateforme tétravalente sur un squelette aliphatique.

La plateforme trivalente (P3) est synthétisée en une étape à partir du phloroglucinol **189** en présence de  $K_2CO_3$  et de bromure de propargyle pour donner le produit désiré **190** avec un rendement de 50 % (Schéma 75). Dans la littérature, le rendement obtenu est de 53 %.<sup>120</sup>

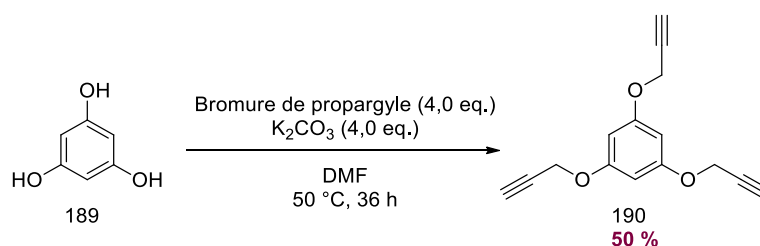


Schéma 75 : Synthèse de la plateforme trivalente **190**.

La plateforme tétravalente (P4) quant à elle est synthétisée à partir du pentaérythritol **191** en présence de KOH et de bromure de propargyle afin d'obtenir le composé désiré **192** avec un rendement de 30 % (Schéma 76). Dans la littérature, le rendement est de 84 %.<sup>121</sup> Le composé **193**, avec un hydroxyle n'ayant pas réagi, a également été isolé et sera utilisé comme plateforme trivalente. Pour séparer ces deux composés, plusieurs colonnes chromatographiques ont été nécessaires, ce qui a engendré des pertes de produits (rendement non déterminé).

<sup>120</sup> Xie, J.; Deng, X.; Cao, Z.; Shen, Q.; Zhang, W.; Shi, W. *Polymer* **2007**, *48*, 5988–5993.

<sup>121</sup> Ladd, E.; Sheikhi, A.; Li, N.; van de Ven, T. G. M.; Kakkar, A. *Molecules* **2017**, *22*, 868.

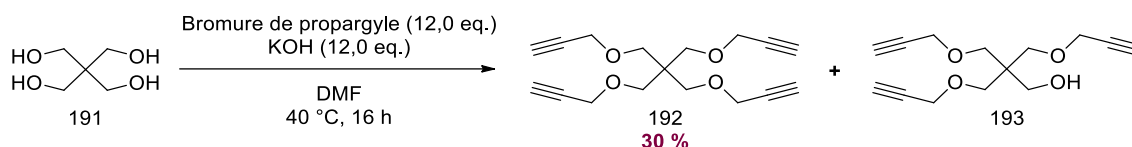


**Schéma 76** : Synthèse de la plateforme tétravalente **192**.

### 3. CONDITIONS DE REACTION CHOISIES ET CONTRAINTES

Pour choisir nos conditions de réaction de départ, nous nous sommes basés à la fois sur le travail de l'équipe de De Paz qui utilise des plateformes similaires ainsi que les disaccharides de CS-E mais également sur le travail du Dr. Buisson qui avait réalisé quelques réactions et donc un premier criblage. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser deux ligands, le TBTA et le THPTA, ainsi que le sulfate de cuivre pentahydraté comme source de cuivre (II) réduite en présence d'ascorbate de sodium. Lors de l'optimisation de ces réactions de CuAAC, la concentration en plateforme sera égale à 1 mg/mL (soit  $4,2 \cdot 10^{-3}$  M) mais les solvants varieront.

Le nombre d'équivalent de la plateforme sera fixé à 1,0 mais les nombres d'équivalents de disaccharide et de cuivre/ligand/ascorbate de sodium dépendront de la valence de la plateforme.

Toute l'optimisation qui va être présentée a été réalisée sur de petites quantités, environ  $10^{-5}$  moles soit quelques milligrammes seulement de réactifs. C'est pourquoi des solutions dégazées à des concentrations fixées de chacun des réactifs (sauf l'oligosaccharide) ont été préparées et stockées au réfrigérateur afin de faciliter le lancement des réactions. En effet, l'oligosaccharide a été pesé puis solubilisé dans le PBS (pH 7,4). Ensuite, la solution de plateforme a été introduite avant que les solutions de cuivre, de ligand et d'ascorbate de sodium ne le soient. Toutes les manipulations ont été réalisées à température ambiante et leur traitement a été identique : résine Quadrasil® TA pour éliminer le cuivre, filtration, évaporation du solvant, puis purification par colonne d'exclusion stérique Sephadex LH-20 dans 100 % d'eau (éluant de CCM ternaire AE/MeOH/H<sub>2</sub>O 8/4/2 à 7/5/3 suivant les plateformes utilisées). Tous les rendements indiqués dans les différentes parties ont été calculés après lyophilisation du composé final.

Avant de débiter les tests, il a donc fallu étudier la solubilité des plateformes ainsi que des ligands dans différents solvants choisis (*Tableau 9*). Les plateformes sont peu solubles dans les solvants organiques autres que le DMSO et insolubles dans le tampon phosphate. Le TBTA n'est soluble que dans le DMSO et le THPTA est soluble dans le DMSO, le méthanol et le PBS. Finalement, le DMSO semble le meilleur solvant pour solubiliser l'ensemble des différents réactifs.

|               | DMSO | ACN | MeOH | <i>t</i> -BuOH | PBS |
|---------------|------|-----|------|----------------|-----|
| <b>P3 190</b> | S    | s   | s    | s              | I   |
| <b>P4 192</b> | S    | s   | s    | s              | I   |
| <b>TBTA</b>   | S    | I   | I    | I              | I   |
| <b>THPTA</b>  | S    | I   | S    | I              | S   |

**Tableau 9** : Solubilité des réactifs dans différents solvants.

S : très soluble, s : peu soluble, I : insoluble

Travailler sur de petites quantités solubilisées, par exemple, dans un mélange DMSO/PBS rend difficile le suivi de la réaction, que ce soit par CCM ou RMN. Nous avons donc essayé de mettre en place un suivi avec la plateforme analytique SALSA de l'ICOA en utilisant la chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) couplée à un détecteur DEDL, adéquat pour détecter les sucres. La chromatographie HILIC est intéressante car elle permet d'utiliser une phase mobile majoritairement organique tout en présentant un greffage hydrophile à la surface de la phase stationnaire, c'est-à-dire une couche polaire semi-immobilisée. Les composés polaires pourront plus facilement interagir avec cette phase stationnaire et seront donc plus retenus ce qui est très intéressant dans notre cas puisque nous souhaitons greffer des sucres totalement déprotégés et chargés. Un autre avantage de cette méthode est l'utilisation de l'eau comme éluant (jusqu'à 40 %).

La colonne utilisée est une colonne Waters® « X-Bridge® BEH Amide » et les paramètres suivants ont été utilisés : débit 0,2 mL/min ; T<sub>colonne</sub> 40 °C ; V<sub>injection</sub> 10 µL ; UV 254 nm (DAD) ; DEDL gain à 8, T à 60 °C, P à 3 bars. De plus, de l'eau et de l'acétonitrile, tous deux à une concentration d'acétate d'ammonium de 10 mM, ont été choisis comme éluants avec un gradient allant de 10 à 50 % d'eau.

Des solutions de référence ont d'abord été introduites afin d'attribuer à chaque réactif son temps de rétention dans ces conditions d'analyse (*Figure 41*). Ces attributions nous ont permis d'en déduire qu'observer la consommation de disaccharide semble possible mais pas la consommation des plateformes (réactif limitant) en présence de TBTA puisque leurs temps de rétention sont proches voire identiques.

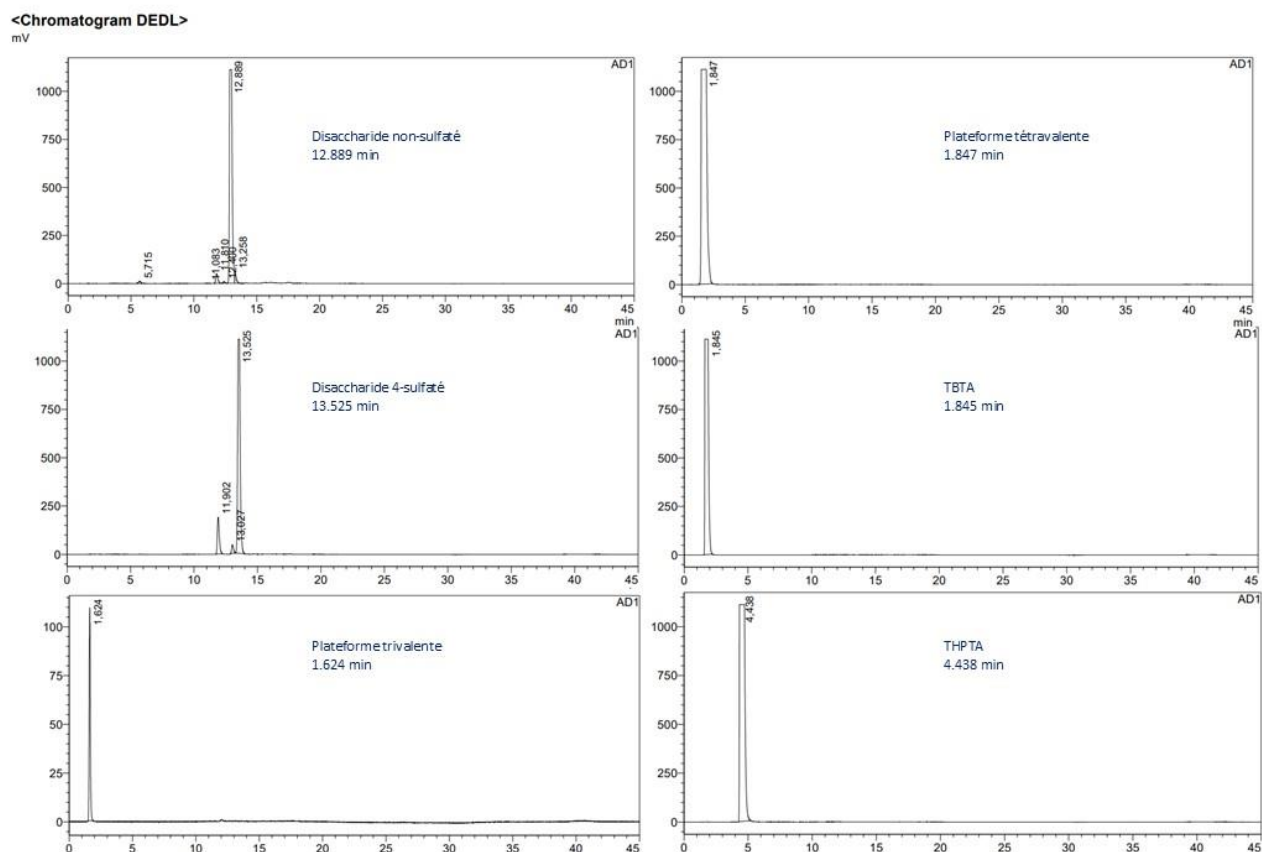


**Figure 41** : Chromatogrammes obtenus par HILIC-DEDL des différents réactifs de la CuAAC.

Nous avons tout de même essayé de suivre certaines réactions au départ de notre optimisation mais nous nous sommes vite rendus compte qu'en raison d'un large excès de réactifs par rapport à la plateforme et au produit formé, il est difficile de tout visualiser sur un même chromatogramme.

## 4. CUAAC AVEC LES DISACCHARIDES DE CS

Les 4 disaccharides synthétisés ont été greffés sur les plateformes simples décrites précédemment. De plus, ils sont en cours de greffage sur des  $\beta$ -cyclodextrines fonctionnalisées avec des alcynes dans l'équipe du Pr. Géraldine Gouhier.

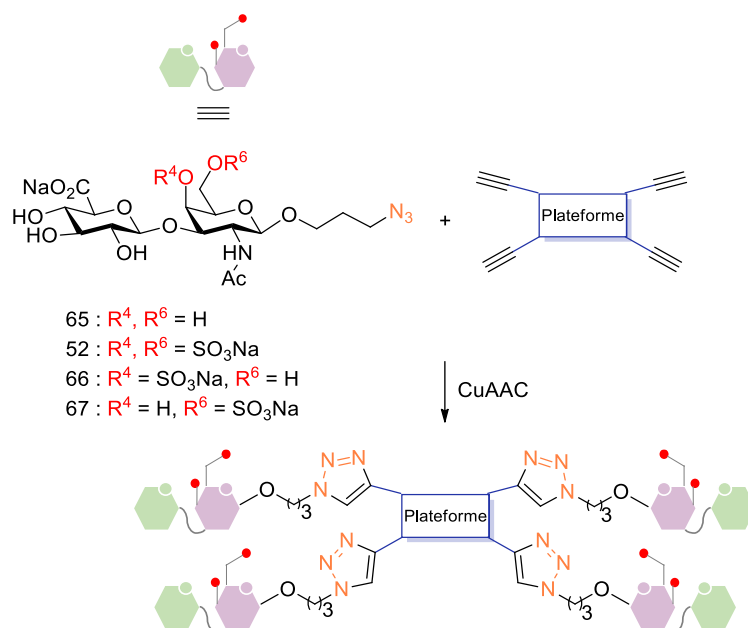


**Figure 42 :** Synthèse des disaccharides de CS multivalents.

#### 4.1. COMPOSES TRIVALENTS

##### *A- OPTIMISATION DE LA REACTION AVEC LE DISACCHARIDE NON-SULFATE*

L'optimisation de la réaction a été réalisée avec le disaccharide non-sulfaté qui est plus accessible d'un point de vue synthétique et nous nous sommes basés sur les conditions décrites par l'équipe de De Paz sur le disaccharide 4,6-disulfaté (*Schéma 77*). Ainsi, le nombre d'équivalents de Cu/Ligand/NaAsc a été fixé à 4/8/12 et les réactions ont été agitées pendant 20 h à température ambiante tandis que différents solvants et proportions ainsi que les deux ligands ont été testés.



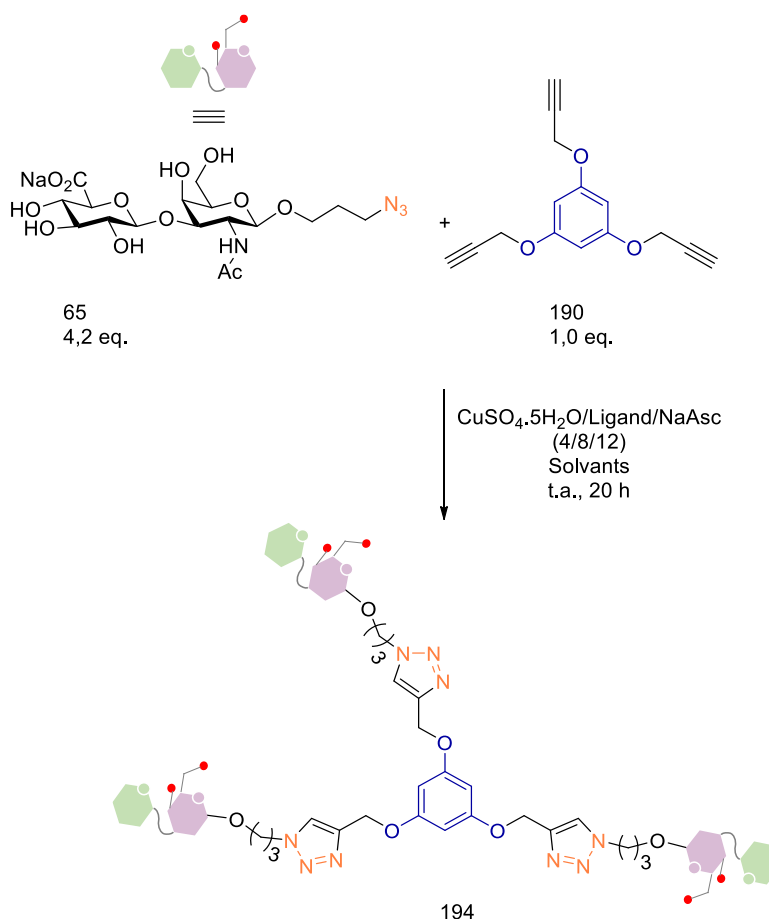


**Schéma 77** : Synthèse du disaccharide non-sulfaté trivalent.

Dans un premier temps, en utilisant le TBTA comme décrit par De Paz pour le 4,6-disulfaté, seulement 38 % du composé trivalent **194** ont été isolés (*Tableau 10, entrée 1*). Changer de ligand pour le THPTA a permis d'obtenir des résultats similaires (*entrée 2*). Un essai sans ligand a démontré l'importance de celui-ci puisqu'un mélange de composés difficilement purifiable a été obtenu (*entrée 3*). Ensuite, le PBS a été remplacé par de l'eau mais un rendement faible de 28 % a été obtenu et le mélange *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O n'a pas permis d'améliorer significativement le rendement (*entrées 4 et 5*). Un mélange MeOH/PBS a conduit à la formation exclusive de composé divalent, quelque soit le ligand utilisé (*entrées 6 et 7*). L'acétonitrile a permis d'obtenir le composé **194** avec 32 % de rendement en utilisant le THPTA comme ligand mais seulement le composé divalent a été obtenu avec le TBTA (*entrées 8 et 9*). En inversant les proportions de PBS/ACN (4/1), rendement a atteint 52 % (*entrée 10*). Cependant, l'acétonitrile n'est pas un co-solvant organique pratique à utiliser puisque les ligands sont insolubles dans celui-ci et les plateformes y sont peu solubles donc cela peut devenir difficile à transposer à plus grande échelle. C'est pourquoi nous avons choisi de repartir avec le DMSO qui avait donné des résultats encourageants en début de tests mais en changeant les proportions (DMSO/PBS 1/3). Le TBTA et le THPTA ont conduit à des rendements respectifs de 63 % et 71 % (*entrées 11 et 12*). En passant à 25 mg

de disaccharide, un rendement plus faible de 51 % a été obtenu alors on peut supposer que la faible solubilité du TBTA dans le mélange réactionnel gêne cette montée en échelle (*entrée 13*). Ensuite, la quantité totale de ligand a été ajoutée en deux fois : 4 équivalents au moment de lancer la réaction et 4 équivalents après 14 h de réaction avec un impact modéré sur le rendement qui diminue à 47 % (*entrée 14*). De la même manière, le disaccharide a été ajouté en deux fois à petite et plus grande échelle ce qui a permis d'obtenir de très bons rendements respectifs de 69 et 87 % (*entrée 15 et 16*). Enfin, un très bon rendement de 85 % a été obtenu avec moins d'équivalents de Cu/TBTA/NaAsc (1/2/3) sans ajout séquentiel du disaccharide ce qui est plus pratique d'un point de vue expérimental car il s'agit d'une très petite quantité de solide. Cependant, ces conditions ne seront très certainement pas adaptables aux composés sulfatés.

|    | Solvants (proportions)                        | Ligand      | Rendement               |
|----|-----------------------------------------------|-------------|-------------------------|
| 1  | DMSO/PBS (1,6/1)                              | TBTA        | 38 %                    |
| 2  |                                               | THPTA       | 40 %                    |
| 3  |                                               | /           | Impur                   |
| 4  | DMSO/H <sub>2</sub> O (1,6/1)                 | THPTA       | 28 %                    |
| 5  | <i>tert</i> -butanol/H <sub>2</sub> O (1,6/1) | THPTA       | 34 %                    |
| 6  | MeOH/PBS (1,7/1)                              | THPTA       | Divalent obtenu         |
| 7  |                                               | TBTA        | Divalent obtenu         |
| 8  | ACN/PBS (1,6/1)                               | THPTA       | 32 %                    |
| 9  |                                               | TBTA        | Divalent obtenu         |
| 10 | ACN/PBS (1/4)                                 | THPTA       | 52 %                    |
| 11 | <b>DMSO/PBS (1/3)</b>                         | THPTA       | 71 %                    |
| 12 |                                               | <b>TBTA</b> | 63 %                    |
| 13 |                                               |             | 51 %                    |
| 14 |                                               |             | 47 % <sup>1</sup>       |
| 15 |                                               |             | 69 % <sup>2</sup>       |
| 16 |                                               |             | 87 % <sup>2</sup>       |
| 17 |                                               |             | <b>85 %<sup>3</sup></b> |

**Tableau 10** : Optimisation de la CuAAC avec la plateforme trivalente et le disaccharide non-sulfaté.

<sup>1</sup> ligand ajouté en 2 fois ; <sup>2</sup> disaccharide ajouté en 2 fois ; <sup>3</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/TBTA/NaAsc 1/2/3 ; <sup>4</sup> 25 mg de disaccharide.

### B- OPTIMISATION DE LA REACTION AVEC LES DISACCHARIDES SULFATES

La suite de l'étude a été poursuivie sur les disaccharides diversement sulfatés **52**, **66** et **67** en repartant de nos meilleures conditions ainsi que de celles décrites par l'équipe de De Paz sur le disaccharide 4,6-disulfaté. C'est pourquoi nous nous sommes concentrés sur le mélange DMSO/PBS, 20 h à température ambiante avec le même ratio cuivre/ligand/ascorbate de sodium (*Schéma 78*).

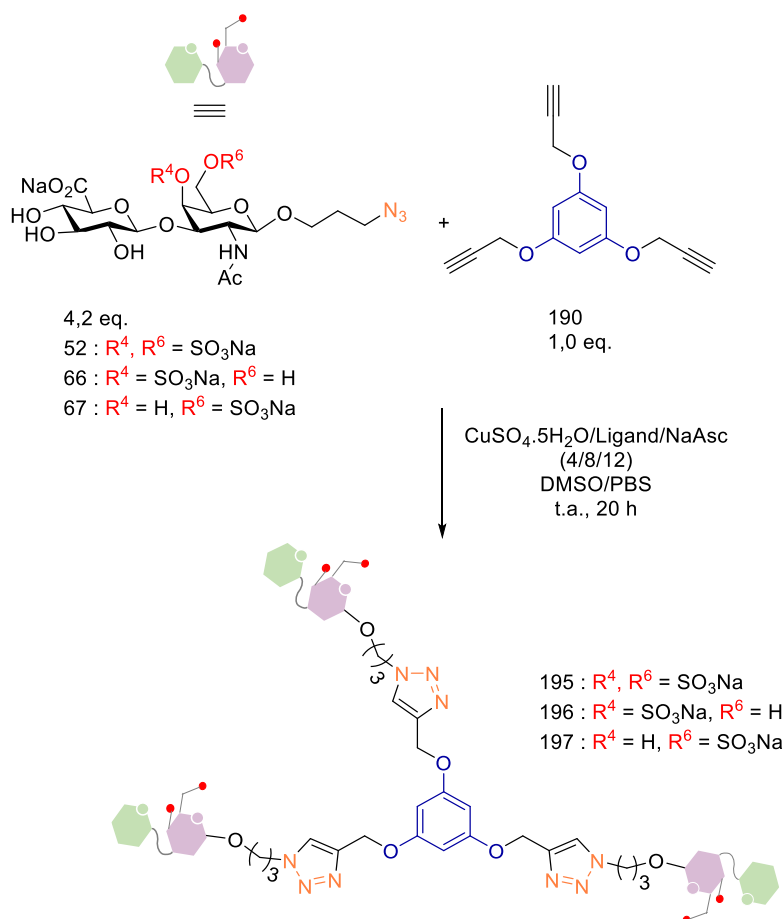


**Schéma 78 :** Synthèse des disaccharides sulfatés trivalents.

Pour le disaccharide 4-sulfaté, contrairement au disaccharide non-sulfaté, diminuer les équivalents de Cu/TBTA/NaAsc (1/2/3) n'a pas permis d'avoir un très bon rendement, ce qui n'est pas surprenant au vu du nombre de charges supplémentaires (présence de sulfates) (*Tableau 11, entrée 1*). En gardant les mêmes proportions de solvant mais en augmentant les équivalents de Cu/Ligand/NaAsc, le composé a été obtenu avec un rendement quantitatif sur petite échelle mais un rendement plus faible de 46 % à plus grande échelle (*entrées 2 et 3*). Utiliser le THPTA au lieu du TBTA a tout de même permis d'avoir un très bon rendement de 86 % (*entrée 4*). Il aurait donc été intéressant de tester ces conditions à plus grande échelle afin de déterminer si la solubilité du TBTA gêne la réaction. Le disaccharide 4-

sulfaté trivalent n'a pas été obtenu en utilisant les conditions DMSO/PBS (1,6/1) et du TBTA mais changer de ligand pour le THPTA a permis d'obtenir le composé avec 40 % de rendement (*entrées 5 et 6*). Ici, les meilleures conditions correspondent à celles de l'*entrée 2*.

Puis, les conditions décrites par l'équipe de De Paz ont été reproduites au départ du disaccharide 4,6-disulfaté. Dans nos mains, la réaction a conduit à 42 % de rendement maximum alors qu'un rendement quantitatif est annoncé (*entrée 8*).<sup>94</sup> En utilisant le système de solvant qui a montré de bons résultats pour le disaccharide non-sulfaté (DMSO/PBS 1/3), le composé désiré a été obtenu avec un rendement légèrement plus élevé de 52 % (*entrée 8*). Ajouter le disaccharide en deux fois n'a pas permis d'améliorer ce rendement de même qu'augmenter les équivalents de Cu/TBTA/NaAsc puisque le rendement a été de seulement 29 % (*entrées 9 et 10*). Enfin, le THPTA a été testé mais un très faible rendement de 5 % a été obtenu (*entrée 11*). Les conditions de l'*entrée 8* correspondent aux meilleures. Par la suite, ces meilleures conditions ont été transposées sur le disaccharide 6-sulfaté et des rendements inférieurs mais tout de même intéressants ont été obtenus à petite et plus grande échelle (59 et 67 %, *entrées 12 et 13*). Cette fois-ci, changer de ligand n'a pas permis d'améliorer le rendement.

|    | Disaccharide               | Solvants (proportions) | Ligand | Rendement          |
|----|----------------------------|------------------------|--------|--------------------|
| 1  | 4-sulfaté<br><b>66</b>     | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | 52 % <sup>1</sup>  |
| 2  |                            |                        |        | <b>Quant.</b>      |
| 3  |                            |                        | THPTA  | 46 %               |
| 4  |                            |                        |        | 86 %               |
| 5  |                            | DMSO/PBS (1,6/1)       | TBTA   | /                  |
| 6  |                            |                        | THPTA  | 40 %               |
| 7  | 4,6-disulfaté<br><b>52</b> | DMSO/PBS (1,6/1)       | TBTA   | 42 % <sup>93</sup> |
| 8  |                            | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | <b>52 %</b>        |
| 9  |                            |                        |        | 52 % <sup>*2</sup> |
| 10 |                            |                        |        | 29 % <sup>*3</sup> |
| 11 |                            |                        | THPTA  | 5 %                |
| 12 | 6-sulfaté<br><b>67</b>     | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | <b>59 %</b>        |
| 13 |                            |                        |        | <b>67 %</b>        |
| 14 |                            |                        | THPTA  | 28 %               |

**Tableau 11** : Optimisation de la CuAAC avec la plateforme trivalente et les disaccharides diversement sulfatés.

<sup>1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/TBTA/NaAsc 1/2/3 ; <sup>2</sup> disaccharide ajouté en 2 fois ; <sup>3</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/TBTA/NaAsc 5/10/15 ; <sup>4</sup> 25 mg de disaccharide.

Ainsi, tous les disaccharides trivalents ont été obtenus avec des rendements plus ou moins satisfaisants. Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus avec la plateforme tétravalente.

### C- ANALYSES DES COMPOSES TRIVALENTS

Les composés trivalents ont été attribués par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (400 MHz ou 700 MHz dans le  $\text{D}_2\text{O}$  avec ou non une goutte d'acétone) ainsi que par HRMS. Nous pouvons noter que tous les composés sont purs, à l'exception du disaccharide trivalent 4,6-disulfaté.

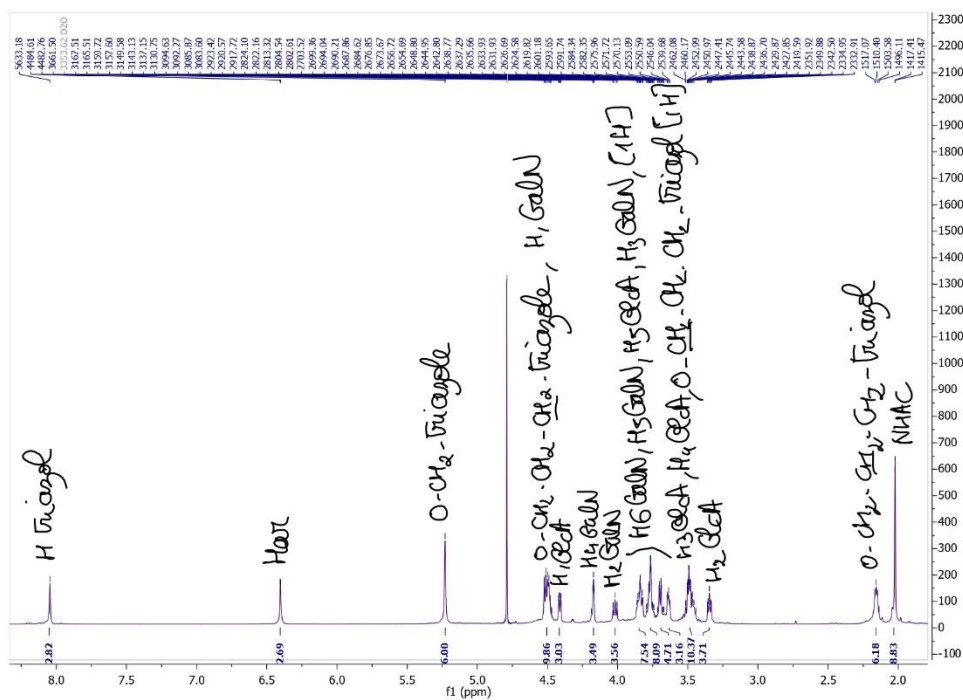


Figure 43 : RMN  $^1\text{H}$  700 MHz du disaccharide trivalent non-sulfaté dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .



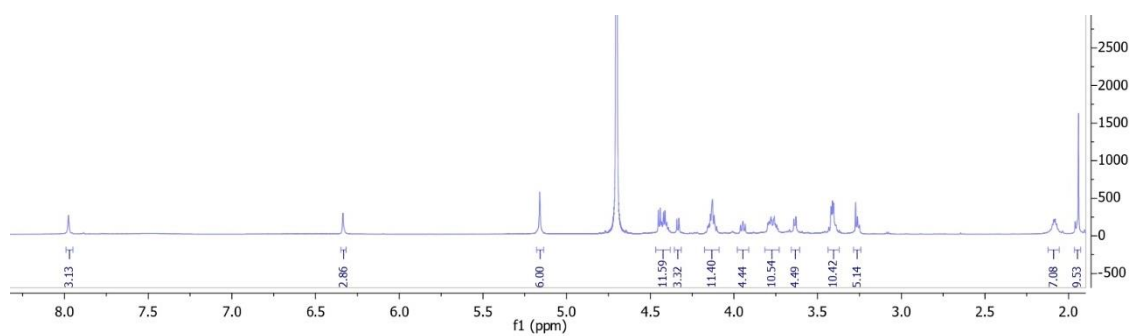


**Figure 47 :** RMN  $^1\text{H}$  700 MHz du disaccharide trivalent 6-sulfaté dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .

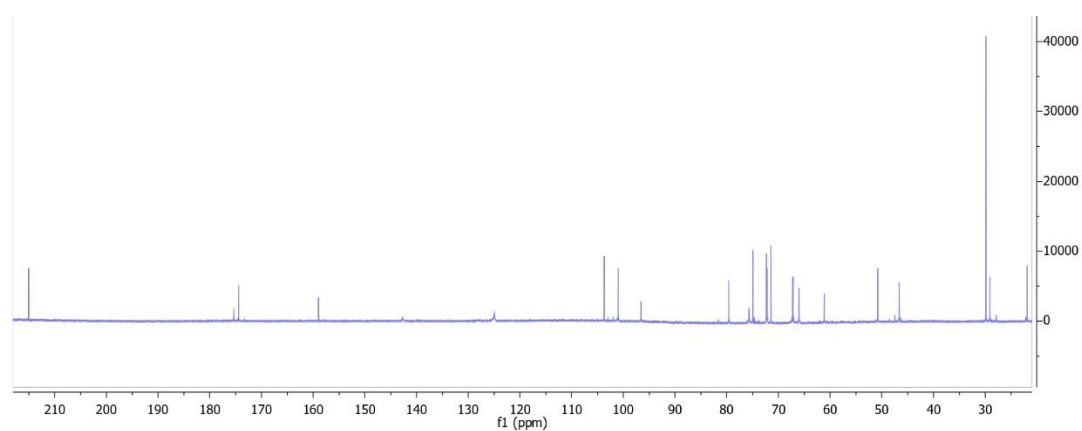


**Figure 48 :** RMN  $^{13}\text{C}$  700 MHz du disaccharide trivalent 6-sulfaté dans le  $\text{D}_2\text{O}$  avec une goutte d'acétone.

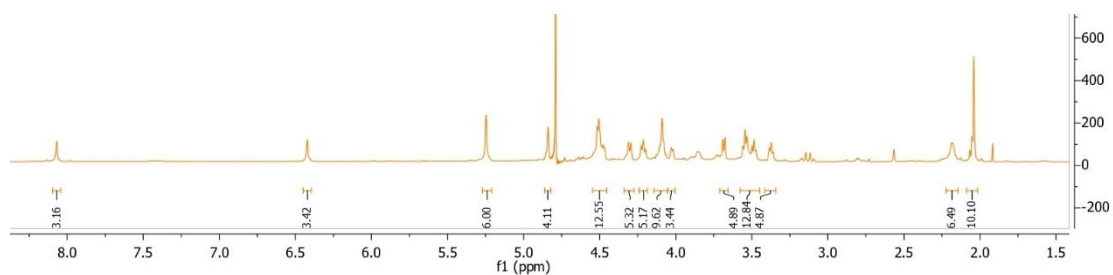


**Figure 49 :** RMN  $^1\text{H}$  700 MHz du disaccharide trivalent 4,6-disulfaté dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .

## 4.2. SUR LA PLATEFORME TETRAVALENTE

### A-COUPAGE PAR CUAAC

Par transposition, 5,6 équivalents de disaccharides (1,4 eq./alcyne) seront utilisés. Les équivalents de cuivre/ligand/ascorbate de sodium seront également augmentés à 5/10/15 et les ratios de DMSO/PBS seront identiques aux optimisations précédentes (*Schéma 79, Tableau 12*).

Les purifications n'ont pas permis d'isoler les différents produits purs puisque des traces d'impuretés ont été observées, d'où un rendement approximatif.

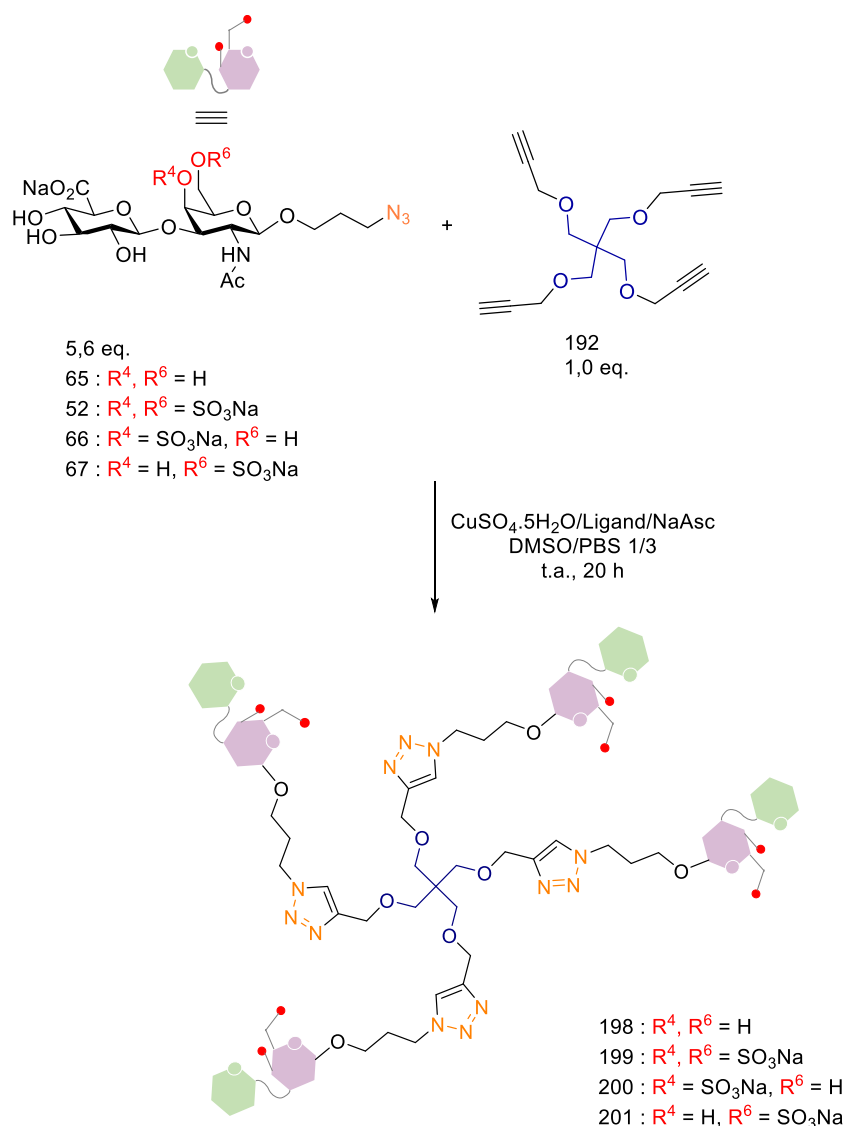


**Schéma 79** : Synthèse des disaccharides tétravalents.

Concernant le disaccharide non-sulfaté, le premier test effectué avec le TBTA a conduit au composé désiré avec 31 % de rendement (*Tableau 12, entrée 1*). Augmenter le nombre d'équivalents de disaccharide ou celui de cuivre permet d'obtenir un résultat similaire, avec 47 ou 49 % de rendement (*entrées 2 et 3*). Le type de ligand n'influe pas réellement sur la réaction puisqu'un rendement de 47 % a été obtenu avec le THPTA (*entrée 4*).

Les mêmes tests ont été réalisés avec les disaccharides mono-sulfatés. Pour le disaccharide 4-sulfaté, utiliser 5,6 équivalents de sucre, 5 équivalents de cuivre et le TBTA a permis d'obtenir un rendement



correct de 43 % (*entrée 5*). Le produit n'a pas été isolé lorsque 6,0 équivalents de disaccharide ont été introduits et un faible rendement de 24 % a été obtenu lorsque les équivalents de cuivre ont été augmentés (*entrées 6 et 7*). A nouveau, changer de ligand ne semble pas influencer sur la réaction (*entrée 8*). L'entrée 5 semble être la meilleure option pour obtenir le composé **200** avec un rendement correct.

Ces mêmes conditions ont été appliquées au disaccharide 6-sulfaté et elles se sont révélées être à nouveau les meilleures puisqu'un rendement de 45 % a été obtenu (*entrée 9*). Seulement 16 % de produit ont été isolés lors de l'augmentation de la quantité de disaccharide et aucun composé n'a été obtenu après purification lorsque les équivalents de cuivre ont été augmentés (*entrées 10 et 11*). De plus, le THPTA n'a pas permis d'obtenir, contrairement aux exemples précédents, un rendement satisfaisant (*entrée 12*).

Concernant le disaccharide 4,6-disulfaté, le protocole de De Paz (Cu/TBTA/NaAsc 4,3/8,6/12,6 et DMSO/PBS 1,6/1) nous a permis d'isoler le composé désiré avec 35 % de rendement alors qu'un rendement quantitatif est annoncé (*entrée 13*).<sup>94</sup> De plus, la transposition des conditions optimales déterminées pour les autres oligosaccharides n'a pas été concluante puisque seulement 16 % de composé a été obtenu (*entrée 14*).

|    | Disaccharide  | Ligand | Equivalents<br>Cu/Ligand/NaAsc | Rendement            |
|----|---------------|--------|--------------------------------|----------------------|
| 1  | Non-sulfaté   | TBTA   | 5/10/15                        | 31 %*                |
| 2  |               |        |                                | 47 % <sup>1*</sup>   |
| 3  |               |        | 6/12/18                        | 49 %*                |
| 4  |               | THPTA  | 5/10/15                        | 47 %*                |
| 5  | 4-sulfaté     | TBTA   | 5/10/15                        | 43 %*                |
| 6  |               |        |                                | / <sup>1</sup>       |
| 7  |               |        | 6/12/18                        | 24 %                 |
| 8  |               | THPTA  | 5/10/15                        | 39 %*                |
| 9  | 6-sulfaté     | TBTA   | 5/10/15                        | 45 %*                |
| 10 |               |        |                                | 16 % <sup>1</sup>    |
| 11 |               |        | 6/12/18                        | /                    |
| 12 |               | THPTA  | 5/10/15                        | 15 %*                |
| 13 | 4,6-disulfaté | TBTA   | 4,3/8,6/12,6                   | 35 % <sup>2*93</sup> |
| 14 |               |        | 5/10/15                        | 16 %*                |

**Tableau 12** : Synthèse des disaccharides tétravalents diversement sulfatés.

<sup>1</sup> 6,0 équivalents de disaccharide ; <sup>2</sup> conditions de De Paz *et al* (DMSO/PBS 1,6/1) ; \* impur

## B- ANALYSE DES COMPOSES

Les disaccharides diversement sulfatés tétravalents ont été obtenus mais des traces d'impuretés ont été détectées par HRMS et les produits n'ont pas pu être isolés parfaitement purs. Lors de l'analyse HRMS de ces composés, on retrouvait un pic de masse correspondant à un composé trivalent mais sans alcyne sur le bras restant (*Figure 50*).

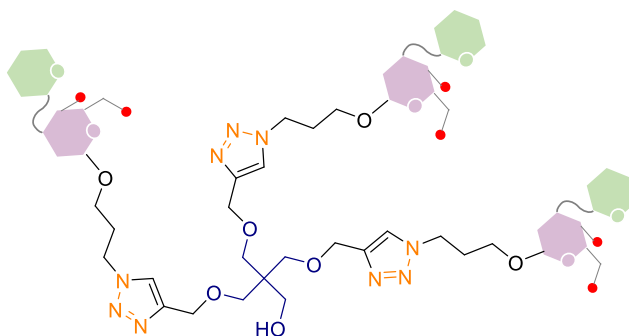


**Figure 50** : Composé trivalent sans alcyne sur le bras restant ( $C_{65}H_{100}N_{12}O_{49}S_3$   $m/z$  : 964,243759).

Nous avons d'abord pensé que les composés n'étaient peut-être pas stables. Pour vérifier cette hypothèse et connaître plus précisément la pureté de nos composés, une analyse combinée HILIC-HRMS a été mise en place. Les composés finaux ont été injectés, ainsi que les plateformes et les oligosaccharides puis les masses des composés correspondants à chacun des pics observés ont été déterminées. Par exemple, la *Figure 51* montre les analyses RMN, HRMS et HILIC-HRMS d'une réaction avec disaccharide non-sulfaté (*Tableau 4, entrée 1*). On peut remarquer que le produit semble relativement propre par RMN et HRMS mais ce n'est pas le cas en HILIC-HRMS. On retrouve différents pics tels que le pic dont la masse correspond au composé tétravalent (pic 11) et celui du composé avec un bras en moins (pic 10). Les pics 1 et 2 n'appartiennent pas au composé et les autres correspondent à des fragmentations.

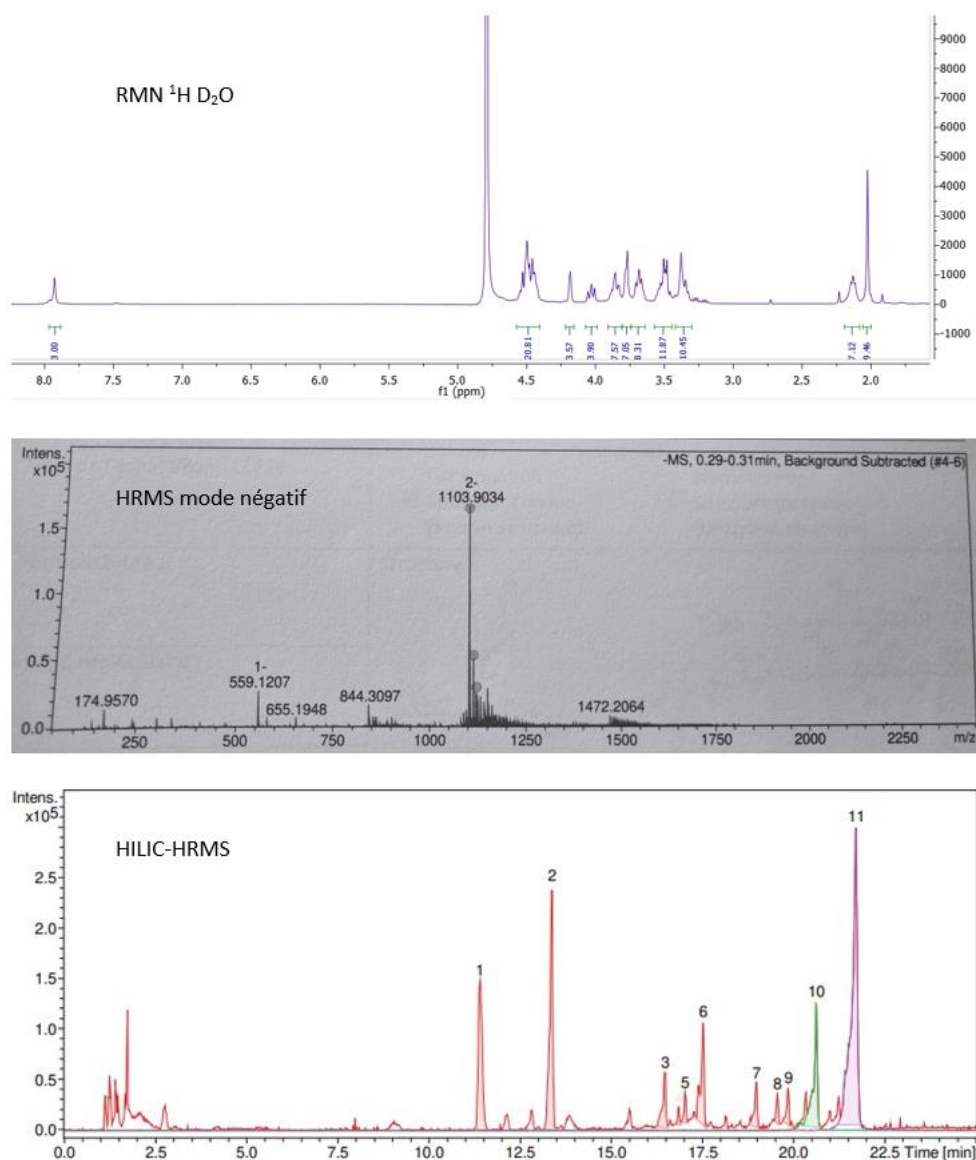


**Figure 51 :** Analyses d'un disaccharide non-sulfaté tétravalent.

L'analyse de la plateforme tétravalente utilisée nous a permis d'observer une petite quantité de sous-produit **193** non détectée par RMN, ce qui peut expliquer la synthèse de composés trivalents avec un bras  $\text{CH}_2\text{-OH}$ . Cela prouve alors qu'il ne s'agit pas d'instabilité du composé final.

La purification par exclusion stérique n'a pas fonctionné, les rapports frontaux étant trop proches et les quantités de produits trop faibles, les produits n'étaient pas distinguables par CCM. La purification de ces composés est donc toujours en cours. En effet, le composé correspondant au pic 11 est plus retenu, sans être co-élué avec un autre, ce qui permet d'envisager une purification *via* HILIC à l'échelle préparative.

La stabilité des disaccharides sulfatés dans les conditions de CuAAC a également été testée. Pour ce faire, le disaccharide 4,6-disulfaté a été mis en réaction dans les conditions de réaction pendant 20 heures à température ambiante en l'absence de plateforme puis le traitement et la purification de la réaction ont été effectués. Les chromatogrammes HILIC-HRMS du disaccharide avant et après réaction étant similaires, cela prouve la stabilité du composé dans les conditions réactionnelles.

En parallèle, la plateforme a été repurifiée afin d'éliminer toute trace de plateforme trivalente (vérification par HRMS) permettant ainsi d'effectuer des tests sur une plateforme pure. Cependant, il est apparu d'autres impuretés non identifiées et non séparées à ce jour (*Figure 52, cercles rouges*). On peut voir que dans l'ensemble la RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 700 MHz) est identique à l'exemple précédent mais qu'un pic supplémentaire est visible dans la zone des  $-\text{CH}_3$  tandis que plusieurs pics sont visibles en RMN du carbone. Ces composés sont également en cours de purification.

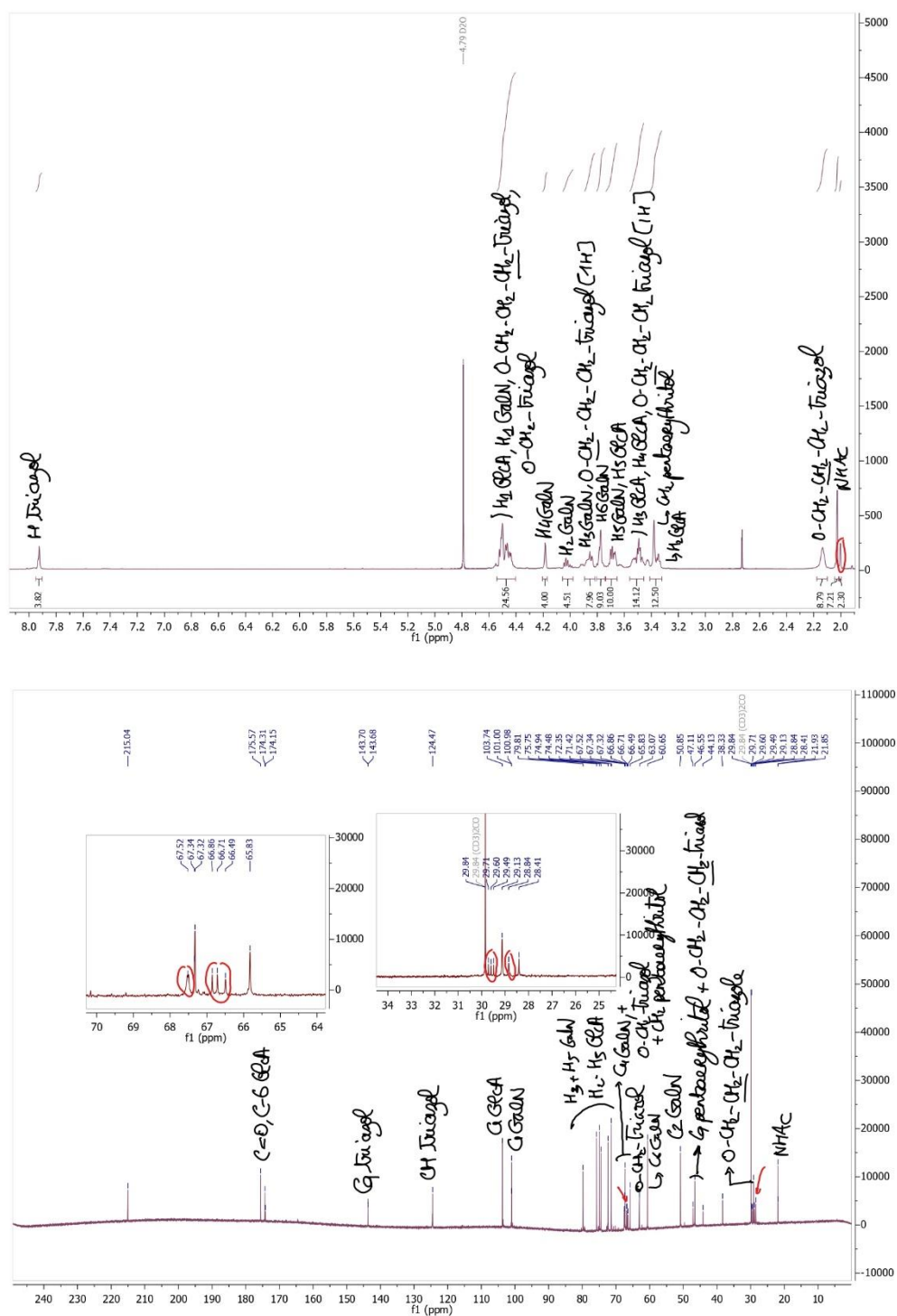


**Figure 52 :** RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C d'un disaccharide non-sulfaté tétravalent après purification de la plateforme.

Les mêmes impuretés sont retrouvées sur la RMN d'un disaccharide 4-sulfaté après purification de la plateforme (Figure 53).

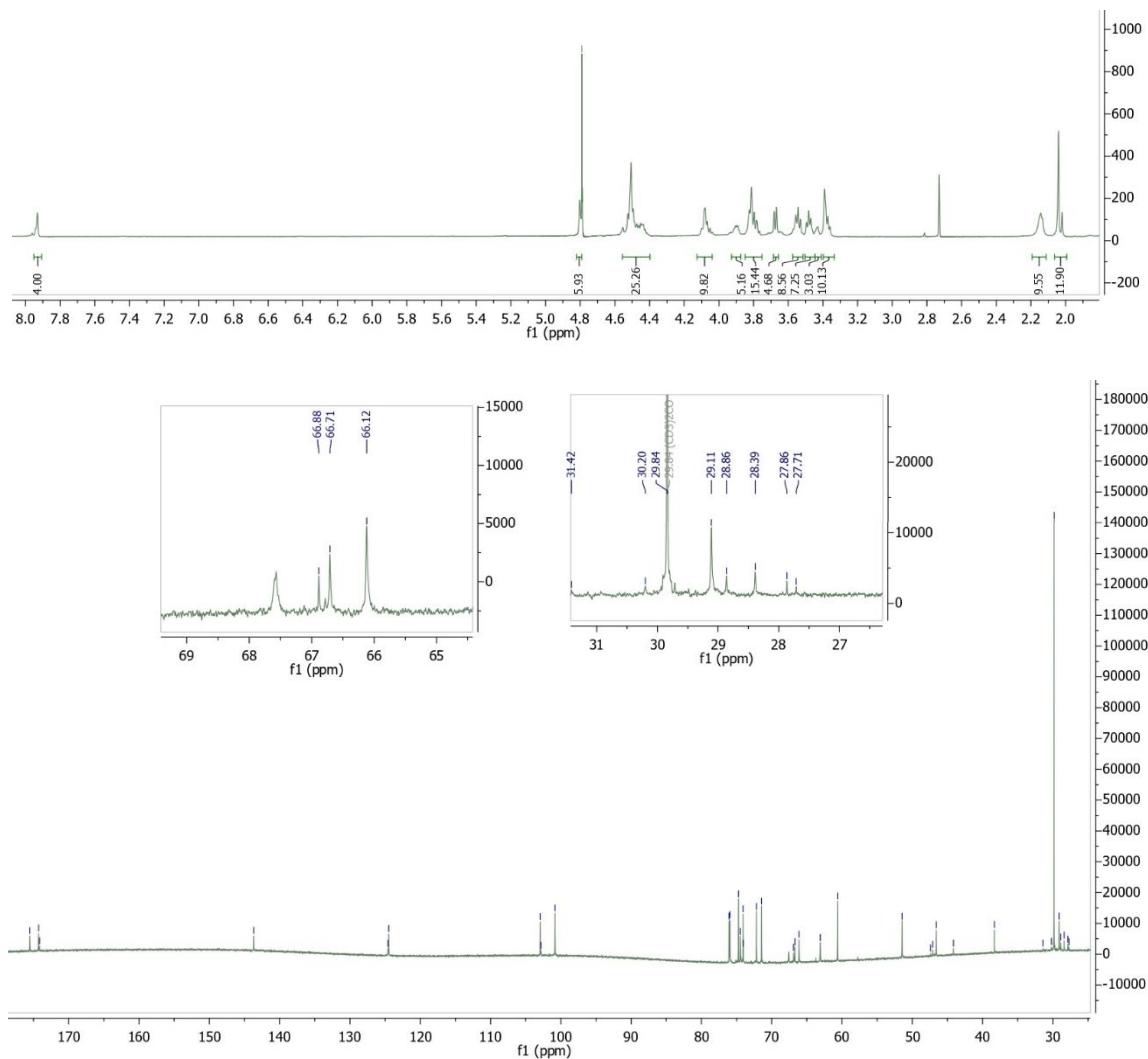


**Figure 53 :** RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) d'un disaccharide 4-sulfaté tétravalent.

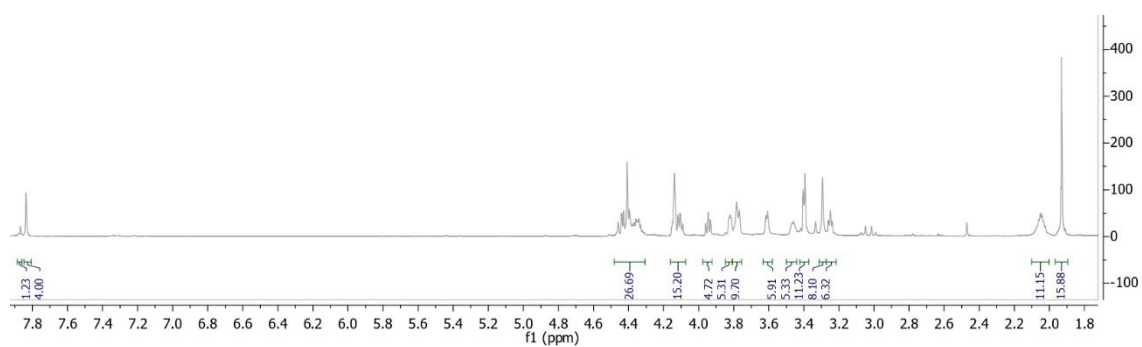


**Figure 54 :** RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) d'un disaccharide 6-sulfaté tétravalent.

### 4.3. ESSAIS DE CUAAC SUR UNE AUTRE PLATEFORME TRIVALENTE 193

Le produit secondaire **193** obtenu lors de la préparation de la plateforme tétravalente a été exploité afin d'obtenir des CS trivalents basés sur un squelette aliphatique (*Schéma 80*).

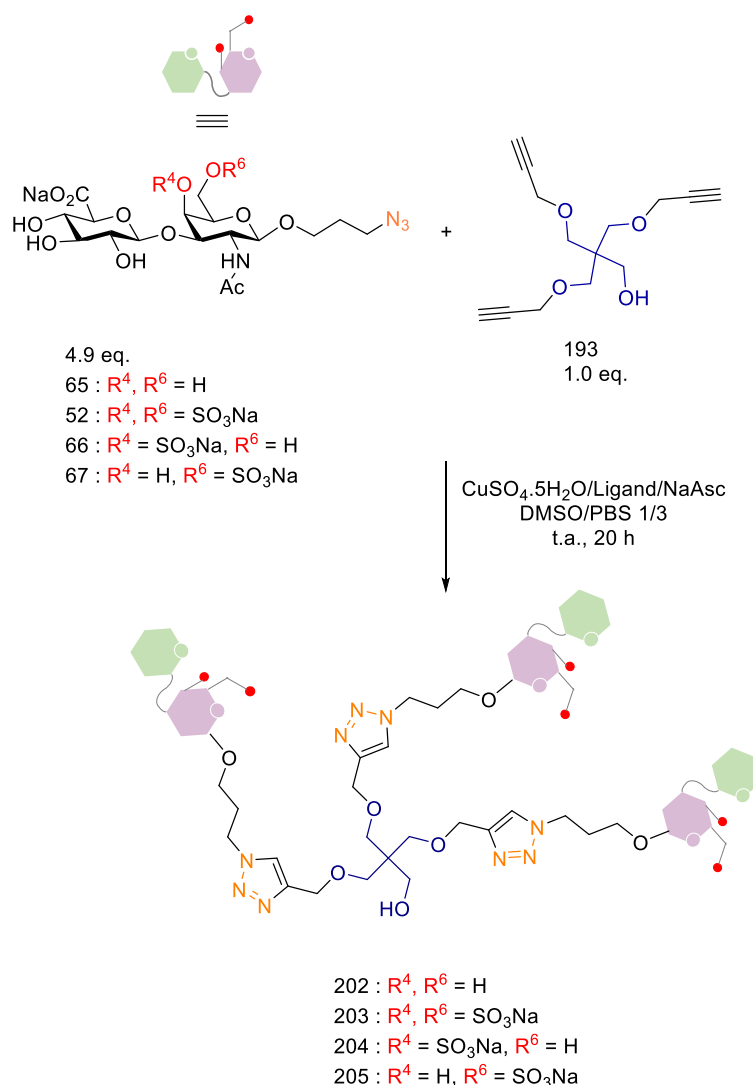


**Schéma 80** : Synthèse de disaccharides trivalents avec une plateforme aliphatique.

Pour le disaccharide non-sulfaté, un test avec 4 équivalents de cuivre a d'abord été testé et 49 % de rendement ont été obtenus avec le TBTA (*Tableau 13, entrée 1*). Augmenter le nombre d'équivalents de cuivre a permis d'obtenir un meilleur rendement de 62 % avec le TBTA et quantitatif avec le THPTA (*entrées 2 et 3*).

Pour le disaccharide di-sulfaté, les conditions appliquées par De Paz sur les disaccharides 4,6-disulfatés ont permis d'obtenir un bon rendement, peu importe le ligand (*entrées 4 et 5*). Cependant, aucun produit n'a été isolé dans le système de solvant DMSO/PBS 1/3.<sup>93</sup>

Pour le disaccharide 4-sulfaté, de faibles rendements ont été obtenus dans les deux systèmes de solvants avec le TBTA (*entrées 8 et 9*). Prolonger la durée de la réaction à 48 h n'a pas permis d'améliorer le résultat et le produit n'a pas été isolé (*entrée 10*). Finalement, le changement de ligand a permis d'obtenir le composé désiré avec 53 % de rendement (*entrée 11*).

Un seul essai a été réalisé avec le disaccharide 6-sulfaté et un faible rendement de 30 % a été obtenu. Le choix du ligand semble avoir un impact important sur la réaction avec cette plateforme. Par manque de temps et de produit de départ, la réaction avec le THPTA n'a pas pu être réalisée mais cela pourrait donner un meilleur rendement, il serait donc intéressant de tester ces conditions.

|    | Disaccharide  | Solvants (proportions) | Ligand | Rendement         |
|----|---------------|------------------------|--------|-------------------|
| 1  | Non-sulfaté   | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | 49 % <sup>1</sup> |
| 2  |               |                        |        | 62 %              |
| 3  |               |                        | THPTA  | Quant.            |
| 4  | 4,6-disulfaté | DMSO/PBS (1,6/1)       | TBTA   | 66 % <sup>2</sup> |
| 5  |               |                        | THPTA  | 65 % <sup>2</sup> |
| 6  |               | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | /                 |
| 7  |               |                        | THPTA  | /                 |
| 8  | 4-sulfaté     | DMSO/PBS (1,6/1)       | TBTA   | 24 % <sup>2</sup> |
| 9  |               | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | 18 %              |
| 10 |               |                        |        | / <sup>3</sup>    |
| 11 |               |                        | THPTA  | 53 %              |
| 12 | 6-sulfaté     | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | 30 %              |

**Tableau 13** : Optimisation de la CuAAC sur les disaccharides avec une plateforme trivalente aliphatique.

<sup>1</sup> équivalents CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O/TBTA/NaAsc 4/8/12 ; <sup>2</sup> conditions de De Paz *et al* (DMSO/PBS 1,6/1) ; <sup>3</sup> 48 h

En conclusion, cette plateforme trivalente aliphatique a pu être valorisée par l'obtention de composés trivalents avec des rendements allant de 30 à 100 %.

Les analyses RMN et HRMS ont pu être effectuées sur les différents composés obtenus.



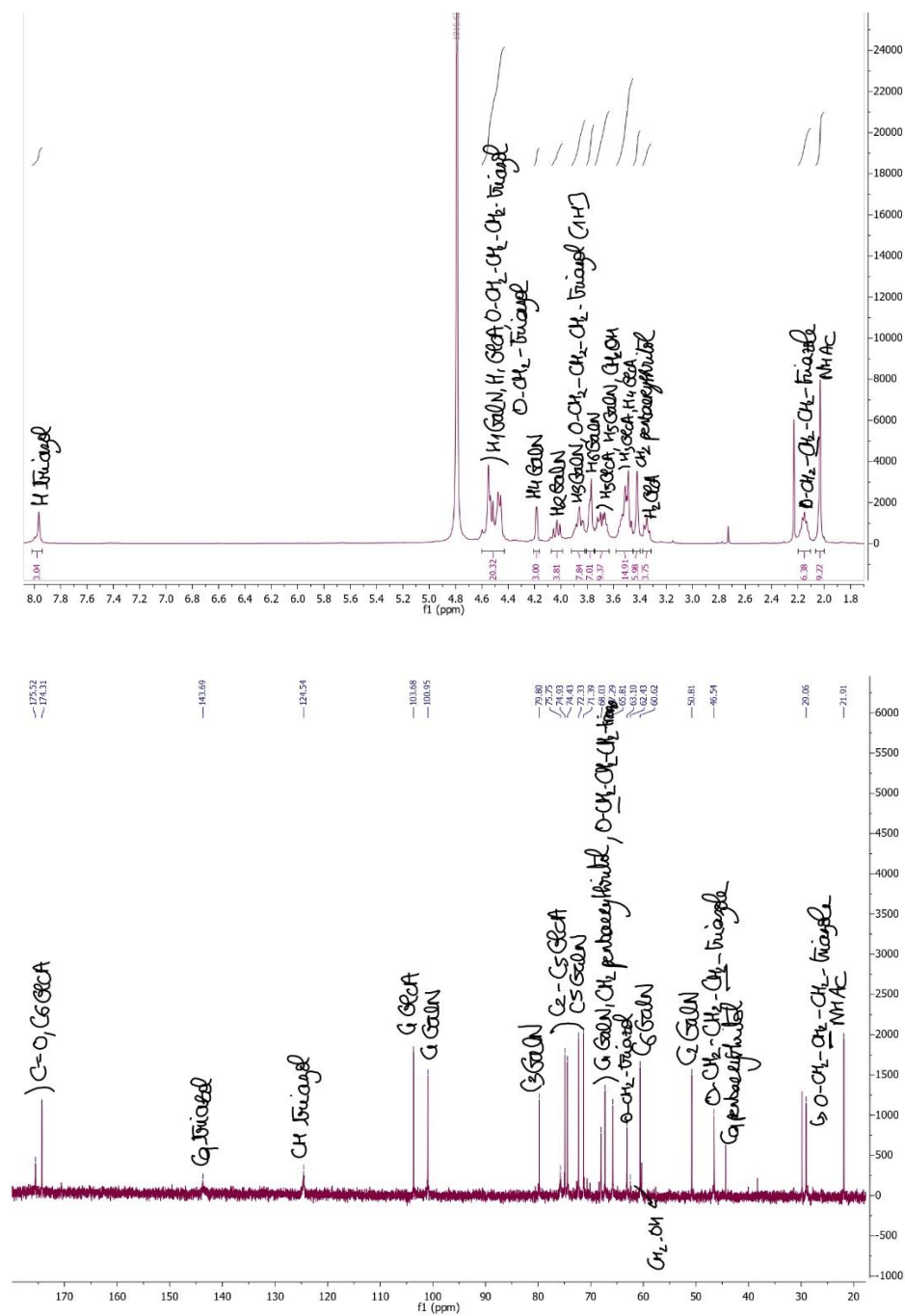


Figure 55 : RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (700 MHz, D<sub>2</sub>O) d'un disaccharide non-sulfaté trivalent (P3-OH).

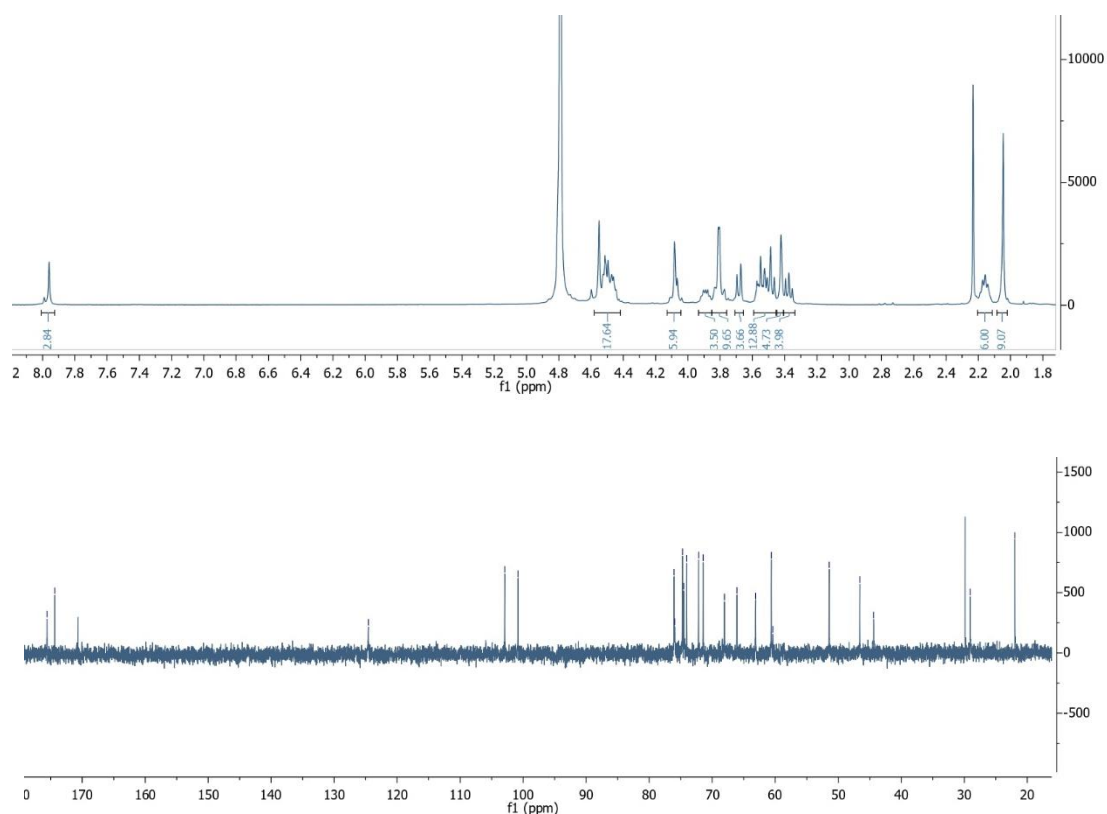


**Figure 56 :** RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) d'un disaccharide 4-sulfaté trivalent (P3-OH).

#### 4.4. ESSAIS DE CuAAC SUR DES CYCLODEXTRINES

Au laboratoire COBRA à l'Université de Rouen, l'équipe du Pr. Géraldine Gouhier travaille avec des cyclodextrines, et ce sont des  $\beta$ -cyclodextrines fonctionnalisées avec un alcyne qui ont été utilisées pour réaliser des essais préliminaires de CuAAC (*Figure 57, Tableau 14*). Le cuivre a été ajouté soit en large excès, soit en quantité catalytique. De plus, deux co-solvants organiques ont été utilisés et les micro-ondes ont été testées afin d'accélérer la réaction. Finalement, des mélanges de composés avaient été obtenus et étaient en attente de purification. Toutefois, les analyses RMN et les spectres de masse ont permis de montrer la présence du composé désiré. Ces résultats préliminaires semblaient encourageants.

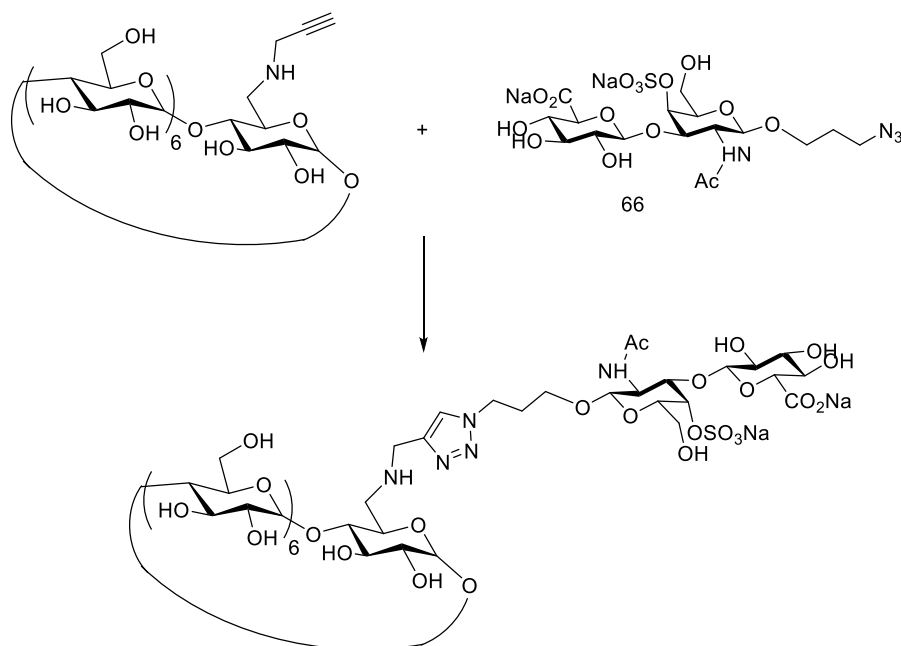


**Figure 57** : Réaction de CuAAC entre une cyclodextrine et un disaccharide de CS.

|    | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O/NaAsc (eq.) | Solvants                     | Durée  | T °C  |
|----|--------------------------------------------------|------------------------------|--------|-------|
| 1  | 1,5/3,0 eq.                                      | H <sub>2</sub> O/t-BuOH 4/1  | 48 h   | 40 °C |
| 2* | 0,22/0,44 eq.                                    | Dioxane/H <sub>2</sub> O 4/1 | 50 min | 70 °C |

**Tableau 14** : Conditions de réaction testées pour la CuAAC avec des cyclodextrines. \* Micro-ondes

## 5. CUAAC AVEC LES TRISACCHARIDES

### 5.1. TRISACCHARIDES TRIVALENTS ET TETRAVALENTS

Les meilleures conditions précédemment obtenues ont été transposées sur les trisaccharides mais, par faute de matière, nous n'avons pu travailler que sur les trisaccharides non-sulfatés (*Schéma 81*).

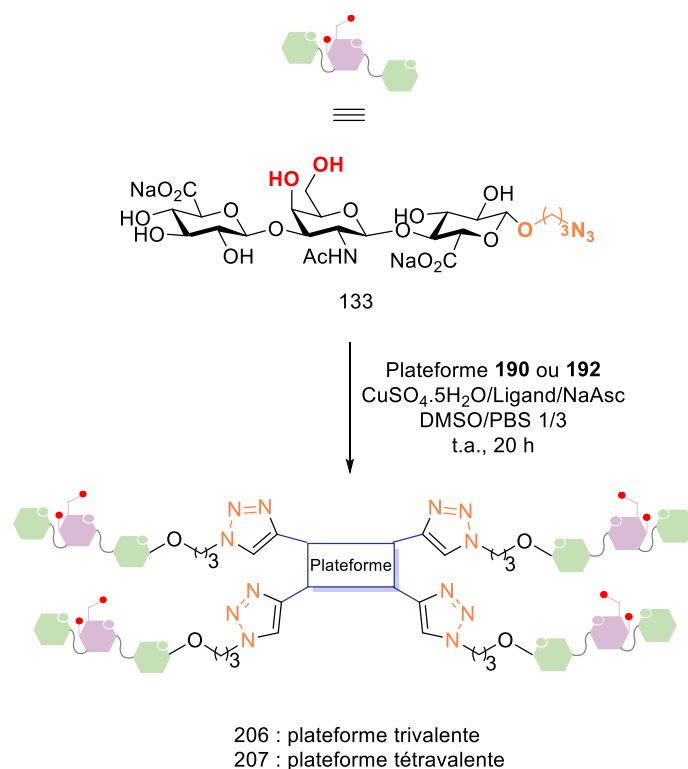


**Schéma 81** : Synthèse des trisaccharides non sulfatés multivalents avec les plateformes simples.

Avec la plateforme trivalente, seulement trois tests ont pu être réalisés dans le mélange DMSO/PBS 1/3 (*Tableau 15*). Cette fois-ci, les *entrées 1 et 2* montrent que le TBTA semble plus adapté pour la réaction car le rendement de réaction est de 44 % au lieu de 23 % pour le THPTA. Sachant qu'il y a une unité monosaccharidique supplémentaire, on compte deux hydroxyles et un carboxylate en plus qui peuvent complexer le cuivre. C'est pourquoi un test a été réalisé avec plus d'équivalents de cuivre/ligand/ascorbate de sodium mais le rendement n'a pas été amélioré (*entrée 3*).

Avec la plateforme tétravalente, un seul essai a été réalisé avec le mélange DMSO/PBS (1/3) et  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /TBTA/NaAsc (5/10/15) et le composé a été obtenu avec 46 % de rendement (*entrée 4*).

|   | Plateforme   | Solvants (proportions) | Ligand | Equivalents<br>Cu/ligand/NaAsc | Rendement |
|---|--------------|------------------------|--------|--------------------------------|-----------|
| 1 | Trivalente   | DMSO/PBS (1/3)         | THPTA  | 4/8/12                         | 23 %      |
| 2 |              |                        | TBTA   | 4/8/12                         | 44 %      |
| 3 |              |                        |        | 5/10/15                        | 44 %      |
| 4 | Tétravalente | DMSO/PBS (1/3)         | TBTA   | 5/10/15                        | 46 %*     |

**Tableau 15** : Essais de CuAAC avec les différentes plateformes et le trisaccharide non-sulfaté. \* impur

L'optimisation mérite d'être poursuivie afin d'obtenir de meilleurs rendements. Ensuite, les conditions pourront être transposées aux trisaccharides diversement sulfatés.

La RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz) du trisaccharide trivalent a été réalisée dans le  $\text{D}_2\text{O}$  (Figure 58).

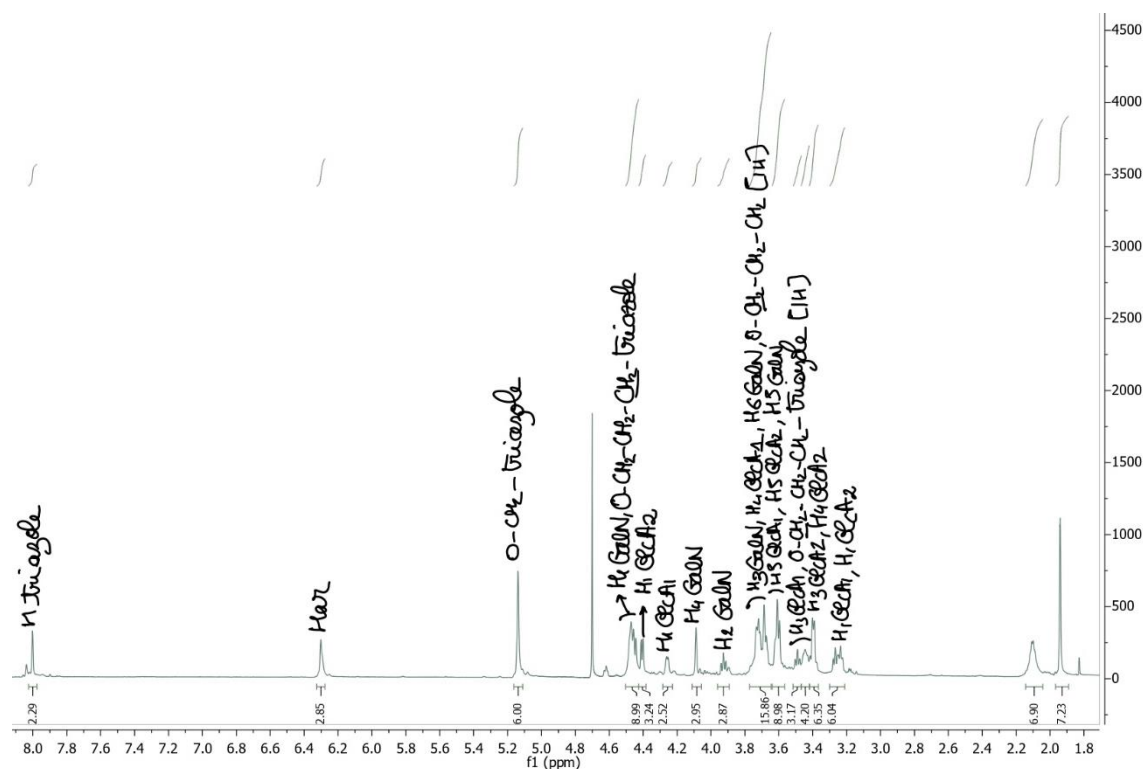


Figure 58 : RMN  $^1\text{H}$  du trisaccharide trivalent.

## 5.2. SYNTHÈSE DES NEOGLYCOPROTEINES

La société GLYcoDiag, une entreprise orléanaise spécialisée en glycosciences, fonctionnalise l'albumine de sérum bovin (BSA), une protéine de 66 kDa qui possède 59 résidus lysines et 35 cystéines. Cette protéine a été fonctionnalisée sur les lysines et environ 39 fonctions alcynes ont été greffées.<sup>122</sup>

Les quatre trisaccharides diversement sulfatés portant le bras azidopropyle **133**, **134**, **135** et **136** ont été fournis à la société GLYcoDiag afin qu'ils réalisent les réactions de CuAAC avec la BSA modifiée avec des alcynes (Schéma 82). Suite à cela, les néoglycoprotéines obtenues ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique (G25) et analysées par spectrométrie de masse de type MALDI-

<sup>122</sup> Prasch, H.; Hojnik, C.; Lindhorst, T. K.; Didak, B.; Landemarre, L.; Wrodnigg, T. M. *Carbohydr. Res.* **2019**, 475, 65–68.

TOF afin de déterminer le nombre moyen de trisaccharides greffés sur la BSA qui peut être calculé grâce à la différence de masse entre le produit de départ et d'arrivée.

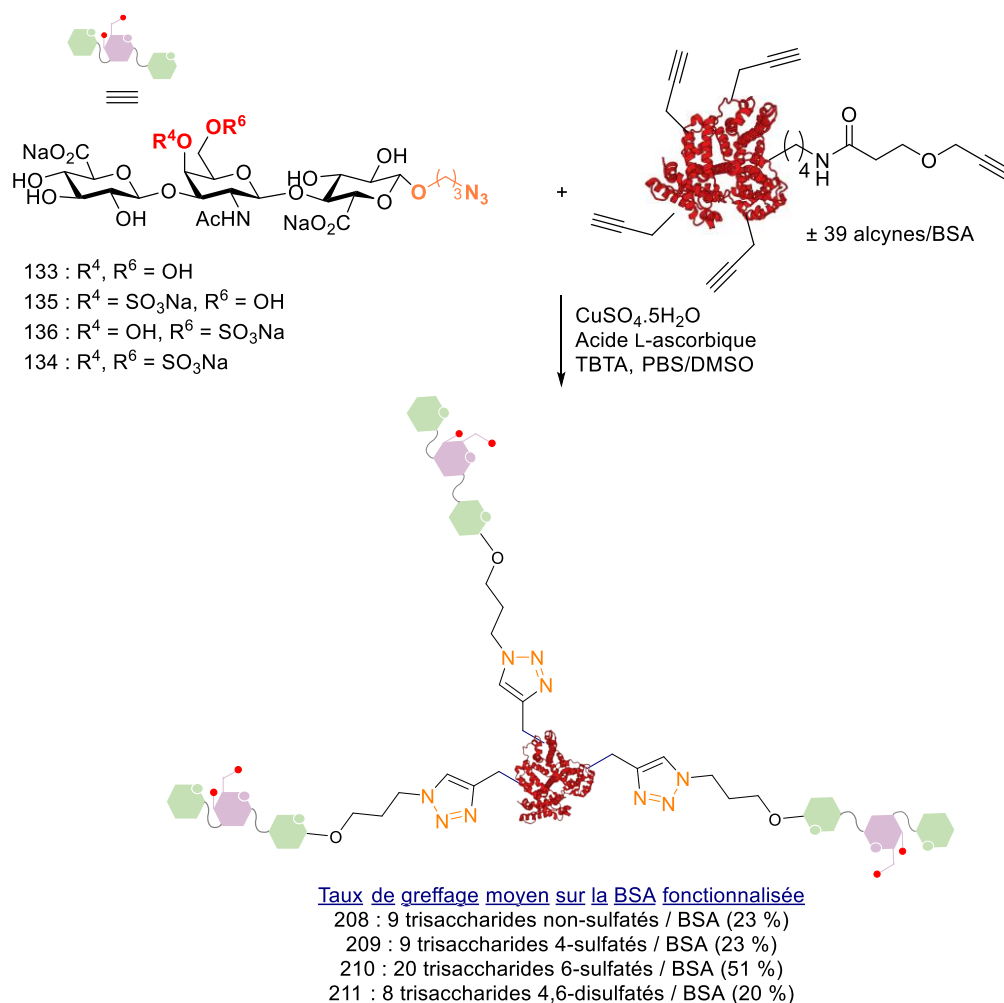


**Schéma 82** : Synthèse de néoglycoprotéines par GLYcoDiag.

Seul le trisaccharide 6-sulfaté présente un taux de greffage relativement haut, de l'ordre de 20 en moyenne. Les trois autres trisaccharides montrent un taux moyen moins important, entre 8 et 9. Auparavant, les disaccharides diversement sulfatés synthétisés par le Dr. Buisson avaient été greffés et des taux de greffage de 38 à 79 % avaient été obtenus.

Une collaboration avec GLYcoDiag nous aura donc permis d'obtenir 4 trisaccharides multivalents avec une valence plus importante.

## 5. CONCLUSION

Un total de 98 tests de CuAAC a été réalisé ce qui a permis d'accumuler des quantités de composés multivalents suffisantes pour les analyses et les tests biologiques. L'optimisation avec la plateforme trivalente et les disaccharides est terminée avec des rendements allant de 52 % à quantitatif mais différents problèmes rencontrés avec la plateforme tétravalente laissent cette optimisation en suspens avec des composés impurs. La synthèse des trisaccharides multivalents reste à poursuivre mais les néoglycoprotéines ont déjà pu être obtenues grâce à la collaboration avec GLYcoDiag. Enfin, des composés trivalents à partir d'une plateforme aliphatique ont pu être synthétisés en complément.

Tous les composés purs synthétisés ont été envoyés à notre partenaire du CEPR de Tours, le Dr. Fabien Lecaille, afin d'évaluer leur interaction avec la cathepsine K et ce travail est actuellement en cours.

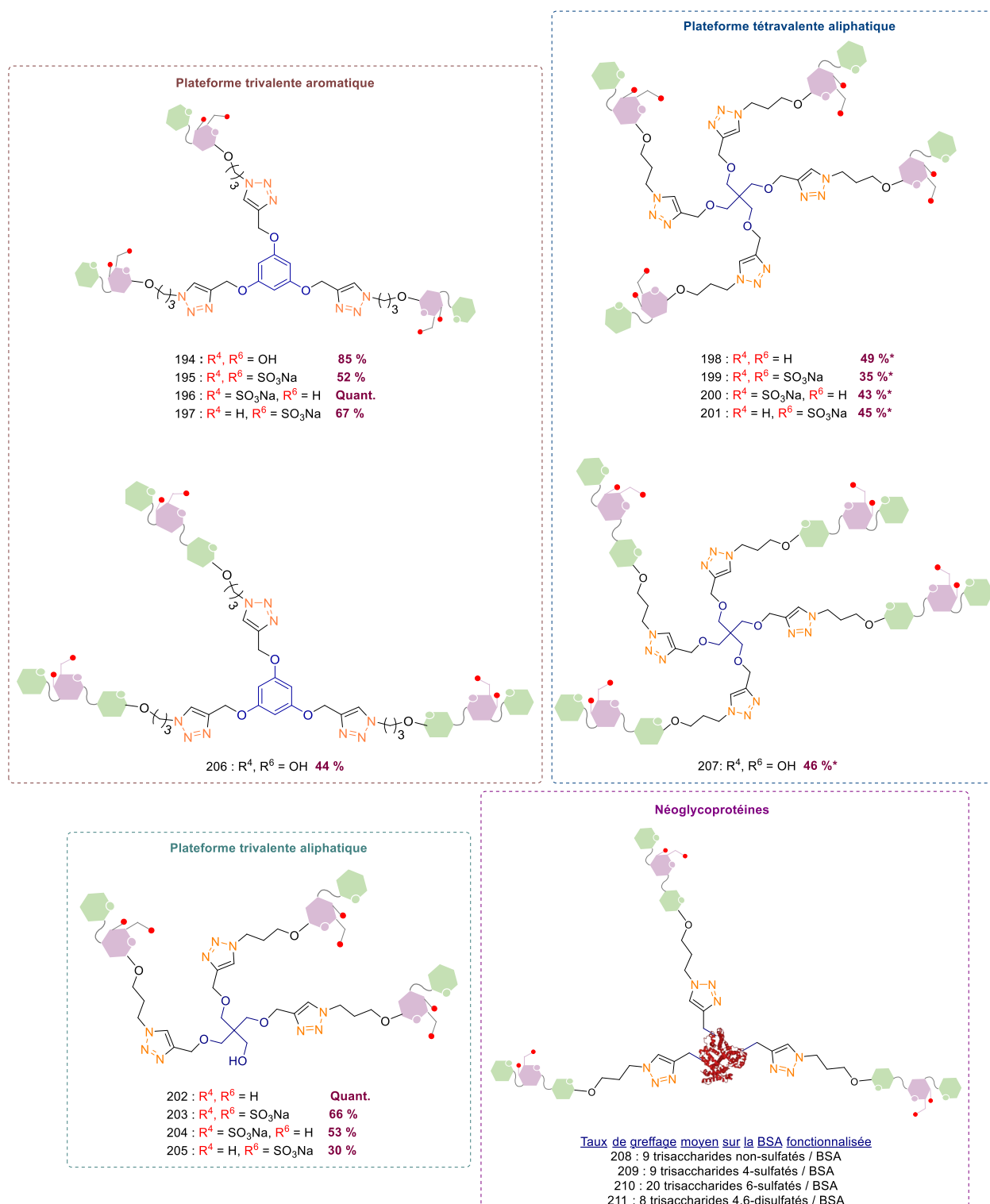


**Figure 59 : Composés multivalents synthétisés. \* impur**



# Conclusion et Perspectives



## 1. SYNTHÈSE DES OLIGOSACCHARIDES DE CS

L'objectif de cette thèse était de synthétiser une librairie d'oligosaccharides de sulfates de chondroïtine multivalents de différentes tailles (du di- à l'hexasaccharide) et différents motifs de sulfatation (CS-A, -C, -E et non-sulfaté) en utilisant différentes plateformes (aliphatique, aromatique, cyclodextrine, protéine). Tout d'abord, la synthèse des disaccharides développée par le Dr. Buisson a été réalisée à partir d'une hémisynthèse optimisée au laboratoire.<sup>96</sup> Grâce au groupement trifluoroacétyle utilisé pour protéger l'amine et à l'acétal benzylidène utilisé pour protéger sélectivement les positions 4 et 6 de la D-GalN, les disaccharides diversement sulfatés possédant un bras azidopropyle en aglycone ont pu être obtenus efficacement.<sup>99,100</sup>

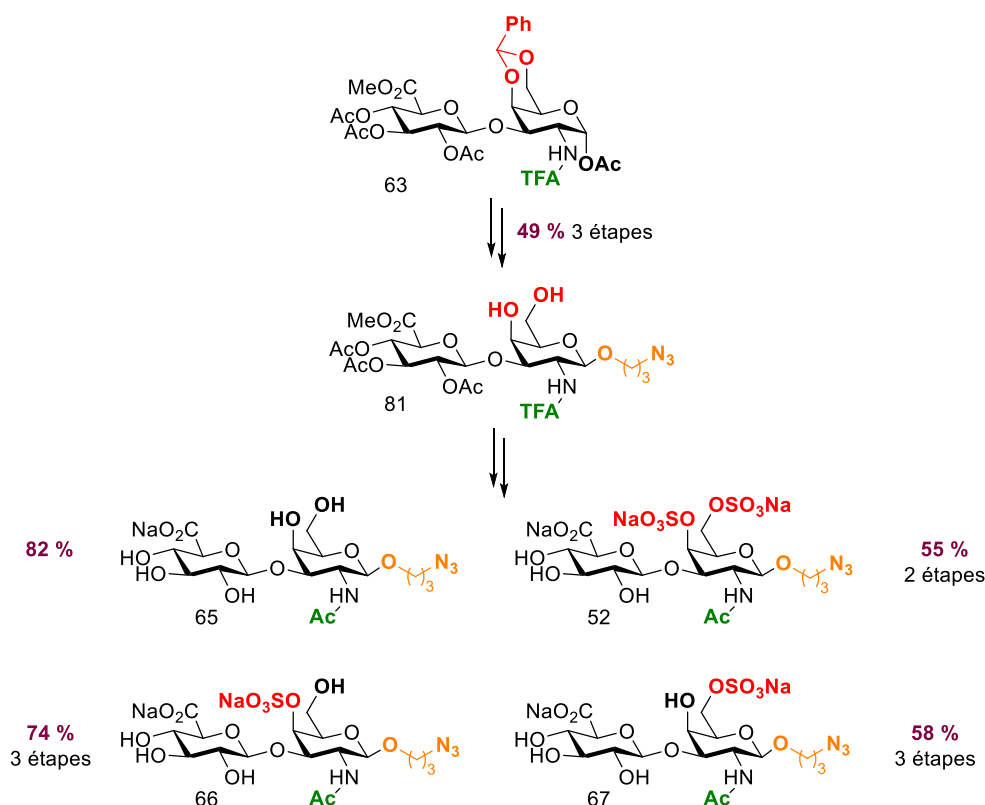


**Schéma 83 :** Synthèse de CS diversement sulfatés ou non-sulfaté.

La synthèse des tétrasaccharides a ensuite été explorée. Différents accepteurs et donneurs ont été synthétisés en utilisant le groupement chloroacétyle comme groupement protecteur temporaire des

futures positions à sulfater. Cependant, la synthèse des disaccharides donneurs portant un chloroacétate a été difficile en raison d'étapes limitantes (chloroacétylation et activation *via* trichloroacétimide) : le nombre d'étapes et les rendements moyens n'ont pas permis d'avoir une grande quantité de produit et seul le donneur dichloroacétylé **94** a pu être obtenu, avec des rendements variables pour la dernière étape. Les donneurs peracétylés ont été obtenus et les accepteurs portant un groupement azide en aglycone ont également été synthétisés. Au total, 5 blocs donneurs et 3 blocs accepteurs ont pu être synthétisés.

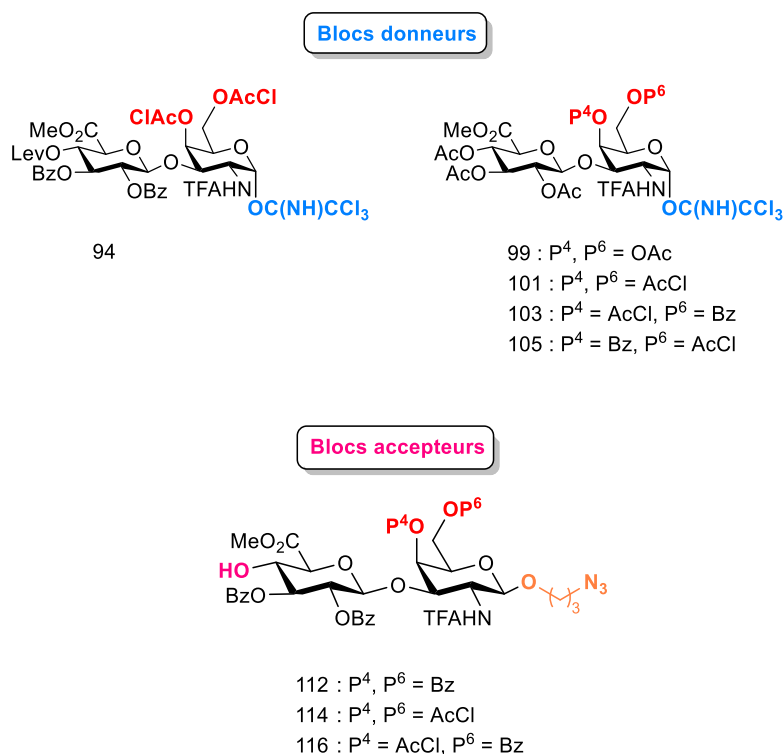


**Schéma 84** : Librairie de blocs donneurs et accepteurs synthétisés.

Les glycosylations [2+2] entre les différents donneurs et accepteurs ont permis d'atteindre les tétrasaccharides correspondants avec des rendements faibles. Cependant, un tétrasaccharide non-sulfaté déprotégé a été synthétisé avec 36 % de rendement. Un test a également été réalisé avec le groupement 2-naphtylméthyle en aglycone, permettant d'envisager une nouvelle voie de synthèse des tétrasaccharides mais, par manque de temps, celle-ci n'a pas pu être explorée.

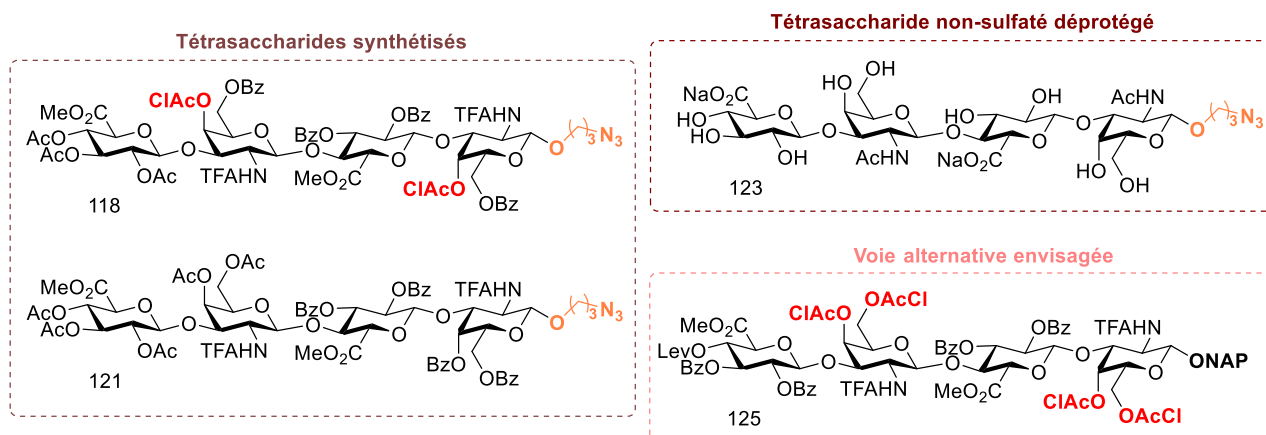
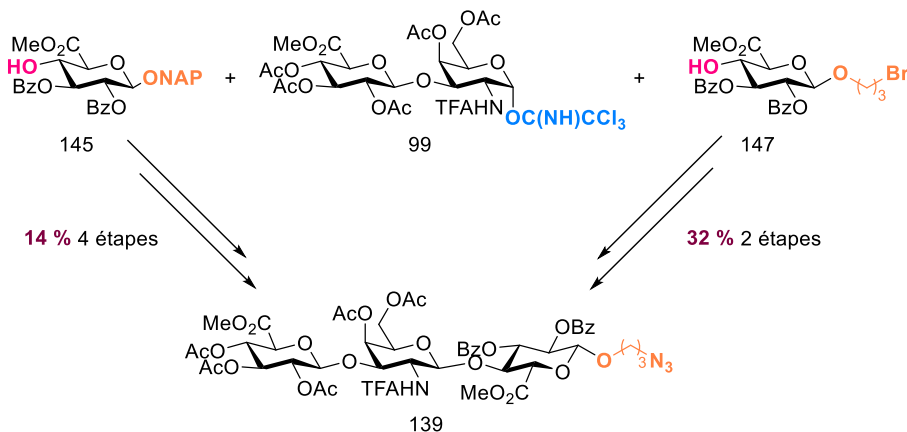


**Schéma 85 :** Tétrasaccharides synthétisés.

Grâce à un monosaccharide disponible au laboratoire, la synthèse de trisaccharides a été explorée. Tout d'abord, 2 accepteurs ont été synthétisés et des glycosylations avec le donneur **99** ont permis d'effectuer la réaction de type [2+1] a été réalisée avec le bras azidopropyle en aglycone mais, à nouveau, de faibles rendements ont été obtenus. Différents accepteurs ont alors été testés pour obtenir le trisaccharide protégé non-sulfaté.



Le dérivé bromé a été choisi mais cela a entraîné un changement de groupement protecteur pour les futures positions à sulfater. Après avoir synthétisé les donneurs avec des groupements lévulinoyles en position 4 et/ou 6 de la GalN, les trisaccharides diversement sulfatés ont pu être obtenus.

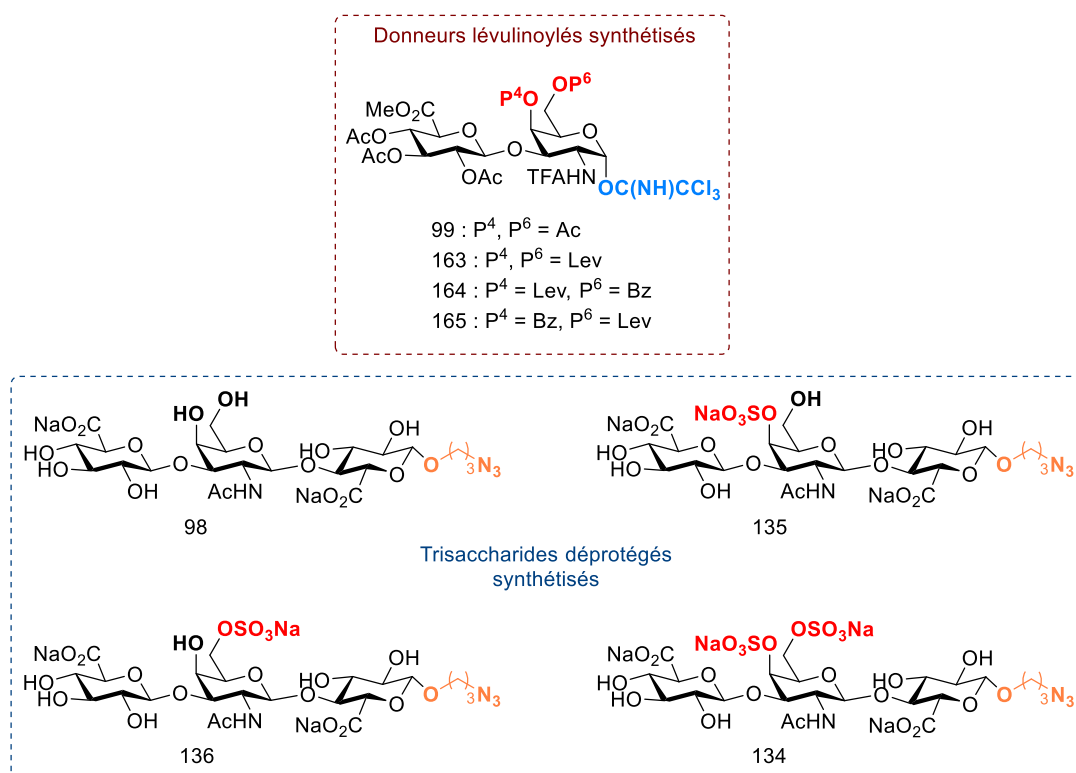


**Figure 60 :** Composés synthétisés.

## 2. SYNTHÈSE DES COMPOSÉS MULTIVALENTS

Pour finir, les oligosaccharides multivalents ont été synthétisés par chimie CuAAC entre différentes plateformes et les oligosaccharides. Tout d'abord, la CuAAC a été réalisée entre le disaccharide non-sulfaté déprotégé avec une plateforme trivalente aromatique. Puis, les conditions ont été transposées aux disaccharides sulfatés sur la même plateforme. Les 4 disaccharides tétravalents ont par la suite été obtenus grâce au greffage des CS sur une plateforme tétravalente aliphatique. Suite à des analyses HILIC-HRMS réalisées, des impuretés ont été détectées, les composés sont donc en cours de purification. Une plateforme trivalente dérivant de la préparation de la plateforme tétravalente a également été utilisée afin de synthétiser 4 autres CS trivalents.

Le trisaccharide non-sulfaté a été greffé sur les plateformes aromatique et aliphatique. Dans le cadre de la collaboration avec GLYcoDiag, les trisaccharides de CS diversement sulfatés ont été greffés sur une protéine, la BSA modifiée avec des alcynes et 4 néoglycoprotéines ont alors été obtenues.

Tous ces composés multivalents ont été envoyés à notre partenaire du CEPR de Tours pour une évaluation de leur activité sur la cathepsine K.

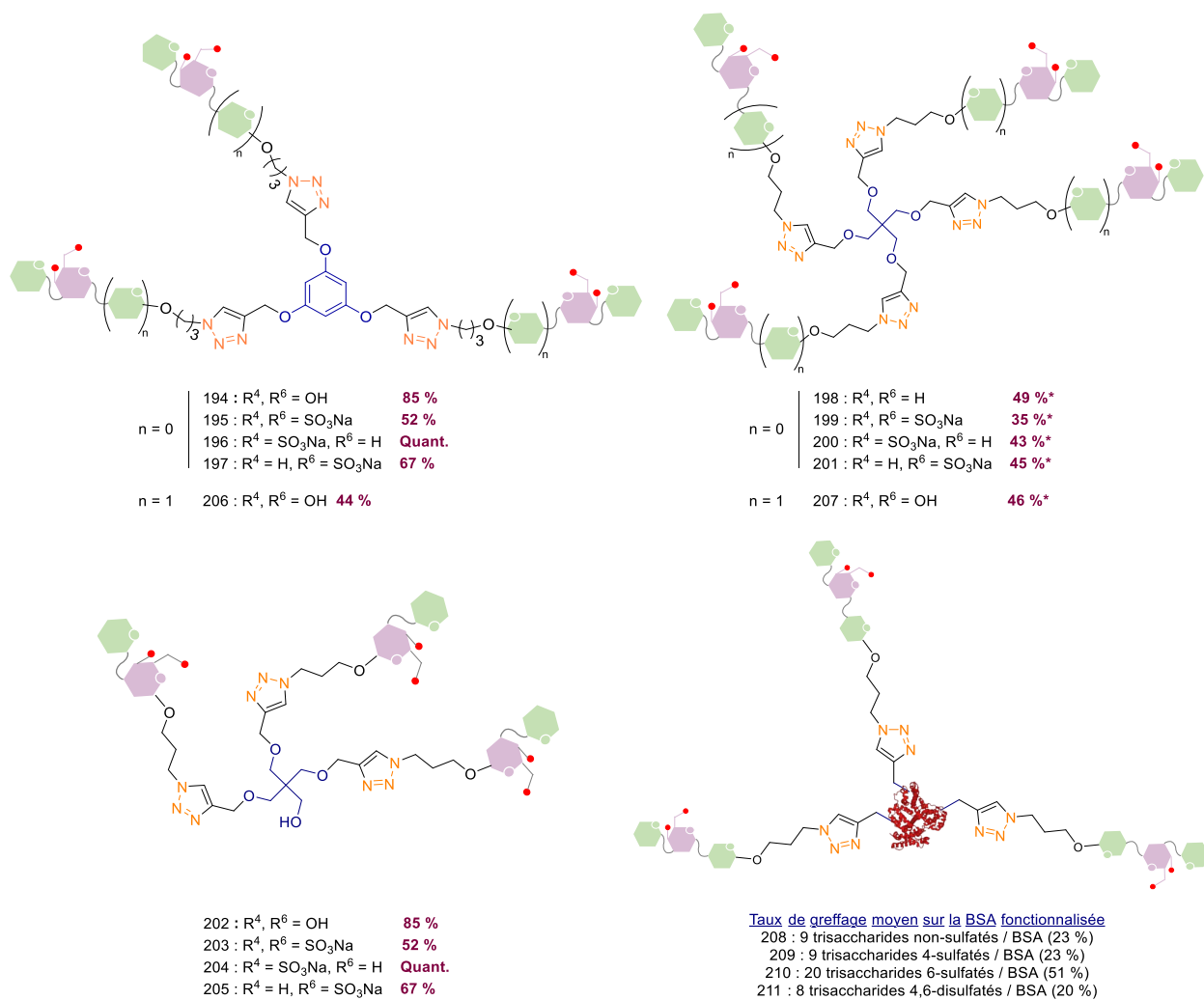


**Schéma 87** : Composés multivalents synthétisés.

La synthèse des trisaccharides étant terminée, il pourrait être judicieux de repartir sur la synthèse des tétrasaccharides. Cependant, les réactions de glycosylation faisant intervenir un accepteur porteur d'un groupement azide semblent difficilement réalisables. Il serait alors intéressant d'explorer les stratégies avec le 2-naphthylméthyle ou le 3-bromopropyle afin de pallier ce problème. Dans le cadre des composés sulfatés, les groupements lévulinoyles utilisés pour protéger temporairement les positions 4 et/ou 6 de la GalN ont permis d'atteindre les donneurs désirés avec de bons rendements mais cette voie de synthèse nécessiterait de changer le groupement protecteur en position 4 du GlcA par un TBS par exemple.

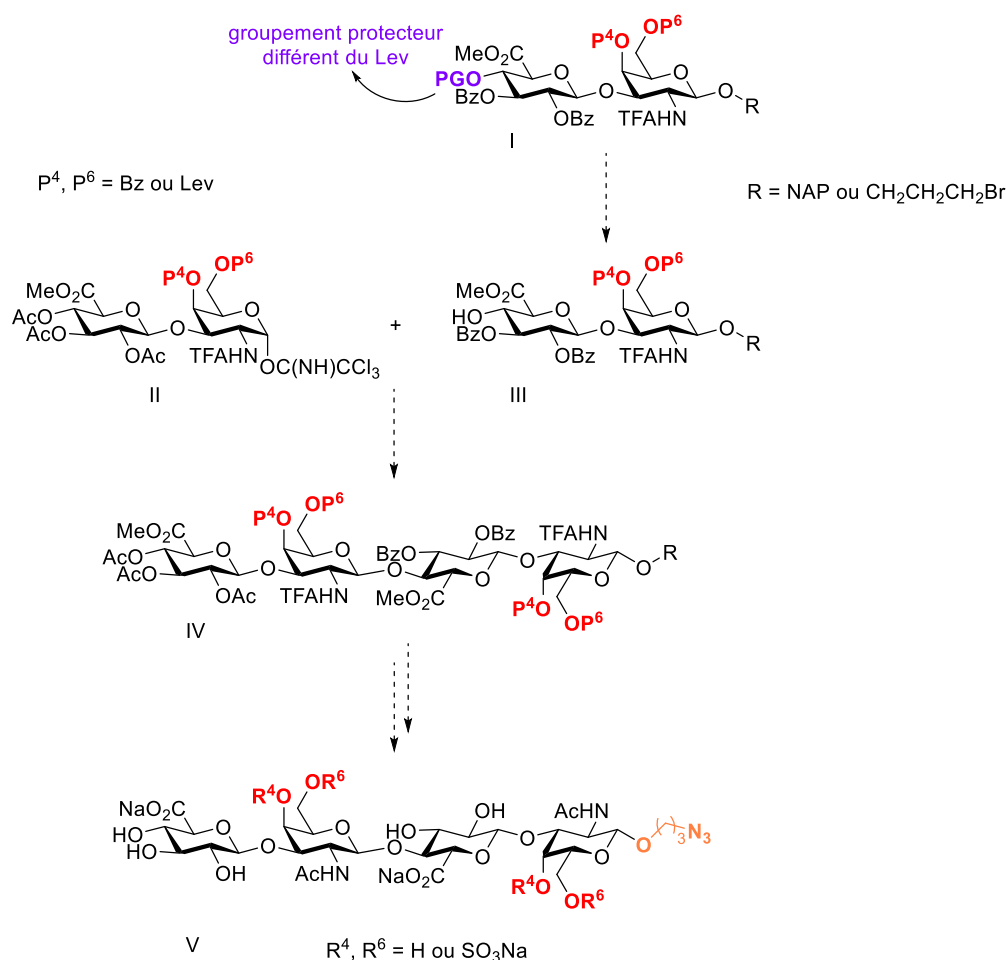


**Schéma 88** : Stratégies envisageables pour synthétiser les tétrasaccharides.

Finir la synthèse des tétrasaccharides pourrait permettre de greffer de nouveaux oligosaccharides sur les plateformes.



Ensuite, la librairie de multivalents n'est pas complète et doit donc être terminée. En effet, les disaccharides tétravalents sont en cours de purification par HILIC à l'échelle préparative, et la synthèse des trisaccharides sulfatés tri- et tétravalents n'a pas été réalisée. De plus, l'utilisation de cyclodextrines modifiées en tant que plateforme avait été envisagée mais n'a pas pu être menée à bout pour le moment : le greffage des oligosaccharides pourra être réalisé sur des  $\beta$ -cyclodextrines entièrement fonctionnalisées permettant ainsi d'obtenir une valence de 7 (Figure 45).

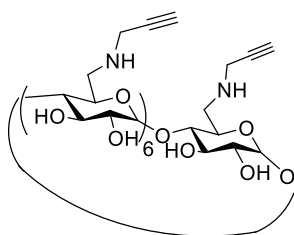


**Figure 61** :  $\beta$ -cyclodextrines entièrement fonctionnalisées.

La synthèse des composés tétravalents étant plus difficile à réaliser que pour les trivalents, il peut être envisagé de changer de plateforme et de mode de ligation tout en gardant la même valence. Afin de s'affranchir du groupement azide qui pose problème pour la synthèse des oligosaccharides de CS, l'alcyne terminal pourrait être introduit sur l'aglycone.<sup>87</sup> La plateforme contiendrait alors le groupement azide afin de poursuivre avec les CuAAC. L'inconvénient de cette méthode est l'utilisation de plateformes polyazotées. Des discussions avec le Pr. Olivier Renaudet pour qu'il fournisse à l'équipe différentes plateformes (soit fonctionnalisées avec des azides, soit avec des alcynes) sur lesquelles pourraient être greffés des oligosaccharides sont actuellement en cours.

La chimie bioorthogonale est également très intéressante puisqu'elle permettrait de ne plus utiliser de cuivre. C'est pourquoi le greffage de nos oligosaccharides sur des cyclooctynes peut être envisagée *via* SPAAC.

Pour éviter la manipulation de composés polyazotés, un autre moyen de ligation peut alors être envisagé. Une amine en bout de chaîne permettrait de réaliser des ligations *via* la formation d'un amide sur une plateforme fonctionnalisée avec des esters activés comme l'équipe de Zubkova a pu le faire avec les sulfates d'héparanes ou l'équipe de Taniguchi avec les sulfates de kératane (*voir Introduction, 4.2. GAGs multivalents*).<sup>83,84</sup>

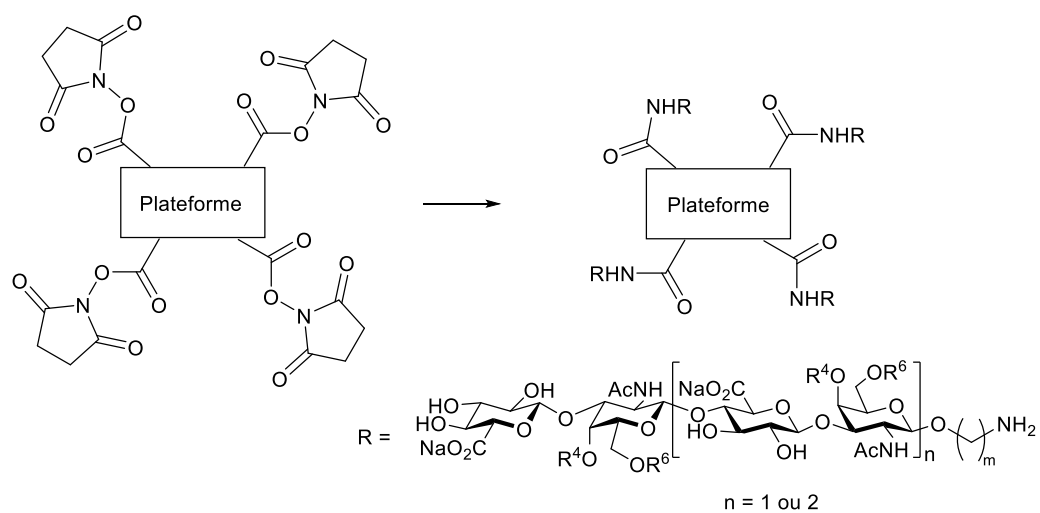


**Schéma 89** : Exemple de ligation envisageable pour la synthèse d'oligosaccharides multivalents.

# Partie expérimentale



### General methods:

Commercial solvents and reagents were purchased from Sigma-Aldrich, Fisher, TCI, Biosynth, BLD Pharm and Fluorochem suppliers. Anhydrous solvents were dried by standard methods: DCM was distilled over  $P_2O_5$ , THF and acetonitrile were purified with a dry station GT S100, DMF, methanol and toluene were dried over molecular sieves. Molecular sieves (4 Å, powder) were activated overnight in oven Erschem at 500 °C. Hydrazine acetate was recrystallized in methanol prior to use. For the anhydrous reaction, all glassware were dried in oven overnight (100°C), then removed and cooled down to room temperature under argon flow. Argon flow was dried under a solution of concentrated  $H_2SO_4$  solution and  $CaCl_2$ .

Flash silica column chromatography was performed on silica gel 60N (spherical, neutral, 40-63 µm, Merck). The reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60F254 precoated aluminium plates. Spots were visualised under ultraviolet light ( $\lambda = 254$  nm or  $\lambda = 365$  nm) and by charring with a 10%  $H_2SO_4$  ethanolic solution, a solution of potassium permanganate, ninhydrin in ethanolic solution or Hanessian's stain.

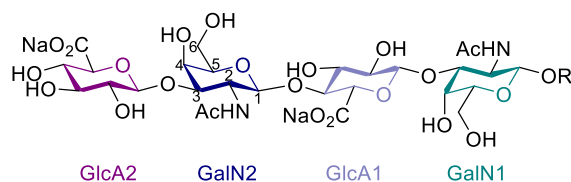
Infrared spectra (ATR) were obtained with spectrophotometer Perkin-Elmer PARAGON 1000PC instrument and values are reported in  $cm^{-1}$ . Mass Spectra were performed on a Perkin-Elmer Sciex API 300 (low resolution) and a Bruker Q-TOF MaXis (High resolution, electrospray ionization (ESI) mode) from the "Federation de Recherche" ICOA/CBM. Melting points were determined into open capillary tubes using a Buchi Melting Point B-545. Optical rotations were measured at 20 °C into sodium light using a Jasco P-2000 polarimeter with a quartz tank with a path length of 1 cm, values are given in  $deg.dm^{-1}.g^{-1}.mL^{-1}$  with concentrations reported in  $g.100mL^{-1}$ .

$^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR and  $^{19}F$  NMR were recorded with respectively Bruker Avance II 250 MHz, a Bruker Avance III HD Nanobay 400 MHz or a Bruker 700 Mhz (owned to CBM, CNRS).  $CD_3OD$ ,  $DMSO-d_6$  and mainly  $CDCl_3$  with tetramethylsilane as intern reference (pic at 0 ppm) were used as deuterated solvent. Acetone was added in  $D_2O$  NMR sample as a reference for  $^{13}C$  NMR. Assignments were based on DEPT135 sequence, homo- and heteronuclear 2D correlations. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm). Coupling constants ( $J$ ) are reported, expressed in Hertz (Hz), and rounded to the nearest 0.5 Hz, splitting patterns are designated as b (broad), s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), t (triplet), dt (doublet of triplet), q (quartet) or m (multiplet). To simplify the NMR attribution, protecting and activated groups have been abbreviated: acetyl group (OAc), benzylidene group (CH-Ph), p-methoxyphenyl group (MP), 2-Naphthylmethyl group (NAP), tosyl group (Ts), trifluoroacetyl group (TFA). The abbreviation Cq refer to a quarternary carbon. Proton and carbon signal assignments were established using COSY, HSQC and HMBC experiments.

The following solvents have been abbreviated: DCM (dichloromethane), DMF (*N,N*-dimethylformamide), EA (ethyl acetate), EtOH (ethanol), MeOH (methanol), PE (petroleum ether) and THF (tetrahydrofuran). A gradient starting from 85/15 to 0/100 of H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid/ACN + 0.1% formic acid was performed for 90 seconds.

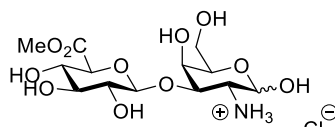
Liquid-chromatography Mass-spectroscopy (LC-MS) was performed on a Thermo Scientific UltiMate 3000 UHPLC with a column Waters "Acquity UPLC C18 BEH" 1,7µm 2,2 x 50 mm. Two detectors were used: a DAD detector and a quadripole MSQ Plus ESI (250 °C, 75 éV). The column was in an oven at 40 °C and the flow at 0,5 mL/min.

#### Numbering of molecules



Only procedure and <sup>1</sup>H NMR will be given for products which has been described by Dr. Buisson.

**O-(Methyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-amino-2-deoxy-D-galactopyranose hydrochloride  
salt **41****

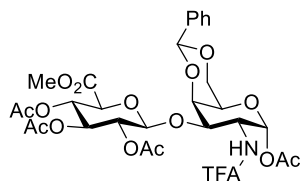


Chemical Formula:  $C_{13}H_{24}NO_{11}^{+}$   
Molecular Weight: 370,33

Disaccharide **41** (37 g) was obtained by acid hydrolysis of chondroitin sulfate A sodium salt from bovine trachea commercially available (50 g) using known reported procedure.

Lopin, C., Jacquinet, J.-C. From Polymer to Size-Defined Oligomers: An Expeditious Route for the Preparation of Chondroitin Oligosaccharides. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 2574–2578.

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1-*O*-acetyl-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **63****



Chemical Formula: C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>16</sub>  
Molecular Weight: 721,59

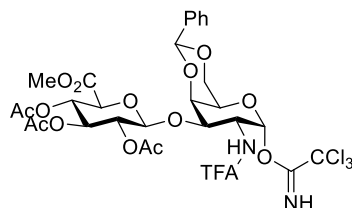
Ethyl trifluoroacetate (21.6 mL, 0.18 mol, 2.6 eq.) and Et<sub>3</sub>N (19.5 mL, 0.14 mol, 2.0 eq.) were added to a solution of the disaccharide **41** (28.4 g, 69.99 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (17.5 mL, 0.4 M). The reaction was stirred for 24 h at room temperature. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure and used without any further purification.

Trifluoroacetic acid (11.4 mL, 0.15 mol, 2.1 eq.) was added to a solution of the previously crude disaccharide in benzaldehyde (227 mL, 0.30 M) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 24 h at room temperature then AcONa (24.4 g, 0.30 mol, 4.2 eq.) was added at room temperature and after 30 min Ac<sub>2</sub>O (79 mL, 0.84 mol, 12.0 eq.) and pyridine/DCM 1/1 (228 mL, 0.30 M). The reaction mixture was stirred for 24 h then poured into ice. The reaction mixture was extracted 3 times with DCM, then the combined organic layers were washed twice with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The desired product **63** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/DCM 1/3 up to DCM then DCM/Acetone 9/1) as a yellow solid (25.1 g, 50 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) :** 7.50-7.53 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.34-7.40 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 6.88 (bs, 1H, NH), 6.47 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.52 (s, 1H, CH-Ph), 5.21-5.30 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.08 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.97 (d, 1H, H-1 GlcA), 4.68 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.28 (dd, <sup>2</sup>J<sub>6a-5</sub> = <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 12.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 4.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.07 (d, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 12.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 3.84-3.81 (m, 1H, H-5 GalN), 3.74 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.19, 2.06, 2.04, 2.03 (s, 12H, OC(O)CH<sub>3</sub>).



***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-1-*O*-trichloroacetimidoyl- $\alpha$ -D-galactopyranose **64****



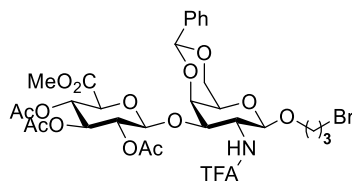
Chemical Formula:  $C_{30}H_{32}Cl_3F_3N_2O_{15}$   
Molecular Weight: 823,93

Hydrazine acetate (900 mg, 9.99 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of the disaccharide **63** (4.8 g, 6.66 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (32 mL, 0.15 g/mL) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 1h. Water and ice were added to the mixture and it was stirred for 15 min. Then, the reaction was extracted 3 times with EA and the combined organic layers were washed 5 times with brine, dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (6.7 mL, 66.60 mmol, 10.0 eq.) and DBU (0.25 mL, 1.67 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the previous disaccharide in anhydrous DCM (37 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 5h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **64** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 55/45 + 0.5 %  $Et_3N$ ) as a white solid (3.86 g, 71 % over 2 steps).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 8.79 (s, 1H,  $NHC(O)CCl_3$ ), 7.49-7.51 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.33-7.38 (m, 3H,  $H_{ar}$ ), 6.79 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 6.61 (d,  $^3J_{1-2} = 3.5$  Hz, 1H, H-1 GalN), 5.52 (s, 1H, CH-Ph), 5.15-5.26 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.08 (t,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.97 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.74 (ddd,  $^3J_{2-1} = 3.5$  Hz,  $^3J_{2-NH} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 11.0$  Hz, 1H, H-2 GalN), 4.51 (d,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 1H, H-4 GalN), 4.37 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.0$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.29 (dd,  $^3J_{6a-5} = 1.5$  Hz,  $^2J_{6a-6b} = 13.0$  Hz 1H, H-6a GalN), 4.03-4.14 (m, 2H, H-5 GlcA, H-6b GalN), 3.90 (bs, 1H, H-5 GalN), 3.68 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 2.01, 2.00, 1.98 (s, 9H,  $OC(O)CH_3$ ).

**3-Bromopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside 79**

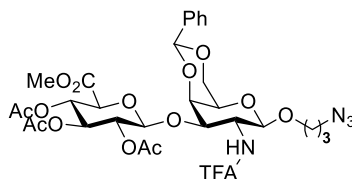


Chemical Formula:  $C_{31}H_{37}BrF_3NO_{15}$   
Molecular Weight: 800,53

3-bromo-1-propanol (0.68 mL, 7.57 mmol, 1.6 eq.) was added to a solution of imidate **64** (3.9 g, 4.73 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (39 mL, 0.12 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 45 min at room temperature. Then  $BF_3 \cdot Et_2O$  46% 1 M in toluene (267  $\mu$ L, 1.00 mmol, 0.25 eq.) was added and the reaction mixture was stirred from -60 °C to -20 °C for 2h.  $Et_3N$  (0.49 mL, 3.55 mmol, 0.75 eq.) was added and the reaction was stirred for 10min at room temperature. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5/5 PE/EA + 0.5 %  $Et_3N$ ) to give the desired disaccharide **79** as a white solid (2.30 g, 61 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 7.54-7.55 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.36-7.42 (m, 3H,  $H_{ar}$ ), 6.97 (d,  $^3J_{NH-2}$  = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.56 (s, 1H, CH-Ph), 5.19-5.25 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.01-5.06 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.99 (d,  $^3J_{1-2}$  = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.97 (d,  $^3J_{1-2}$  = 9.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.53 (dd,  $^3J_{3-4}$  = 3.5Hz,  $^3J_{3-2}$  = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.42 (d,  $^3J_{4-3}$  = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.33 (dd,  $^3J_{6a-5}$  = 1.5 Hz,  $^2J_{6a-6b}$  = 12.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.99-4.09 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6b GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.79-3.86 (m, 1H, H-2 GalN), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.63-3.69 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.51 (bs, 1H, H-5 GalN), 3.45-3.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.11-2.19 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-a), 1.99-2.06 (m, 10H, OC(O)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-b).

**3-Azidopropyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)- 4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **80****

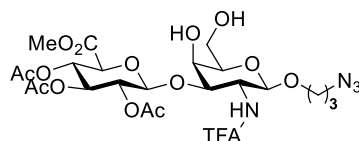


Chemical Formula:  $C_{31}H_{37}F_3N_4O_{15}$   
Molecular Weight: 762,65

Sodium azide (1.01 g, 15.60 mmol, 10.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **79** (1.24 g, 1.56 mmol, 1.0 eq.) in acetone/H<sub>2</sub>O 2/1 (26 mL, 0.06 M). The reaction was heated at 70 °C for 3h30. Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature and cold water was added. The resulting precipitate was filtered to give the desired product **80** as a white solid (1.01 g, 85 %) was obtained.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm)** : 7.54-7.56 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.36-7.42 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.57 (s, 1H, CH-Ph), 5.20-5.25 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.00-5.08 (m, 1H, H-2 GlcA), 5.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 1.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 12.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.98-4.11 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6b GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.78-3.84 (m, 1H, H-2 GalN), 3.73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.56-3.61 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.52 (bs, 1H, H-5 GalN), 3.37 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.04, 2.02, 2.00 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.78-1.91 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**3-Azidopropyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **81****

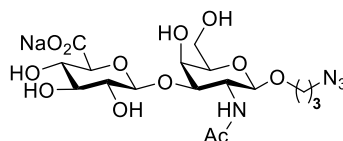


Chemical Formula: C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>  
Molecular Weight: 674,54

A solution of trifluoroacetic acid (1.15 mL, 15.0 mmol, 10.0 eq.) and water (0.385 mL) (3/1) was added to a solution of disaccharide **80** (1.15 g, 1.50 mmol, 1.00 eq.) in DCM (25 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred from 0°C to rt for 2h then fresh water was added and the precipitate is filtrated to obtain the desired product **132** as a white solid (0.920g, 91%). The filtrate was evaporated and the desired product **81** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5) as a white solid (86 mg, 9%).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1/1)  $\delta$  (ppm) :** 8.85 (d,  $^3J_{\text{NH-2}} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 5.25 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.13 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 4.99 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.76 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.58 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.15 (d,  $^3J_{5-4} = 10.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.10-4.07 (m, 1H, H-4 GalN), 3.87-4.02 (m, 4H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-6a GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.85-3.73 (m, 4H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-6b GalN), 3.51-3.61 (m, 2H, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>b), 3.35 (t,  $^3J_{2-3} = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.04, 2.02, 2.01 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.87-1.75 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**3-Azidopropyl *O*-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyranoside **65****



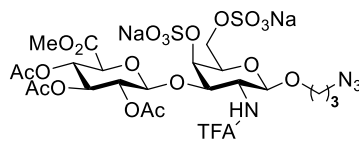
Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>12</sub>  
Molecular Weight: 502,41

A cold solution of LiOH 1M (1.5 mL, 1.49 mmol, 5.0 eq.) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (0.75 mL) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **81** (200 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.) in THF/H<sub>2</sub>O 3/1 (9.9 mL, 0.03 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/H<sub>2</sub>O 3/1 (9.9 mL, 0.03 M). NaOH 4M was added (3.3 mL, 13.37 mmol, 45.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

Et<sub>3</sub>N (0.54 mL, 3.86 mmol, 13.0 eq.) and Ac<sub>2</sub>O (0.56 mL, 5.94 mmol, 20.0 eq.) were added to a solution of previous crude disaccharide in MeOH/H<sub>2</sub>O 4/1 (14.9 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered, evaporated and co-evaporated twice with water under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02M was added to the mixture until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 % H<sub>2</sub>O) then eluted from a column of DOWEX 50WX4-Na<sup>+</sup> to give the deprotected disaccharide **65** as a sodium salt (94 mg, 63 % over 3 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm)** : 4.42-4.45 (m, 2H, H-1 GalN, H-1 GlcA), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 3.91-3.96 (m, 2H, H-2 GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.62-3.78 (m, 3H, H-3 GalN, H-6 GalN), 3.60-3.65 (m, 3H, H-5 GlcA, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>b), 3.40-3.46 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 3.26-3.34 (m, 3H, H-2 GlcA, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.97 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.71-1.85 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)- sodium-2-deoxy-4,6-di-O-sulfonato-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **82****

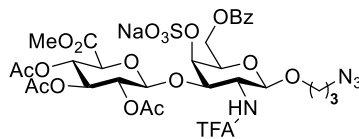


Chemical Formula:  
 $C_{24}H_{31}F_3N_4Na_2O_{21}S_2$   
 Molecular Weight: 878,61

Sulfur trioxide trimethylamine complex (891 mg, 6.41 mmol, 15.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **81** (288 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (4.7 mL, 0.09 M). The reaction mixture was stirred for 24h at 70 °C. The reaction was cooled down to room temperature, then quenched by addition of methanol (3.0 mL) and stirred 30 min. The crude mixture was purified by Sephadex LH-20 (DCM/MeOH 1/1) then by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5). Finally, the residue was purified by Sephadex SP C25[Na<sup>+</sup>] (DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O 9/5/1) to give the desired disaccharide **82** as a sodium salt as a white solid (269 mg, 66 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) :** 5.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.11 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.00 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.30 (dd, 1H, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 4.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 4.17-4.11 (m, 2H, H-6b GalN, H-5 GlcA), 4.03-3.96 (m, 1H, H-2 GalN), 3.92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 3.87-3.81 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>a, H-5 GalN), 3.66 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.52-3.46 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.91, 1.87, 1.86 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.76- 1.63 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium-6-O-benzoyl-2-deoxy-4-O-sulfonato-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **83****



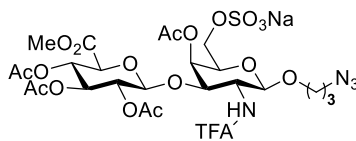
Chemical Formula:  
 $C_{31}H_{36}F_3N_4NaO_{19}S$   
 Molecular Weight: 880,68

Benzoyl cyanide (102 mg, 0.78 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **81** (175 mg, 0.26 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (3.7 mL, 0.07 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The reaction was quenched by adding methanol (2.0 mL), stirred 30 min then the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed twice with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The resulting solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure to give the crude benzoylated compound which was used without any further purification.

Sulfur trioxide trimethylamine complex (340 mg, 2.45 mmol, 10.0 eq.) was added to a solution of previous disaccharide (191 mg, 0.25 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (1.6 mL, 0.09 M). The reaction mixture was stirred for 24h at 70 °C. The reaction was cooled down to room temperature, then quenched by addition of methanol (2.0 mL) and stirred 30 min. The crude mixture was purified by Sephadex LH-20 (DCM/MeOH 1/1) then by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5). Finally, the residue was purified by Sephadex SP C25[ $Na^+$ ] (DCM/MeOH/ $H_2O$  9/5/1) to give the desired disaccharide **83** as a sodium salt as a white solid (181 mg, 84 % over 2 steps).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm)** : 9.24 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 8.01-7.94 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.67-7.64 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.55-7.52 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 5.24 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.00 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 4.90 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.80 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.59-4.51 (m, 2H, H-4 GalN, H-6a GalN), 4.47-4.40 (m, 2H, H-1 GalN, H-6b GalN), 4.34 (d,  $^3J_{5-4} = 10.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.97-3.90 (m, 2H, H-2 GalN, H-3 GalN), 3.86-3.82 (m, 1H, H-5 GalN), 3.75-3.69 (m, 1H, O- $CH_2a$ ), 3.65 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 3.51-3.45 (m, 1H, O- $CH_2b$ ), 3.36-3.28 (m, 2H,  $CH_2-N_3$ ), 1.98, 1.93, 1.88 (s, 9H,  $OC(O)CH_3$ ), 1.73-1.65 (m, 2H,  $-CH_2-$ ).

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium-4-O-acetyl-2-deoxy-6-O-sulfonato-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **84****



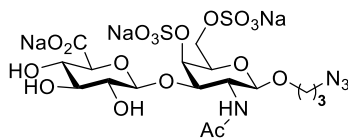
Chemical Formula:  
 $C_{26}H_{34}F_3N_4NaO_{19}S$   
 Molecular Weight: 818,61

Sulfur trioxide trimethylamine complex (107 mg, 0.77 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **81** (259 mg, 0.38 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (2.6 mL, 0.15 M). The reaction mixture was stirred for 4h30 at 40 °C. Then the reaction was cooled down to room temperature, quenched by addition of methanol (3.0 mL) and stirred for 30min. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The crude was dissolved in pyridine (7.1 mL) then  $Ac_2O$  (3.5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. Then, the solvent was evaporated and co-evaporated with water, toluene and DCM. The crude mixture was purified by silica gel column chromatography (DCM then DCM/MeOH 95/5 then 75/25). Finally, the residue was purified by Sephadex SP C25[Na<sup>+</sup>] (DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O 9/5/1) to give the desired disaccharide **84** as a sodium salt as a white solid (225 mg, 72 % over 2 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) :** 5.48 (d,  $^3J_{4-3} = 2.0$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.30-5.20 (m, 1H, H-3 GlcA), 5.08 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 4.88-4.84 (m, 2H, H-1 GlcA, H-2 GlcA), 4.56 (d,  $^3J_{1-2} = 6.5$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.25 (d,  $^3J_{5-4} = 10.5$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.14-4.08 (m, 3H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-6a GalN), 4.03-3.93 (m, 3H, H-5 GalN, H-6b GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.76 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.63-3.57 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.37 (t,  $^3J_{H-H} = 6.0$  Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.14, 2.01, 1.98 (s, 12H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.84-1.79 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).



**3-Azidopropyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium-2-acetamido-2-deoxy-4,6-di-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside **52****



Chemical Formula:  $C_{17}H_{25}N_4Na_3O_{18}S_2$

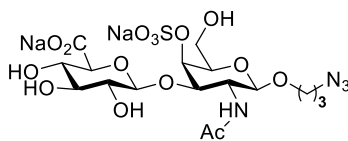
Molecular Weight: 706.49

A cold solution of LiOH 1M (0.35 mL, 0.35 mmol, 5.0 eq.) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (0.18 mL) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **82** (62 mg, 71 μmol, 1.0 eq.) in THF/H<sub>2</sub>O 3/1 (3.5 mL, 0.02 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/H<sub>2</sub>O 3/1 (3.5 mL, 0.02 M). NaOH 4M was added (0.80 mL, 3.18 mmol, 45.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

Et<sub>3</sub>N (0.13 mL, 0.92 mmol, 13.0 eq.) and Ac<sub>2</sub>O (0.13 mL, 1.41 mmol, 20.0 eq.) were added to a solution of previous crude disaccharide in MeOH/H<sub>2</sub>O 4/1 (6.2 mL, 10 mg/mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered, evaporated and co-evaporated twice with water under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02M was added to the mixture until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 % H<sub>2</sub>O) then eluted from a column of DOWEX 50WX4-Na<sup>+</sup> to give the deprotected disaccharide **52** as a sodium salt (48 mg, 96 % over 3 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm)** : 4.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 2.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6a GalN), (m, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 4.06-3.99 (m, 3H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-5 GalN), 3.96-3.91 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.69-3.64 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.48 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA), 3.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 3.35-3.30 (m, 3H, H-2 GlcA, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.99 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.84-1.77 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**3-Azidopropyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium-2-acetamido-2-deoxy-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside 66**



Chemical Formula:  $C_{17}H_{26}N_4Na_2O_{15}S$

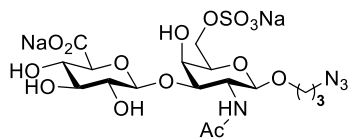
Molecular Weight: 604,45

A cold solution of LiOH 1M (1.1 mL, 1.11 mmol, 5.0 eq.) and  $H_2O_2$  30 % (0.55 mL) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **83** (195 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (11.1 mL, 0.02 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  4/1 (11.1 mL, 0.02 M). NaOH 4M was added (3.3 mL, 13.26 mmol, 60.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

$Et_3N$  (0.40 mL, 2.87 mmol, 13.0 eq.) and  $Ac_2O$  (0.42 mL, 4.42 mmol, 20.0 eq.) were added to a solution of previous crude disaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (11.1 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered, evaporated and co-evaporated twice with water under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02M was added to the mixture until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4- $Na^+$  to give the deprotected disaccharide **66** as a sodium salt (130 mg, 90 % over 3 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm)** : 4.74 (d,  $^3J_{4-3} = 2.0$  Hz, 1H, H-4 GalN), 4.48 (d,  $^3J_{1-2} = 8.5$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.43 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.04-3.97 (m, 2H, H-2 GalN, H-3 GalN), 3.96-3.90 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.78-3.70 (m, 3H, H-5 GalN, H-6 GalN), 3.66-3.60 (m, 2H, H-5 GlcA, O-CH<sub>2</sub>b), 3.48 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 3.41 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 3.35-3.28 (m, 3H, H-2 GlcA, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.98 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.83-1.75 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**3-Azidopropyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-sodium-2-acetamido-2-deoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranoside **67****



Chemical Formula:  $C_{17}H_{26}N_4Na_2O_{15}S$

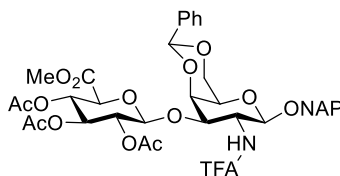
Molecular Weight: 604,45

A cold solution of LiOH 1M (0.75 mL, 0.75 mmol, 5.0 eq.) and  $H_2O_2$  30 % (0.38 mL) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **84** (122 mg, 0.15 mmol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (7.5 mL, 0.02 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  4/1 (7.5 mL, 0.02 M). NaOH 4M was added (2.3 mL, 9.00 mmol, 60.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

$Et_3N$  (0.27 mL, 1.95 mmol, 13.0 eq.) and  $Ac_2O$  (0.28 mL, 3.00 mmol, 20.0 eq.) were added to a solution of previous crude disaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (7.5 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered, evaporated and co-evaporated twice with water under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02M was added to the mixture until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4- $Na^+$  to give the deprotected disaccharide **67** as a sodium salt (87 mg, 96 % over 3 steps).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm) :** 4.47 (d,  $^3J_{1-2}$  = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.45 (d,  $^3J_{1-2}$  = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.18-4.14 (m, 3H, H-4 GalN, H-6 GalN), 3.99-3.86 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>a, H-2 GalN, H-5 GalN), 3.80 (dd,  $^3J_{3-4}$  = 3.0 Hz,  $^3J_{3-2}$  = 10.5 Hz, 1H, H-3 GalN), 3.67-3.61 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>b, H-5 GlcA), 3.46-3.39 (2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 3.32 (t,  $^3J_{H-H}$  = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.31-3.25 (m, 1H, H-2 GlcA), 1.97 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.82-1.76 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**2-Naphthylmethyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **68****

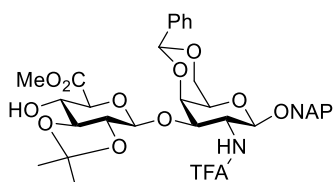


Chemical Formula: C<sub>39</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>15</sub>  
Molecular Weight: 819,74

2-Naphthylmethanol (1.2 g, 7.32 mmol, 1.1 eq.) was added to a solution of imidate **64** (5.5 g, 6.65 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (33 mL, 0.2 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 40 min at room temperature. Then TMSOTf 1M in toluene (1.0 mL, 1.00 mmol, 0.15 eq.) was added and the reaction mixture was stirred from -60 °C to -20 °C for 2h. Et<sub>3</sub>N (0.42 mL, 2.99 mmol, 0.45 eq.) was added and the reaction was stirred for 10min at room temperature. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (5/5 PE/EA + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired disaccharide **68** as a white solid (4.08 g, 75 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO 2/1) δ (ppm)** : 8.29 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 7.84-7.74 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.57-7.30 (m, 8H, H<sub>ar</sub>), 5.61 (s, 1H, CH-Ph), 5.25-5.10 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.06-4.95 (m, 1H, H-2 GlcA), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.89 (ABq, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5Hz, 1H, H-1 GalN), 4.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 3.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6a GalN), 4.21-4.31 (m, 2H, H-2 GalN, H-3 GalN), 4.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, H-5 GlcA), 4.13 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 1.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6b GalN), 3.67 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.57 (s, 1H, H-5 GalN), 1.97, 1.95, 1.94 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**2-Naphthylmethyl O-(methyl 2,3-O-isopropylidene-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **87****



Chemical Formula:  $C_{36}H_{38}F_3NO_{12}$   
Molecular Weight: 733,68

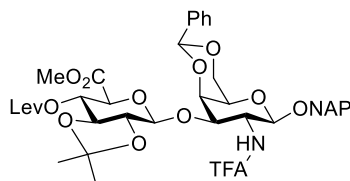
Acetylated compound **68** (1.45 g, 1.77 mmol, 1.0 eq.) was stirred 2h with dry potassium carbonate (123 mg, 0.89 mmol, 0.5 eq.) in anhydrous methanol (89 mL, 0.02 M) under

argon at room temperature. The reaction mixture was neutralized with Amberlite IR-120  $[H^+]$  until pH = 6, filtered, concentrated and dried over vacuum to give the crude deacetylated compound which was used without any further purification.

CSA (115 mg, 10 %  $m_{brut}$ ) was added to a solution of the previous crude (1.15 g, 1.65 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (7.0 mL, 0.24 M). 2-methoxypropene (660  $\mu$ L, 6.08 mmol, 3.6 eq.) was added in 6 portions, every 20min at room temperature.  $Et_3N$  (0.61 mL, 4.39 mmol, 2.6 eq.) was added 20min after the last addition. The crude mixture was concentrated under reduced pressure, then ethyl acetate was added. The organic layer was washed once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and 5 times with brine. The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **87** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 94/6 + 1 %  $Et_3N$ ) as a white solid (958 mg, 73 % over 2 steps).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3/MeOD$  1/1)  $\delta$  (ppm) :** 7.82-7.77 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.60-7.35 (m, 7H,  $H_{ar}$ ), 5.60 (s, 1H, CH-Ph), 5.94 (ABq, 2H,  $CH_2-Ar$ ), 4.82-4.76 (m, 2H, H-1 GalN, H-1 GlcA), 4.38-4.32 (m, 2H, H-4 GalN, H-6a GalN), 4.25-4.14 (m, 3H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-6b GalN), 3.97 (t,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H4 GlcA), 3.81 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.78 ( $CO_2CH_3$ ), 3.57 (bs, 1H, H-5 GalN), 3.47 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 3.38 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 1.38, 1.37 (s, 6H,  $C(CH_3)_2$ ).

**2-Naphthylmethyl *O*-(methyl 2,3-*O*-isopropylidene-4-*O*-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **88****

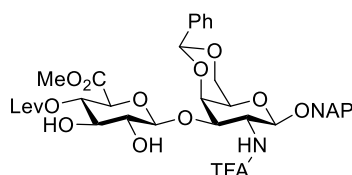


Chemical Formula: C<sub>41</sub>H<sub>44</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>14</sub>  
Molecular Weight: 831,78

DMAP (20 mg, 0.16 mmol, 0.3 eq.), DCC (136 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) and levulinic acid (76 mg, 0.66 mmol, 1.2 eq.) were added to a solution of disaccharide **87** (402 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5 mL, 0.12 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4h then filtered. The filtrate was washed once with water, once with a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **88** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 94/6 + 0.8 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (367 mg, 81 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) :** 7.80-7.74 (4H, H<sub>ar</sub>), 7.47-7.35 (7H, H<sub>ar</sub>), 6.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.6 (s, 1H, CH-Ph), 5.29-5.22 (m, 2H, H-4 GlcA, H-1 GalN), 4.93 (ABq, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.59 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.41-4.36 (m, 2H, H-4 GalN, H-6a GalN), 4.10 (d, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 12.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 3.90-3.83 (m, 2H, H-2 GalN, H-5 GlcA), 3.67 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.55-3.50 (m, 2H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-5 GalN), 2.82-2.55 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.16 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.40, 1.35 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**2-Naphthylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **89****

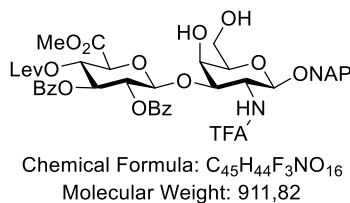


Chemical Formula:  $C_{38}H_{40}F_3NO_{14}$   
Molecular Weight: 791,73

Disaccharide **88** (343 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq.) was stirred at room temperature for 20h in a solution of DCM/AcOH/H<sub>2</sub>O 5/4/1 (7.0 mL, 0.05 g/mL) then concentrated at 40 °C. The solution was co-evaporated under reduced pressure 4 times with water, once with ethanol and once with toluene. The desired product **89** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5 up to 92/8) as a white solid (251 mg, 77 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) :** 7.87-7.85 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.81-7.77 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.71 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.50-7.44 (m, 6H, H<sub>ar</sub>), 7.39-7.29 (m, 8H, H<sub>ar</sub>), 6.78 (d,  $^3J_{NH-2}$  = 6.5 Hz, 1H, NH), 5.63 (dd,  $^3J_{3-2}$  =  $^3J_{3-4}$  = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.49-5.41 (m, 3H, H-2 GlcA, H-4 GlcA, CH-Ph), 5.24 (d,  $^3J_{1-2}$  = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 5.13 (d,  $^3J_{1-2}$  = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.90 (ABq, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.62 (dd,  $^3J_{3-4}$  = 3.0 Hz,  $^3J_{3-2}$  = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.39-4.35 (m, 2H, H-4 GalN, H-6a GalN), 4.17 (d,  $^3J_{5-4}$  = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.08-4.05 (m, 1H, H-6b GalN), 3.88-3.82 (m, 1H, H-2 GalN), 3.73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.50 (bs, 1H, H-5 GalN), 2.65-2.32 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.03 (CH<sub>3</sub> (Lev)).

**2-Naphthylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **69****



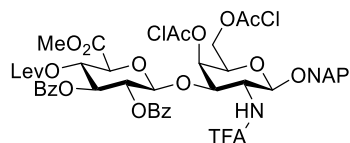
Benzoyl chloride (170 μL, 1.43 mmol, 4.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **89** (283 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) in pyridine/DCM 1/2 (3.0 mL, 0.12 M). The reaction was stirred at 0 °C for 1h then MeOH (0.16 mL, 5 %<sub>vtotal</sub>) was added and the reaction was stirred at room temperature for 20min. DCM was added into the reaction mixture and the organic layer was washed once with H<sub>2</sub>O, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> saturated and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

A solution of trifluoroacetic acid (280 μL, 3.62 mmol, 10.0 eq.) and water (90 μL) (3/1) was added to a solution of the previous disaccharide (362 mg, 0.36 mmol, 1.0 eq.) in DCM (6.0 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 4h then evaporated and co-evaporated twice with toluene under reduced pressure. The desired product **69** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5) as a white solid (187 mg, 74 % over 2 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 2/1) δ (ppm) :** 7.87-7.67 (m, 8H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.25 (m, 9H, H<sub>ar</sub>), 5.72 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.44-5.36 (m, 2H, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 5.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.88 (ABq, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.5 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.17 (bs, 1H, H-4 GalN), 4.11 (m, 1H, H-3 GalN), 4.04-3.98 (m, 1H, H-2 GalN), 3.92-3.75 (m, 5H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-6 GalN), 3.58-3.54 (m, 1H, H-5 GalN), 2.69-2.36 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)).



**2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside 90**



Chemical Formula: C<sub>49</sub>H<sub>46</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 1064,79

(ClAc)<sub>2</sub>O (882 mg, 5.16 mmol, 6.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **69** (784 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) in dry pyridine (8.6 mL, 0.1 M) under argon and the reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 2h30. DCM and water were added and the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **90** was obtained as a white solid (914 mg, 57 %) after purification by silica gel column chromatography (DCM/acetone 95/5).

R<sub>f</sub>: 0.33 (PE/EA 5/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.88-7.77 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 7.70-7.68 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.47 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.38-7.32 (m, 5H, H<sub>ar</sub>), 6.61 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.64 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.88 (ABq, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.64 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.34-4.28 (m, 2H, H-6 GalN), 4.23-4.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.97 (m, 1H, H-5 GalN), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.70-3.68 (m, 1H, H-2 GalN), 2.64-2.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 205.8 (C=O (Lev)), 171.1, 167.0, 166.72, 166.67, 165.5, 165.0 (C=O, C-6 GlcA), 157.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 36 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.6, 133.52, 133.49, 133.2, 133.1, 129.8, 129.7, 128.6, 128.54, 128.49, 128.4, 127.9, 127.7, 127.3, 126.4, 126.3, 125.7 (C<sub>Ar</sub>), 115.4 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 290 Hz, CF<sub>3</sub>), 100.4 (C-1 GlcA), 97.5 (C-1 GalN), 75.6 (C-3 GalN), 72.6 (C-5 GlcA), 72.0 (C-3 GlcA), 71.3 (C-2 GlcA), 71.2 (CH<sub>2</sub>-Ar), 70.9 (C-5 GalN), 70.5 (C-4 GalN), 69.3 (C-4 GlcA), 63.4 (C-6 GalN), 54.6 (C-2 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.65, 40.60 (CH<sub>2</sub>Cl), 37.6 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.5 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 27.7 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

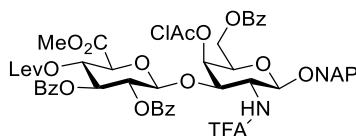
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.92 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>49</sub>H<sub>47</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>18</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 1064.2116, measured: 1064.2124

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +25.8333 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)

**IR (neat) ν̃ (cm<sup>-1</sup>):** 1731 (C=O), 1557 (C=C), 1150 (CF<sub>3</sub>), 1068 (C-O)

**2-Naphthylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside 91**



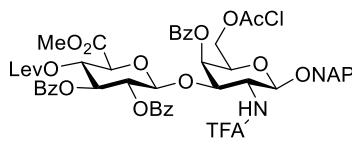
Chemical Formula:  $C_{54}H_{49}ClF_3NO_{18}$   
Molecular Weight: 1092,41

Benzoyl cyanide (72 mg, 0.55 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **69** (168 mg, 0.18 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (2.6 mL, 0.07 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The reaction was quenched by adding methanol (0.13 mL, 5 % Vtotal), stirred 30 min then the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed twice with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The resulting solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure to give the crude benzoylated compound which was used without any further purification.

$(ClAc)_2O$  (114 mg, 0.67 mmol, 3.0 eq.) was added at 0 °C to a solution of previous compound (225 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (2.2 mL, 0.1 M) under argon. The reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 6h. Cold water was added, then the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered, evaporated and co-evaporated 3 times with toluene under reduced pressure. The desired product **91** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/acetone 95/5) as a white solid (96 mg, 40 % over 2 steps).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 8.14-8.11 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.88-7.26 (m, 20H,  $H_{ar}$ ), 6.40 (d,  $^3J_{NH-2} = 6.0$  Hz, 1H, NH), 5.69-5.61 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GalN), 5.45 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.37 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.95 (d,  $^3J_{1-2} = 8.5$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.84 (ABq, 2H,  $CH_2-Ar$ ), 4.85 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.73-4.69 (m, 1H, H-3 GalN), 4.58-4.53 (m, 1H, H-6a GalN), 4.42- 4.37 (m, 1H, H-6b GalN), 4.28-4.15 (m, 3H,  $CH_2Cl$ , H-5 GlcA), 4.08 (bs, 1H, H-5 GalN), 3.72-3.67 (m, 4H,  $CO_2CH_3$ , H-2 GalN), 2.64-2.35 (m, 4H,  $CH_2$  (Lev)), 2.04 (s, 3H,  $CH_3$  (Lev)).

**2-Naphthylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4-O-benzoyl-6-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **92****



Chemical Formula: C<sub>54</sub>H<sub>49</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>

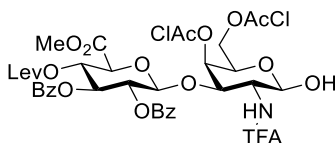
Molecular Weight: 1092,41

(ClAc)<sub>2</sub>O (117 mg, 0.68 mmol, 2.0 eq.) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **69** (312 mg, 0.34 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (5 mL, 0.07 M) under argon. The reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 1h30. Cold water was added, then the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, evaporated and co-evaporated 3 times with toluene under reduced pressure. The desired product was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/acetone 95/5 up to 9/1) as a white solid (142 mg, 51 %).

Benzoyl chloride (33 μL, 0.29 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of previous disaccharide (141 mg, 0.14 mmol, 1.0 eq.) in pyridine/DCM 1/2 (1.2 mL, 0.12 M). The reaction was stirred at 0 °C for 3h30. Then, MeOH (61 μL, 5 % V<sub>total</sub>) was added and the mixture was stirred at room temperature for 20min. DCM was added and the organic layer was washed once with H<sub>2</sub>O, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **92** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/acetone 95/5) as a white solid (107 mg, 68 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) :** 7.99-7.24 (m, 22H, H<sub>ar</sub>), 6.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.31 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.97-4.92 (m, 2H, H-1 GalN, H-1 GlcA), 4.88 (ABq, 2H, CH<sub>2</sub>-Ar), 4.67 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 5.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 4.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 4.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.05 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.03-3.99 (m, 1H, H-5 GalN), 3.97-3.90 (m, 1H, H-2 GalN), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.58-2.30 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 1.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)).

***O*-(methyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4-*O*-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranose **93****



Chemical Formula: C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>

Molecular Weight: 924,61

DDQ (132 mg, 0.58 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **90** (201 mg, 0.19 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM/MeOH 9/1 (2.0 mL, 0.1 M) under argon. The reaction was stand protected from light and stirred at room temperature for 24 h. After addition of DCM, the organic layer was washed 3 times with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **93** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 98/2 then 9/1) as a beige solid (104 mg, 59 %).

R<sub>f</sub>: 0.39 (DCM/Acetone 98/2)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.88-7.82 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.50 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.59-5.56 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.45-5.33 (m, 3H, H-1 GalN, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 5.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.51-4.35 (m, 3H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-5 GalN), 4.31-4.14 (m, 5H, H-5 GlcA, H-6 GalN, CH<sub>2</sub>Cl), 4.12-4.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.79 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.68-2.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(Lev)), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)).

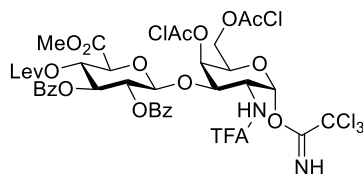
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 206.1 (C=O (Lev)), 171.2, 167.2, 167.0, 166.8, 165.6, 165.4 (C=O, C-6 GlcA), 157.1 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.6, 133.4, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 128.7, 128.5 (Cq<sub>ar</sub>), 128.5, 128.3 (CH<sub>ar</sub>), 115.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 99.54 (C-1 GlcA), 91.4 (C-1 GalN), 72.7 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA), 71.5 (C-3 GalN), 70.9 (C-2 GlcA), 70.6 (C-4 GlcA), 69.4 (C-4 GalN), 66.6 (C-5 GlcA), 63.5 (C-6 GalN), 53.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.7 (C-2 GalN), 40.7 (CH<sub>2</sub>Cl), 37.6 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.5 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 27.6 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.75 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>38</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 946.1310, measured: 946.1312

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +50.1000 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.00)

**O-(Methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-1-O-trichloroacetimidoyl-α-D-galactopyranose **94****



Chemical Formula:  $C_{40}H_{38}Cl_5F_3N_2O_{18}$   
Molecular Weight: 1068,99

Trichloroacetonitrile (110  $\mu$ L, 1.13 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1 M in anhydrous DCM (28  $\mu$ L, 0.03 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the disaccharide **93** (104 mg, 0.11 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (1.1 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 6 h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **94** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5 + 0.5 %  $Et_3N$ ) as a white solid (60 mg, 50 %).

R<sub>f</sub>: 0.40 (DCM/Acetone 95/5 + 0.5 %  $Et_3N$ )

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.80 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 7.87 (t,  $^3J_{H-H} = 7.0$  Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.55-7.47 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.36 (t,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.90 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 6.55 (d,  $^3J_{1-2} = 3.5$  Hz, 1H, H-1 GalN), 5.71 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.67-5.64 (m, 1H, H-4 GalN), 5.44 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 5.37 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.09 (d,  $^3J_{1-2} = 8.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.63 (ddd, (d,  $^3J_{2-1} = 3.5$  Hz,  $^3J_{2-NH} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 11.0$  Hz, 1H, H-2 GalN), 4.46-4.38 (m, 2H, H-3, H-5 GalN), 4.34-4.24 (m, 2H, H-6a GalN, H-5 GlcA), 4.17 (dd,  $^3J_{6b-5} = 7.0$  Hz,  $^3J_{6b-6a} = 11.5$  Hz, 1H, H-6b GalN), 4.13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.08-4.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.78 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.69-2.34 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)).

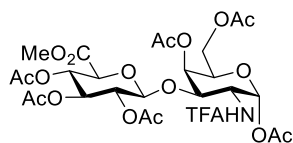
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 205.57 (C=O (Lev)), 171.17, 166.89, 166.79, 166.64, 166.58, 165.64, 165.45, 160.19 (C=NH, C=O, C-6 GlcA), 157.5 (q,  $^2J_{C-F} = 38$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.67, 133.60, 129.84, 129.82, 129.76, 128.48, 128.46, 128.40 (C<sub>Ar</sub>), 115.4 (q,  $^1J_{C-F} = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 98.54 (C-1 GlcA), 93.97 (C-1 GalN), 90.47 (C-Cl<sub>3</sub>), 72.84 (C-5 GlcA), 71.93 (C-3 GlcA), 71.13 (C-3 or C-5 GalN), 70.95 (C-2 GlcA), 69.20 (C4-GlcA, C-3 or C-5 GalN), 68.97 (C-4 GalN), 62.89 (C-6 GalN), 53.27 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.39 (C-2 GalN), 40.47, 40.44 (CH<sub>2</sub>Cl), 37.55 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.51 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 27.62 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.77 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{40}H_{38}Cl_5F_3N_2NaO_{18}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 1089.0407, measured: 1089.0393

Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,4,6-tri-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **98****



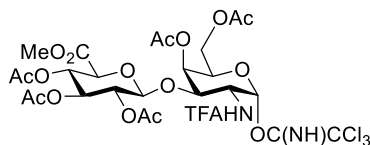
Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 717,55

A solution of trifluoroacetic acid (2.5 mL, 33.30 mmol, 10.0 eq.) and water (0.85 mL) (3/1) was added to a solution of the disaccharide **63** (2.4 g, 3.33 mmol, 1.0 eq.) in DCM (60 mL, 0.06 M). The mixture reaction was stirred for 5h at room temperature then evaporated and co-evaporated once with water, once with toluene and once with DCM under reduced pressure to give the crude product which was used without any further purification.

Ac<sub>2</sub>O (1.7 mL, 17.70 mmol, 4.0 eq.) was added to a solution of the previously crude disaccharide in pyridine (22.1 mL, 0.2 M) under argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 16h then evaporated and co-evaporated with toluene and DCM under reduced pressure. The desired product **98** was obtained after purification by gel column chromatography (PE/EA 3/7) as a yellowish solid (1.4 g, 59 % over 2 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) :** 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.32 (s, 1H, H-4 GalN), 5.11-5.25 (m, 3H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.50-4.55 (m, 1H, H-2 GalN), 4.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.28 (t, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.08-4.15 (m, 2H, H-5 GlcA, H-6a GalN), 4.02 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6b GalN), 3.75 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.20, 2.12, 2.10, 2.07, 2.04, 2.02 (s, 18H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-1-*O*-trichloroacetimidoyl- $\alpha$ -D-galactopyranose **99****



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>

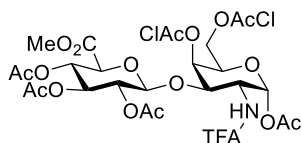
Molecular Weight: 819,90

Hydrazine acetate (804 mg, 8.73 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of the disaccharide **98** (4.17 g, 5.82 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (32 mL, 0.15 g/mL) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 3h. Cold water was added to the mixture and it was stirred for 15 min. Then, the reaction was extracted 3 times with EA. The combined organic layers were washed 5 times with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (5.8 mL, 58.20 mmol, 10.0 eq.) and DBU (0.22 mL, 1.46 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the previous crude disaccharide in anhydrous DCM (28 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 4h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **99** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 55/45 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a yellowish solid (2.66 g, 56 % over 2 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) :** 8.79 (s, 1H, NHC(O)CCl<sub>3</sub>), 7.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.57 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 2.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.08-5.14 (m, 2H, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 4.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.63 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.33-4.40 (m, 2H, H-3 GalN, H-5 GalN), 4.17 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 4.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.01 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.15, 2.10, 2.05, 2.03 (s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1-*O*-acetyl-4,6-di-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **100****



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 786,44

(ClAc)<sub>2</sub>O (1.00 g, 5.86 mmol, 6.0 eq.) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **96** (619 mg, 0.98 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (14 mL, 0.07 M) under argon and the reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 2h. Cold water was added, then the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, evaporated and co-evaporated 3 times with toluene under reduced pressure. The desired product **100** was obtained as a white solid (423 mg, 55 %) after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5).

R<sub>f</sub>: 0.15 (DCM/Acetone 95/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.31 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.38 (bs, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.20 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.12 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.06 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.48 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 10.5 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 7.0 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.23-4.15 (m, 2H, H-6 GalN), 4.16-4.11 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Cl, H-5 GlcA), 4.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.16, 2.06, 2.00, 1.98 (s, 12H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

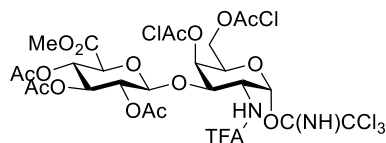
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 170.5, 169.6, 169.4, 168.8, 167.1, 166.9, 166.4 (C=O, C-6 GlcA), 157.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 115.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 97.8 (C-1 GlcA), 90.3 (C-1 GalN), 72.2 (C-5 GlcA), 71.6 (C-3 GlcA), 69.9 (C-4 GalN), 68.79, 68.73, 68.69, 68.61 (C-2 GlcA, C-4 GlcA, C-3 GalN, C-5 GalN), 62.0 (C-6 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.7 (C-2 GalN), 40.49, 40.47 (CH<sub>2</sub>Cl), 20.7, 20.6, 20.4, 20.3 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.72 (CF<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 808.084074, measured: 808.084183



***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-1-*O*-trichloroacetimidoyl- $\alpha$ -D-galactopyranose **101****



Chemical Formula: C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>  
Molecular Weight: 888,78

Hydrazine acetate (75 mg, 0.81 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of the disaccharide **100** (423 mg, 0.54 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (2.8 mL, 0.15 g/mL) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 2 h. Cold water was added to the mixture and it was stirred for 15 min. Then, the reaction was extracted 3 times with EA. The combined organic layers were washed 5 times with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (430  $\mu$ L, 4.32 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1M in anhydrous DCM (110  $\mu$ L, 0.11 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the crude disaccharide (321 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (2.5 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 4 h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **101** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 96/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (166 mg, 42 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.41 (DCM/Acetone 96/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

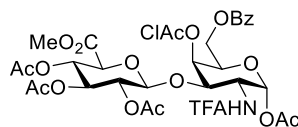
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 8.81 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 7.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.54 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 4.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.13-5.03 (m, 2H, H-2, H-4 GlcA), 4.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.65-4.56 (m, 1H, H-2 GalN), 4.43-4.36 (m, 2H, H-3, H-5 GalN), 4.31-4.24 (m, 1H, H-6a GalN), 4.21-4.14 (m, 3H, H-6b GalN, CH<sub>2</sub>Cl), 4.13-4.07 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Cl, H-5 GlcA), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.09, 2.02 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 170.5, 169.7, 169.3, 166.8, 166.5, 166.4 (C=O, C-6 GlcA), 160.3 (C=NH), 157.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 115.5 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 98.1 (C-1 GlcA), 94.2 (C-1 GalN), 90.5 (CCl<sub>3</sub>), 72.6 (C-5 GlcA), 71.8 (C-3 GlcA), 69.7 (C-4 GalN), 69.3, 69.1 (C-3, C-5 GalN), 69.0, 68.9 (C-2, C-4 GlcA), 62.2 (C-6 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.1 (C-2 GalN), 40.5, 40.4 (CH<sub>2</sub>Cl), 20.8, 20.5, 20. (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.70 (CF<sub>3</sub>)

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$*

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1-*O*-acetyl-6-*O*-benzoyl-4-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **102****



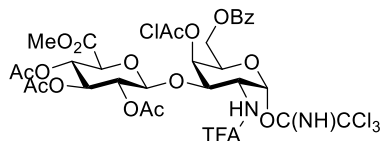
Chemical Formula:  
 $C_{32}H_{35}ClF_3NO_{18}$   
 Molecular Weight: 814,06

Benzoyl cyanide (338 mg, 2.58 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **96** (544 mg, 0.86 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (12 mL, 0.07 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 8h. The reaction was quenched by adding methanol (0.6 mL, 5 % Vtotal), stirred 30min then the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed twice with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The resulting solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 9/1) as a white solid (465 mg, 73 %).

$(ClAc)_2O$  (324 mg, 1.89 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of the previous compound in dry pyridine (9.0 mL, 0.07 M) under argon atmosphere and the reaction was stirred at 0 °C for 3h. DCM and water were added then the aqueous phase was extracted 3 times with DCM and the combined organic layers were washed once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$ . The resulting organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **102** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 9/1) as a white solid (290 mg, 56 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) :** 8.10-8.08 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.61-7.46 (m, 3H,  $H_{ar}$ ), 7.11 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 6.43 (bs, 1H, H-1 GalN), 5.58 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.28-5.16 (m, 3H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.90 (d,  $^3J_{1-2} = 8.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.60-4.43 (m, 4H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-5 GalN, H-6a GalN), 4.27-4.14 (m, 4H,  $CH_2Cl$ , H-6b GalN, H-5 GlcA), 3.74 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 2.24, 2.07, 2.05, 2.04 (s, 12H,  $OC(O)CH_3$ ).

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1-*O*-acetyl-6-*O*-benzoyl-4-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-1-*O*-trichloroacetimidoyl- $\alpha$ -D-galactopyranose **103****



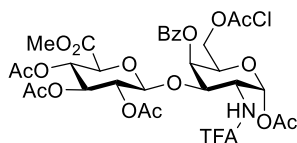
Chemical Formula: C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>4</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>  
Molecular Weight: 916,41

Hydrazine acetate (48 mg, 0.52 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of the disaccharide **102** (281 mg, 0.35 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (1.9 mL, 0.15 g/mL) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 2h. Water and ice were added to the mixture and it was stirred for 15 min. Then, the reaction was extracted 3 times with EA and the combined organic layers were washed 5 times with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (0.22 mL, 2.22 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1M in anhydrous DCM (100  $\mu$ L, 0.10 mmol, 0.45 eq.) were added to a solution of the previous disaccharide (171 mg, 0.22 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (1.3 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 6h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **103** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 6/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (120 mg, 38 % over 2 steps).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) :** 8.78 (s, 1H, NHC(O)CCl<sub>3</sub>), 8.04-8.02 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.55 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.46-7.42 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 2.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.62 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.14-5.09 (m, 2H, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 4.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.70-4.63 (m, 1H, H-2 GalN), 4.54-4.51 (m, 1H, H-5 GalN), 4.45-4.40 (m, 2H, H-3 GalN, H-6a GalN), 4.30 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 4.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.15-4.09 (m, 1H, H-5 GlcA), 3.70 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.04, 2.03 (2s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**O-(Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-1-O-acetyl-4-O-benzoyl-6-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranose 104**



Chemical Formula: C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>ClF<sub>3</sub>NO<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 814,07

(ClAc)<sub>2</sub>O (291 mg, 1.70 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **96** (539 mg, 0.85 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (12 mL, 0.07 M) under argon and the reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 1 h 30. Water and ice were added, then, the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, evaporated and co-evaporated with toluene under reduced pressure. The desired product was obtained as a white solid (287 mg, 48 %) after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5).

Benzoyl chloride (90 µL, 0.81 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of the previous disaccharide (287 mg, 0.41 mmol, 1.0 eq.) in pyridine/DCM 1/2 (3.5 mL, 0.12 M). The reaction was stirred at 0 °C for 2 h. MeOH (5 % of V<sub>total</sub>) was added, then the reaction was stirred for 20 min at room temperature. DCM was added and the resulting organic layer was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **104** was obtained as a white solid (222 mg, 67 %) after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5).

R<sub>f</sub>: 0.35 (DCM/Acetone 95/5)

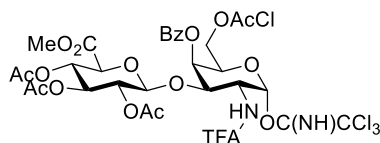
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, NH), 6.50 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.27-5.13 (m, 3H, H-2, H-3, H-4 GlcA), 4.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.66 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.55 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 7.0 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 7.0 Hz, 2H, H-6 GalN), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.12 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.74 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.24, 2.17, 2.04, 2.03 (s, 12H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.8, 169.7, 169.6, 168.9, 167.2, 167.0, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.7 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.8, 130.1, 129.0, 128.8 (C<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 97.3 (C-1 GlcA), 90.6 (C-1 GalN), 72.4 (C-5 GlcA), 72.0 (C-2, C-3, C-4 GlcA), 69.4 (C-5 GalN), 68.8 (C-2, C-3, C-4 GlcA), 68.6 (C-2, C-3, C-4 GlcA), 68.3 (C-4 GalN), 68.1 (C-3 GalN), 62.5 (C-6 GalN), 53.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.2 (C-2 GalN), 40.7 (CH<sub>2</sub>Cl), 21.0, 20.8, 20.54, 20.46 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.76 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** m/z: calculated for C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>ClF<sub>3</sub>NNaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 836.1387, measured: 836.1383

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-benzoyl-6-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-1-*O*-trichloroacetimidoyl- $\alpha$ -D-galactopyranose **105****



Chemical Formula: C<sub>32</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>4</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>17</sub>  
Molecular Weight: 916,41

Hydrazine acetate (37 mg, 0.40 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of the disaccharide **104** (218 mg, 0.27 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (1.5 mL, 0.15 g/mL) under argon. The reaction was stirred at room temperature for 2h. Water and ice were added to the mixture and it was stirred for 15 min. Then, the reaction was extracted 3 times with EA and the combined organic layers were washed 5 times with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (300  $\mu$ L, 3.00 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1 M in anhydrous DCM (80  $\mu$ L, 0.08 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the previous disaccharide (232 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (1.8 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 5h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **105** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 6/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (150 mg, 55 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.53 (PE/EA 6/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

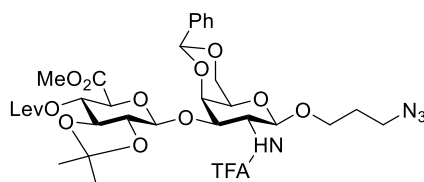
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 8.78 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 8.04 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.57 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.23 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.15-5.07 (m, 2H, H-2, H-4 GlcA), 4.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.66 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 7.0 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.46-4.39 (m, 2H, H-3 GalN, H-6a GalN), 4.30 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 4.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.70 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.04, 2.03 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 170.4, 169.8, 169.3, 166.5, 166.3, 165.9, 160.4 (C=NH, C=O, C-6 GlcA), 133.3, 130.0, 128.4 (C<sub>ar</sub>), 98.3 (C-1 GlcA), 98.2 (C-1 GalN), 94.4 (C-Cl<sub>3</sub>), 72.8 (C-5 GlcA), 71.9 (C-3 GlcA), 70.0 (C-4 GalN), 69.7, 69.6 (C-3, C-5 GalN), 69.00 (C-2, C-4 GlcA), 61.5 (C-6 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.3 (C-2 GalN), 40.6 (CH<sub>2</sub>Cl), 20.7, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.70 (CF<sub>3</sub>)

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$*

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3-O-isopropylidene-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyraoside 1U7**



Chemical Formula:  $C_{30}H_{36}F_3NO_{14}$   
Molecular Weight: 691,61

Acetylated compound **80** (1.20 g, 1.57 mmol, 1.0 eq.) was stirred 2 h with dry potassium carbonate (109 mg, 0.79 mmol, 0.5 eq.) in anhydrous methanol (79 mL, 0.02 M) under argon at room temperature. The reaction mixture was neutralized with Amberlite IR-120 [H<sup>+</sup>] until pH = 6, filtered, concentrated and dried over vacuum to give the crude deacetylated compound which was used without any further purification.

CSA (93 mg, 10 % m<sub>brut</sub>) was added to a solution of the previous crude (932 mg, 1.47 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (6.0 mL, 0.24 M). 2-methoxypropene (540 μL, 5.29 mmol, 3.6 eq.) was added in 6 portions, every 20 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (530 μL, 3.82 mmol, 2.6 eq.) was added 20 min after the last addition. The crude mixture was concentrated under reduced pressure, then ethyl acetate was added. The organic layer was washed once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and 5 times with brine. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 94/6 + 1 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (799 mg, 80 % over 2 steps).

DMAP (27 mg, 0.22 mmol, 0.3 eq.), DCC (228 mg, 1.10 mmol, 1.5 eq.) and levulinic acid (128 mg, 1.10 mmol, 1.5 eq.) were added to a solution of the previous disaccharide (240 mg, 0.74 mmol, 1.0 eq.) in DCM (6.1 mL, 0.12 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6 h then filtered. The filtrate was washed once with water, once with a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **107** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 94/6 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (491 mg, 86 %).

R<sub>f</sub>: 0.41 (DCM/Acetone 94/6 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

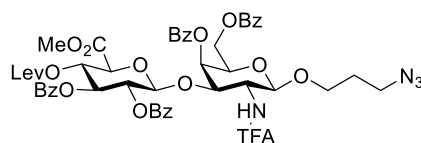
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.56-7.47 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.40-7.30 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, NH), 5.59 (s, 1H, CH-Ph), 5.27 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.57 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.41 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.18 (ABq, 2H, H-6 GalN), 4.03-3.95 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.78 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 3.69 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.65-3.50 (m, 4H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>b), 3.36 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.85-2.53 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.84 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 1.41 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.39 (s, 3H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.18 (C=O (Lev)), 171.70, 167.92 (C=O, C-6 GlcA), 158.0 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 137.78 (C<sub>q</sub><sub>ar</sub>), 129.13, 128.24, 126.44 (CH<sub>ar</sub>), 117.03, 114.17 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 112.71 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 102.49 (C-1 GlcA), 100.96 (CH-Ph), 98.76 (C-1 GalN), 77.34 (C-3 GlcA), 76.01 (C-4 GalN), 75.82 (C-2 GlcA or C-5 GalN), 75.06 (C-3 GalN), 74.60 (C-5 GlcA), 70.94 (C-4 GlcA), 69.18 (C-6 GalN), 66.80 (C-2 GlcA or C-5 GalN), 66.63 (O-CH<sub>2</sub>), 54.94 (C-2 GalN), 53.13 (CO<sub>2</sub>Me), 48.29 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 37.72 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.98 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 29.05 (-CH<sub>2</sub>-), 27.82 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 26.76, 26.36 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.95 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>14</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 797.246357, measured: 797.246100

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside 109**



Chemical Formula: C<sub>51</sub>H<sub>49</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 1062,96

A solution of trifluoroacetic acid (0.23 mL, 2.97 mmol, 10.0 eq.) and water 3/1 (0.08 mL) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **107** (216 mg, 0.30 mmol, 1.0 eq.) in DCM (5.0 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 2 h 30. Then, the solution was concentrated and co-evaporated four times with water, once with ethanol and once with toluene. The desired product was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5 and 9/1) as a white solid (179 mg, 94 %).

Benzoyl chloride (0.44 mL, 3.74 mmol, 9.0 eq.) was added to a solution of disaccharide (276 mg, 0.43 mmol, 1.0 eq.) in pyridine/DCM 1/2 (3.6 mL, 0.12 M). The reaction was stirred at 0 °C for 3h. Then, MeOH (0.20 mL, 5 % V<sub>total</sub>) was added and the mixture was stirred at room temperature for 20min. DCM was added and the organic layer was washed once with H<sub>2</sub>O, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **109** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (213 mg, 40 %).

R<sub>f</sub>: 0.39 (DCM/Acetone 95/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.08-7.97 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.85-7.78 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.60-7.53 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.40 (m, 6H, H<sub>ar</sub>), 7.37-7.28 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.63 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.27 (m, 2H, H-4, H-2 GlcA), 4.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.73 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.50-4.37 (m, 2H, H-6 GalN), 4.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.14 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 3.98-3.90 (m, 1H, O-CH<sub>2a</sub>), 3.90-3.81 (m, 1H, H-2 GalN), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.61-3.50 (m, 1H, O-CH<sub>2b</sub>), 3.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub></sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.66-2.32 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.89-1.72 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 205.7 (C=O (Lev)), 171.2, 166.9, 166.2, 165.6, 165.4, 165.1 (C=O, C-6 GlcA), 133.5, 133.5, 133.4, 133.3, 130.2, 130.0, 129.95, 129.91 (CH<sub>ar</sub>), 129.86, 129.6, 128.9, 128.8 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.53, 128.49, 128.43 (CH<sub>ar</sub>), 100.2 (C-1 GlcA), 99.5 (C-1 GalN), 74.0 (C-3 GalN), 72.9 (C-5 GlcA), 72.4 (C-3 GlcA), 72.0 (C-5 GalN), 71.4 (C-2 GlcA), 69.4, 69.3 (C-4 GlcA, C-4 GalN), 66.9 (O-CH<sub>2</sub>), 62.8 (C-6 GalN), 55.2 (C-2 GalN), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.2 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.7 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 29.1 (-CH<sub>2</sub>-), 27.8 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

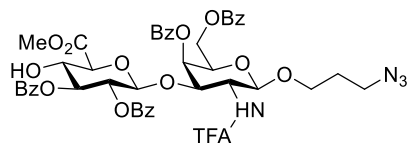
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** - 76.04 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>51</sub>H<sub>49</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1085.288616, measured: 1085.388745

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = + 113.9 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)



**3-Azidopropyl *O*-(methyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-benzoyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **111****



Chemical Formula:  $C_{46}H_{43}F_3N_4O_{16}$

Molecular Weight: 964,86

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 3.4 mL) was added to a solution of the disaccharide **109** (183 mg, 0.17 mmol) in pyridine (1.8 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **111** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (150 mg, 90 %).

R<sub>f</sub>: 0.56 (DCM/Acetone 95/5)

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.06–7.99 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.88–7.76 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.61–7.51 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.49–7.37 (m, 7H,  $H_{ar}$ ), 7.35–7.21 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 6.78 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.0$  Hz, 1H, NH), 5.87 (d,  $^3J_{4-3} = 3.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.48 (m, 1H, H-3 GlcA), 5.28 (dd,  $^3J_{2-3} = ^3J_{2-1} = 7.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.99 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.93 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.72 (dd,  $^3J_{3-2} = 11.0$ ,  $^3J_{3-4} = 3.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.49–4.38 (m, 2H, H-6 GalN), 4.18–4.03 (m, 3H, H-4 GlcA, H-5 GlcA, H-5 GalN), 3.96–3.82 (m, 2H, O-CH<sub>2a</sub>, H-2 GalN), 3.73 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.60–3.46 (m, 2H, O-CH<sub>2b</sub>, OH), 3.29 (t,  $^3J_{H-H} = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.89–1.67 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

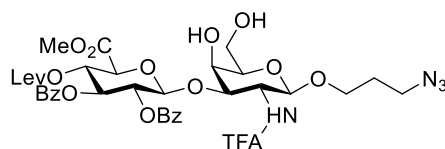
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 168.9, 166.5, 166.3, 165.6, 165.2, (C=O, C-6 GlcA), 157.7 (q,  $^2J_{C-F} = 37$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.47, 133.44, 133.35, 133.31, 130.1, 129.9, 129.85, 129.81 (CH<sub>ar</sub>), 129.79, 129.7, 129.0, 128.9 (C<sub>qar</sub>), 128.5, 128.43, 128.41 (CH<sub>ar</sub>), 115.4 (q,  $^1J_{C-F} = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 100.7 (C-1 GlcA), 99.4 (C-1 GalN), 74.9 (C-3 GlcA), 74.7 (C-5 GlcA), 74.5 (C-3 GalN), 72.0 (C-5 GalN), 71.5 (C-2 GlcA), 70.1 (C-4 GlcA), 69.6 (C-4 GalN), 66.8 (O-CH<sub>2</sub>), 63.0 (C-6 GalN), 55.1 (C-2 GalN), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.1 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -76.01 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{46}H_{43}F_3N_4NaO_{16}$  [ $M+Na$ ]<sup>+</sup>: 987.251837, measured: 987.252605

$[\alpha]_D^{20} = +67.10$  (CHCl<sub>3</sub>, c 0.94)

**3-Azidopropyl O-(methyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-  
(1→3)-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyraoside 112**



Chemical Formula: C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>16</sub>

Molecular Weight: 854,74

Disaccharide **107** (490 mg, 0.63 mmol, 1.0 eq.) was stirred at room temperature for 24h in a solution of DCM/AcOH/H<sub>2</sub>O 5/4/1 (9.8 mL, 0.05 g/mL). The reaction mixture was heated, stirred 3h and then concentrated at 40 °C. The solution was co-evaporated under reduced pressure 4 times with water, once with ethanol and once with toluene. The desired product was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5) as a white solid.

Benzoyl chloride (180 μL, 1.56 mmol, 4.0 eq.) was added at 0 °C to a solution of the previous compound (286 mg, 0.39 mmol, 1.0 eq.) in pyridine/DCM 1/2 (3.2 mL, 0.12 M). The reaction was stirred at 0 °C for 2h. MeOH (0.17 mL, 5% Vtotal) was added and the reaction was stirred at room temperature for 20 min. DCM was added and the resulting organic layer was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> saturated and once with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give the crude benzoylated compound which was used without any further purification.

A solution of trifluoroacetic acid (450 μL, 5.93 mmol, 15.0 eq.) and water 3/1 (150 μL) was added at 0 °C to a solution of previous disaccharide (372 mg, 0.40 mmol, 1.0 eq.) in DCM (6.6 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 5h. Then, DCM and water were added and the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> saturated and once with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **112** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 97/3) as a white solid (285 mg, 52 % over 3 steps).

R<sub>f</sub>: 0.41 (DCM/MeOH 97/3)

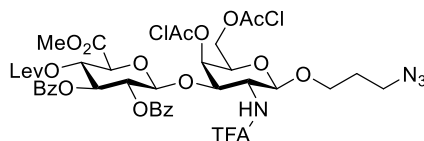
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3/1) δ (ppm):** 7.70-7.63 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.33 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.17 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.27-5.17 (m, 2H, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 4.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.00-3.94 (m, 2H, H-3 GalN, H-4 GalN), 3.76-3.68 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.69-3.56 (m, 6H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-2 GalN, H-6 GalN), 3.39-3.28 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>b, H-5 GalN), 3.15-3.08 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.55-2.16 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 1.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.64-1.50 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3/1) δ (ppm):** 206.6 (C=O (Lev)), 171.4, 167.7, 165.6, 165.4 (C=O, C-6 GlcA), 133.5, 133.4, 129.6, 129.5, 128.3, 128.1 (CH<sub>ar</sub>), 100.9 (C-1 GlcA), 99.8 (C-1 GalN), 78.6 (C-3 GalN or C-4 GalN), 74.4 (C-5 GalN), 72.1, 71.9 (C-3 GlcA, C-5 GlcA), 71.3, 69.4 (C-2 GlcA, C-4 GlcA), 67.7 (C-3 GalN or C-4 GalN), 65.9 (O-CH<sub>2</sub>), 61.1 (C-6 GalN), 52.9, 52.4 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, C-2 GalN), 47.7 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 37.3 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.1 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.7 (-CH<sub>2</sub>-), 27.4 (CH<sub>2</sub> (Lev)).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 3/1) δ (ppm):** -72.50 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** m/z: calculated for C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 877.236187, measured: 877.236411

**3-Azidopropyl O-(methyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyraoside **113****



Chemical Formula:  $C_{41}H_{43}Cl_2F_3N_4O_{18}$   
Molecular Weight: 1007,70

(ClAc)<sub>2</sub>O (473 mg, 2.77 mmol, 6.0 eq.) was added at 0 °C to a solution of disaccharide **112** (394 mg, 0.46 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (5 mL, 0.1 M) under argon. The reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 3h. Cold water was added, then the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, evaporated and co-evaporated 3 times with toluene under reduced pressure. The desired product **113** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (162 mg, 35 %).

R<sub>f</sub>: 0.35 (DCM/Acetone 95/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.85 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.46 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.39-7.29 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.64 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.44 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.35 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.32-4.16 (m, 5H, CH<sub>2</sub>Cl, H-5 GlcA, H-6 GalN), 4.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 3.98 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 3.93-3.85 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.65 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 3.57-3.47 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.67-2.32 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.86-1.69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

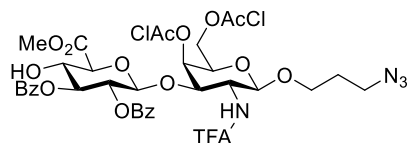
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 205.9 (C=O (Lev)), 171.2, 167.1, 166.9, 166.8, 165.6, 165.15, 165.13 (C=O, C-6 GlcA), 157.7 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.65, 133.61, 129.9, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 128.7, 128.6 (Cq<sub>ar</sub>), 128.52, 128.50 (CH<sub>ar</sub>), 115.3 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 100.4 (C-1 GlcA), 99.2 (C-1 GalN), 73.83 (C-3 GalN), 72.77 (C-5 GlcA), 72.13 (C-3 GlcA), 71.41 (C-2 GlcA), 70.90 (C-5 GalN), 70.45 (C-4 GalN), 69.43 (C-4 GlcA), 66.83 (O-CH<sub>2</sub>), 63.41 (C-6 GalN), 54.51 (C-2 GalN), 53.33 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.04 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 40.74, 40.70 (CH<sub>2</sub>Cl), 37.72 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.61 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.96 (-CH<sub>2</sub>-), 27.77 (CH<sub>2</sub> (Lev)).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -76.04 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>41</sub>H<sub>43</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1029.179371, measured: 1029.179363

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +100.25 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.92)

**3-Azidopropyl O-(methyl-2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyraoside **114****



Chemical Formula:  $C_{36}H_{37}Cl_2F_3N_4O_{16}$   
Molecular Weight: 909,60

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 2.5 mL) was added to a solution of the disaccharide **113** (132 mg, 0.13 mmol) in pyridine (1.3 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 3 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **114** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 5/5) as a white solid (67 mg, 56 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.88 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.54-7.43 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.38-7.30 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 6.64 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 5.56 (d,  $^3J_{4-OH} = ^3J_{4-3} = 3.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.51 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.31 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.90 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.85 (d,  $^3J_{1-2} = 8.5$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.63 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.5$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.33-4.20 (m, 2H, H-6 GalN), 4.20-4.15 (m, 3H,  $CH_2Cl$ , H-4 GlcA), 4.13-4.10 (m, 1H, H-5 GlcA), 4.08 (s, 2H,  $CH_2Cl$ ), 3.98 (dd,  $^3J_{5-6a} = ^3J_{5-6b} = 6.5$  Hz, 1H, H-5 GalN), 3.94-3.83 (m, 4H,  $CO_2CH_3$ , O- $CH_2a$ ), 3.61 (ddd,  $^3J_{2-NH} = ^3J_{2-1} = 8.0$  Hz,  $^3J_{2-3} = 11.0$  Hz, 1H, H-2 GalN), 3.55-3.51 (m, 1H, O- $CH_2b$ ), 3.49 (bs, 1H, OH), 3.29 (t,  $^3J_{H-H} = 6.5$  Hz, 2H,  $CH_2-N_3$ ), 1.86-1.69 (m, 2H,  $-CH_2-$ ).

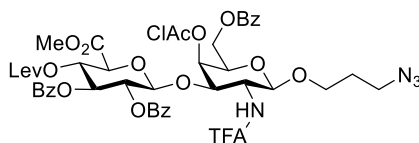
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 168.8, 167.1, 166.9, 166.6, 165.3 (C=O, C-6 GalN), 157.7 (q,  $^2J_{C-F} = 37$  Hz,  $NHC(O)CF_3$ ), 133.7, 133.6, 129.9, 129.8 ( $CH_{ar}$ ), 128.9, 128.7 ( $Cq_{ar}$ ), 128.5 ( $CH_{ar}$ ), 115.3 (q,  $^1J_{C-F} = 288$  Hz,  $CF_3$ ), 100.9 (C-1 GlcA), 99.0 (C-1 GalN), 74.8 (C-5 GlcA), 74.7 (C-3 GlcA), 73.9 (C-3 GalN), 71.4 (C-2 GlcA), 71.0 (C-5 GalN), 70.7 (C-4 GalN), 70.3 (C-4 GlcA), 66.8 (O- $CH_2$ ), 63.6 (C-6 GalN), 54.7 (C-2 GalN), 53.3 ( $CO_2CH_3$ ), 48.0 ( $CH_2-N_3$ ), 40.8, 40.7 ( $CH_2Cl$ ), 28.9 ( $-CH_2-$ ).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -76.06 ( $CF_3$ )

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{36}H_{37}Cl_2F_3N_4NaO_{16}$   $[M+Na]^+$ : 931.142592, measured: 931.142638

$[\alpha]_D^{20} = +23.7111$  ( $CHCl_3$ , c 1.00)

**3-Azidopropyl O-(methyl-2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyraoside 115**



Chemical Formula:  $C_{46}H_{46}ClF_3N_4O_{18}$   
Molecular Weight: 1035,33

Benzoyl cyanide (131 mg, 1.00 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **112** (285 mg, 0.33 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (5 mL, 0.07 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The reaction was quenched by adding methanol (0.25 mL, 5 % Vtotal), stirred 30min then the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed twice with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The resulting solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure to give the crude benzoylated compound which was used without any further purification.

$(ClAc)_2O$  (144 mg, 0.84 mmol, 3.0 eq.) was added at 0 °C to a solution of previous compound (267 mg, 0.28 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (3 mL, 0.1 M) under argon. The reaction was stirred from 0 °C to room temperature for 3h. Cold water was added, then the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered, evaporated and co-evaporated 3 times with toluene under reduced pressure. The desired product **115** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (127 mg, 37 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.30 (EA/EP 5/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ) δ (ppm):** 8.06 (d,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.90-7.83 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.58 (t,  $^3J_{H-H} = 7.0$  Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.54-7.43 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.39-7.31 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.50 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 5.68 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.64 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.45 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 5.37 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.93-4.87 (m, 2H, H-1 GlcA, H-1 GalN), 4.69 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.5$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.47 (dd,  $^3J_{6a-5} = 6.5$  Hz,  $^3J_{6a-6b} = 11.5$  Hz, 1H, H-6a GalN), 4.32 (dd,  $^3J_{6b-5} = 6.5$  Hz,  $^3J_{6b-6a} = 11.5$  Hz, 1H, H-6b GalN), 4.27-4.12 (m, 3H, CH<sub>2</sub>Cl, H-5 GlcA), 4.08 (t,  $^3J_{5-6a} = ^3J_{5-6b} = 6.5$  Hz, 1H, H-5 GalN), 3.93-3.85 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.66-3.49 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>b, H-2 GalN), 3.28 (t,  $^3J_{H-H} = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.66-2.30 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.89-1.68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

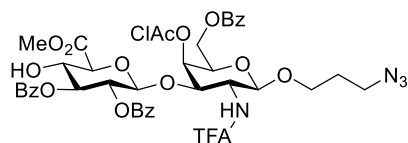
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ ) δ (ppm):** 205.7 (C=O (Lev)), 171.2, 166.8, 166.5, 166.2, 165.6, 165.1 (C=O, C-6 GlcA), 133.7, 133.6, 133.4, 130.0, 129.96, 129.89 (CH<sub>ar</sub>), 129.7, 128.8, 128.7 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 100.5, 99.0 (C-1 GlcA, C-1 GalN), 73.7 (C-3 GalN), 72.8 (C-5 GlcA), 72.2 (C-3 GlcA), 71.5, 71.3 (C-2 GlcA, C-5 GalN), 70.6 (C-4 GalN), 69.4 (C-4 GlcA), 66.9 (O-CH<sub>2</sub>), 62.1 (C-6 GalN), 55.1 (C-2 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.1 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>Cl), 37.8 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.7 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 27.8 (CH<sub>2</sub> (Lev)).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ ) δ (ppm):** -76.06 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for  $C_{46}H_{46}ClF_3N_4NaO_{18}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 1057.233994, measured: 1057.235003

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = + 37.26 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)

**3-Azidopropyl O-(methyl-2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside 116**



Chemical Formula:  $C_{41}H_{40}ClF_3N_4O_{16}$

Molecular Weight: 937,23

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 2.3 mL) was added to a solution of the disaccharide **115** (111 mg, 0.11 mmol) in pyridine (1.1 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 3 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **116** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (79 mg, 79 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.03 (d,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.88 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.57 (t,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.46 (q,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.37-7.27 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 6.80 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.5$  Hz, 1H, NH), 5.68 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.54 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.32 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.92 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.88 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.66 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.5$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.44 (dd,  $^3J_{6a-5} = 7.0$  Hz,  $^3J_{6a-6b} = 11.5$  Hz, 1H, H-6a GalN), 4.34 (dd,  $^3J_{6b-5} = 6.0$  Hz,  $^3J_{6b-6a} = 11.5$  Hz, 1H, H-6b GalN), 4.21 (m, 2H,  $CH_2Cl$ ), 4.19-4.14 (m, 1H, H-4 GlcA), 4.13-4.04 (m, 2H, H-5 GlcA, H-5 GalN), 3.92-3.83 (m, 1H, O- $CH_2a$ ), 3.71 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 3.64 (ddd,  $^3J_{2-NH} = ^3J_{2-1} = 8.0$  Hz,  $^3J_{2-3} = 11.0$  Hz, 1H), 3.56-3.47 (m, 1H, O- $CH_2b$ ), 3.26 (t,  $^3J_{H-H} = 6.5$  Hz, 2H,  $CH_2-N_3$ ), 1.85-1.66 (m, 2H,  $-CH_2-$ ).

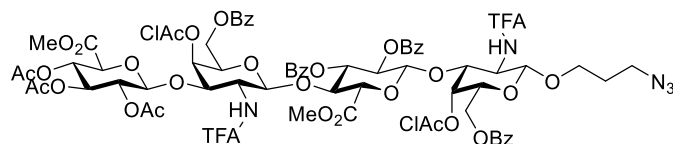
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 168.8, 166.7, 166.5, 166.2, 165.3 (C=O, C-6 GlcA), 157.7 (q,  $^2J_{C-F} = 37$  Hz,  $NHC(O)CF_3$ ), 133.60, 133.56, 133.47, 129.93, 129.85, 129.79 ( $CH_{ar}$ ), 129.6, 128.9, 128.7 ( $Cq_{ar}$ ), 128.6, 128.51, 128.49 ( $CH_{ar}$ ), 115.9 (q,  $^1J_{C-F} = 289$  Hz,  $CF_3$ ), 100.9 (C-1 GlcA), 99.1 (C-1 GalN), 74.7 (C-5 GlcA or C-5 GalN), 74.6 (C-3 GlcA), 74.0 (C-3 GalN), 71.5 (C-2 GlcA), 71.2 (C-5 GlcA or C-5 GalN), 70.9 (C-4 GalN), 70.2 (C-4 GlcA), 66.8 (O- $CH_2$ ), 62.3 (C-6 GalN), 54.8 (C-2 GalN), 53.0 ( $CO_2CH_3$ ), 48.0 ( $CH_2-N_3$ ), 40.8 ( $CH_2Cl$ ), 28.9 ( $-CH_2-$ ).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -76.01 ( $CF_3$ )

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{41}H_{40}ClF_3N_4NaO_{16}$   $[M+Na]^+$ : 959.197214, measured: 959.196530

$[\alpha]_D^{20} = +26.0778$  ( $CHCl_3$ ,  $c$  1.00)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-6-O-benzoyl-4-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **118****



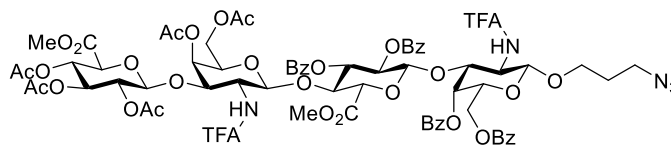
Chemical Formula:  $C_{71}H_{71}Cl_2F_6N_5O_{32}$   
Molecular Weight: 1691,24

A mix of acceptor **116** (66 mg, 71  $\mu$ mol, 1.0 eq.), donor **103** (97 mg, 106  $\mu$ mol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (700  $\mu$ L, 0.1 M) under argon was stirred for 30min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (27  $\mu$ L, 27  $\mu$ mol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 30min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (11  $\mu$ L, 81  $\mu$ mol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (toluene/acetone 7/3 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired tetrasaccharide **118** as a white solid (< 10 %).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for  $C_{71}H_{71}Cl_2F_6N_5NaO_{32}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 1712.325561, measured: 1712.330244

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$  and  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR*

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-benzoyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **121****



Chemical Formula:  $C_{71}H_{73}F_6N_5O_{32}$   
Molecular Weight: 1622,36

A mix of acceptor **112** (91 mg, 94  $\mu$ mol, 1.0 eq.), donor **99** (115 mg, 140  $\mu$ mol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (940  $\mu$ L, 0.1 M) under argon was stirred for 30min at room temperature. Then, TMSOTf 1 M in toluene (35  $\mu$ L, 35  $\mu$ mol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 1h at room temperature. Et<sub>3</sub>N (15  $\mu$ L, 110  $\mu$ mol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 94/6 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired tetrasaccharide **121** as a white solid (29 mg, 19 %).

R<sub>f</sub>: 0.45 (DCM/Acetone 94/6)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.07-7.99 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.85-7.79 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.64-7.53 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.50-7.39 (m, 6H, H<sub>ar</sub>), 7.37-7.27 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.57 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN2), 5.63-5.48 (m, 2H, H-3 GlcA1, H-3 GlcA2), 5.34-5.09 (m, 4H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2, H-4 GalN1), 5.01-4.82 (m, 3H, H-1 GlcA2, H-1 GalN2, H-4 GlcA2), 4.79-4.69 (m, 2H, H-1 GalN1, H-3 GalN2), 4.62-4.56 (m, 2H, H-1 GlcA1, H-5 GlcA2), 4.48-4.39 (m, 2H, H-6 GalN2), 4.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.19 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN1), 4.15-4.08 (m, 2H, H-5 GlcA1, H-5 GalN2), 3.97-3.88 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.79-3.60 (m, 8H, H-2 GalN1, H-2 GalN2, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.60-3.53 (m, 2H, H-5 GalN1, O-CH<sub>2</sub>b), 3.38-3.27 (m, 3H, H-6a GalN1, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.08 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6b GalN1), 2.08-1.92 (m, 12H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.86-1.71 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>-, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.33, 170.26, 170.1, 169.7, 169.6, 169.5, 169.4, 168.5, 168.4, 166.9, 166.3, 165.6, 165.4, 165.1 (C=O, C-6 GlcA), 133.6, 133.5, 133.4, 130.2, 129.9, 129.8, 129.71 (CH<sub>ar</sub>), 129.67, 129.57, 128.7 (Cq<sub>ar</sub>), 128.63, 128.59, 128.51, 128.3 (CH<sub>ar</sub>), 101.1 (C-1 GlcA2), 99.8 (C-1 GlcA1), 99.1, 99.0 (C-1 GalN1, C-1 GalN2), 75.6 (C-4 GlcA1), 74.9 (C-3 GalN2), 74.2 (C-3 GalN1), 73.9 (C-5 GlcA1 or C-5 GalN2), 72.5 (C-3 GlcA1), 72.2, 72.0 (C-2 GlcA1 or C-4 GalN1, C-5 GlcA1 or C-5 GalN2), 71.5, 71.3 (C-2 GlcA2, C-5 GalN1), 70.9 (C-4 GlcA2), 69.7 (C-4 GalN2), 69.2 (C-2 GlcA1 or C-4 GalN1, C-3 GlcA2), 68.3 (C-5 GlcA2), 66.9 (O-CH<sub>2</sub>), 63.0 (C-6 GalN2), 61.0 (C-6 GalN1), 55.4, 53.8 (C-2 GalN1, C-2 GalN2), 53.0, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.2 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 20.81, 20.78, 20.66, 20.64, 20.57 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.82, -76.09 (CF<sub>3</sub>)

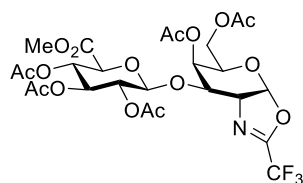
**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>71</sub>H<sub>73</sub>F<sub>6</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>32</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1644.403505, measured: 1644.404697

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 17.07 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.97)



Side product from this reaction:

**Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosylronate-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetyl-amino-D-galactopyranose [2, 1,-d] 2-oxazoline 122**



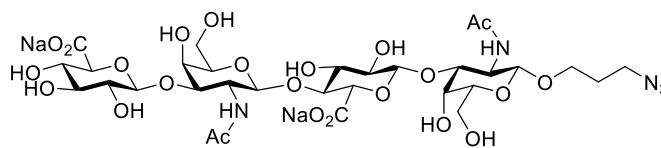
Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>16</sub>  
Molecular Weight: 657,50

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 6.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.32-5.18 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.04-4.92 (m, 2H, H-1 GlcA, H-2 GlcA), 4.22-4.02 (m, 5H, H-2 GalN, H-5 GlcA, H-5 GalN, H-6 GalN), 3.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-3 GalN), 3.75 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.10, 2.08, 2.07, 2.02 (s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 170.6, 170.1, 169.5, 169.4, 169.2, 167.1 (C=O, C=N), 155.9 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 41 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 116.1 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 275 Hz, CF<sub>3</sub>), 105.6 (C-1 GalN), 99.3 (C-1 GlcA), 76.3 (C-3 GalN), 72.6 (C-5 GlcA), 71.8 (C-3 GlcA), 71.3, 71.1 (C-2 GlcA, C-5 GalN), 69.3 (C-4 GlcA), 65.5 (C-4 GalN), 64.7 (C-2 GalN), 62.1 (C-6 GalN), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.8, 20.7, 20.65, 20.58, 20.52 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 680.140889, measured: 680.140844

**3-Azidopropyl O-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(sodium-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyranoside **123****



Chemical Formula:  $C_{31}H_{47}N_5Na_2O_{23}$

Molecular Weight: 903,71

A cold solution of LiOH 1M (310  $\mu$ L, 310  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and  $H_2O_2$  30 % (160  $\mu$ L) was added at 0 °C to a solution of tetrasaccharide **121** (50 mg, 31  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (1.0 mL, 0.03 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  3/1 (1.0 mL, 0.03 M). NaOH 4M was added (1.0 mL, 4.17 mmol, 135.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

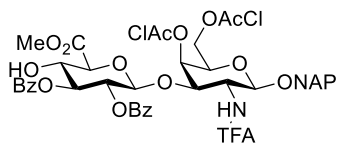
$Et_3N$  (60  $\mu$ L, 402  $\mu$ mol, 13.0 eq.) and  $Ac_2O$  (60  $\mu$ L, 618  $\mu$ mol, 20.0 eq.) were added to a solution of the previous crude tetrasaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (1.5 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02 M was added until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4- $Na^+$  to give the deprotected tetrasaccharide **123** as a sodium salt (10 mg, 36 % over 3 steps).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 4.59-4.46 (m, 4H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2, H-1 GalN1, H-1 GalN2), 4.25-4.10 (m, 2H, H-4 GalN1, H-4 GalN2), 4.07-3.96 (m, 3H, H-2 GalN1, H-2 GalN2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.90-3.65 (m, 13H, H-4 GlcA1, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, H-5 GalN1, H-5 GalN2, H-6 GalN1, H-6 GalN2), 3.63-3.46 (m, 5H, H-3 GlcA1, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.44-3.30 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 2.05 (s, 6H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.92-1.81 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{31}H_{47}N_5NaO_{23}$  [M- $Na$ ]<sup>-</sup>: 880.256501, measured: 880.255697

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$  and  $^{13}C$  NMR*

**2-Naphtylmethyl *O*-(methyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **124****



Chemical Formula:  $C_{44}H_{40}Cl_2F_3NO_{16}$   
Molecular Weight: 966,69

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 3.9 mL) was added to a solution of the disaccharide **90** (216 mg, 0.20 mmol) in pyridine (2.1 mL, 0.1 g/mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 3min and then, diluted with DCM. The mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **124** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 5/5) as a white solid (125 mg, 64 %).

$R_f$ : 0.48 (PE/EA 5/5)

**RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.97-7.86 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.88-7.73 (m, 3H,  $H_{ar}$ ), 7.70 (s, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.57-7.41 (m, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.36 (m, 5H,  $H_{ar}$ ), 6.35 (d,  $^3J_{NH-2} = 7.0$  Hz, 1H, NH), 5.59 (d,  $^3J_{4-3} = 3.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.49 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.33 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 10.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 5.03-4.97 (m, 2H, H-1 GalN,  $CH_2$ -Ar), 4.81 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.77-4.66 (m, 2H, H-3 GalN,  $CH_2$ -Ar), 4.39-4.25 (m, 2H, H-6 GalN), 4.22 (m, 2H,  $CH_2Cl$ ), 4.20-4.14 (m, 1H, H-4 GlcA), 4.12 (s, 2H,  $CH_2Cl$ ), 4.05 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.00 (dd,  $^3J_{5-6a} = ^3J_{5-6b} = 6.0$  Hz, 1H, H-5 GalN), 3.89 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 3.60 (dt,  $^3J_{2-3} = 11.0$ ,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-NH} = 7.5$  Hz, 1H, H-2 GalN), 3.29 (d,  $^3J_{OH-4} = 3.5$  Hz, 1H, OH).

**RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 168.6, 166.9, 166.7, 166.4, 165.1 (C=O, C-6 GlcA), 133.54, 133.48 ( $CH_{Ar}$ ), 133.2, 133.1 ( $Cq_{Ar}$ ), 129.9, 129.7 ( $CH_{Ar}$ ), 128.8 ( $Cq_{Ar}$ ), 128.53, 128.45, 128.4, 127.9, 127.7, 127.4, 126.4, 126.3, 125.7 ( $CH_{Ar}$ ), 100.9 (C-1 GlcA), 97.1 (C-1 GalN), 74.5 (C-3 GlcA, C-5 GlcA), 73.4 (C-3 GalN), 71.4 ( $CH_2$ -Ar), 71.2 (C-2 GlcA), 70.9 (C-5 GalN), 70.8 (C-4 GalN), 70.2 (C-4 GlcA), 63.5 (C-6 GalN), 55.1 (C-2 GalN), 53.1 ( $CO_2CH_3$ ), 40.6, 40.5 ( $CH_2Cl$ ).

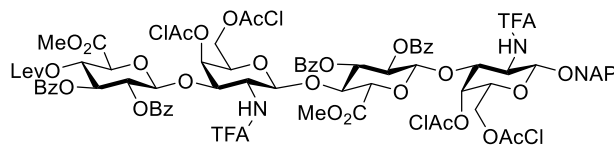
**RMN  $^{19}F$  (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.97 ( $CF_3$ )

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{44}H_{40}Cl_2F_3NNaO_{16}$  [ $M+Na$ ] $^+$ : 988.1568, measured: 988.1567

$[\alpha]_D^{20} = +27.6555$  ( $CHCl_3$ ,  $c$  1.00)

**IR (neat)  $\tilde{\nu}$  ( $cm^{-1}$ ):** 3313 (O-H, N-H), 2956 ( $C_{sp^3}$ -H), 1731 (C=O), 1563 (C=C), 1150 ( $CF_3$ ), 1086 (C-O)

**2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-(methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-chloroacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside 125**



Chemical Formula:  $C_{82}H_{76}Cl_4F_6N_2O_{33}$   
Molecular Weight: 1873,28

A mix of acceptor **124** (54 mg, 56  $\mu$ mol, 1.0 eq.), donor **94** (90 mg, 84  $\mu$ mol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (600  $\mu$ L, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1 M in toluene (21  $\mu$ L, 21  $\mu$ mol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 45 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (10  $\mu$ L, 63  $\mu$ mol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired tetrasaccharide **125** as a white solid (50 mg, 47 %).

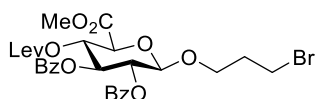
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.92-7.28 (m, 27H, Har), 6.63-6.55 (m, 2H, NH), 5.64 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA2), 5.59-5.52 (m, 2H, H-4 GalN1, H-4 GalN2), 5.52-5.39 (m, 2H, H-3 GlcA1, H-4 GlcA2), 5.39-5.26 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 4.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 12.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>a-Ar), 4.94-4.82 (m, 4H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2, H-1 GalN1, H-1 GalN2), 4.74-4.67 (m, 2H, H-3 GalN2, CH<sub>2</sub>b-Ar), 4.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN1), 4.36-4.03 (m, 10H, H-4 GlcA1, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, H-5 GalN1, H-6 GalN2, CH<sub>2</sub>Cl), 3.99-3.93 (m, 1H, H-5 GalN2), 3.88-3.82 (m, 5H, H-6a GalN1, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.78-3.63 (m, 1H, H-2 GalN1), 3.59-3.47 (m, 2H, H-2 GalN2, H-6b GalN1), 2.64-2.30 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(Lev)), 2.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 205.9 (C=O (Lev)), 171.2, 168.7, 167.1, 166.9, 166.8, 166.5, 165.6, 165.3, 165.1 (C=O, C-6 GlcA), 157.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.7 (Cq<sub>ar</sub>), 133.65, 133.60 (CH<sub>ar</sub>), 133.3, 133.2 (Cq<sub>ar</sub>), 129.97, 129.95, 129.83, 129.79 (CH<sub>ar</sub>), 128.9, 128.7 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5, 128.0, 127.8, 127.3, 126.5, 126.4, 125.8 (CH<sub>ar</sub>), 115.2 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 289 Hz, CF<sub>3</sub>), 100.9, 100.6 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 98.5, 97.6 (C-1 GalN1, C-1 GalN2), 74.68, 74.65 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA1), 73.8 (C-3 GalN1, C-3 GalN2), 72.8 (C-5 GlcA2), 72.2 (C-3 GlcA2), 71.5, 71.3 (C-2 GlcA1, C-2 GlcA2, CH<sub>2</sub>-Ar), 71.0 (C-5 GalN2), 70.9, 70.8 (C-4 GalN1, C-4 GalN2), 70.6, 70.3 (C-4 GlcA1, C-5 GalN1), 69.5 (C-4 GlcA2), 65.9 (C-6 GalN1), 63.7 (C-6 GalN2), 55.1, 54.7 (C-2 GalN1, C-2 GalN2), 53.3, 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.8, 40.75, 40.69 (CH<sub>2</sub>Cl), 37.7 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.6 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 27.8 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.90, -76.14 (CF<sub>3</sub>).

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +29.1111 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)

### Methyl (3-bromopropyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4-*O*-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate **137**



Chemical Formula: C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>BrO<sub>11</sub>

Molecular Weight: 635,46

3-bromo-1-propanol (0.88 mL, 6.98 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of imidate **127** (3.06 g, 4.65 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (23 mL, 0.2 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 30 min at room temperature. Then TMSOTf 1 M in toluene (0.93 mL, 0.93 mmol, 0.2 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 1h at room temperature. Et<sub>3</sub>N (0.39 mL, 2.79 mmol, 0.6 eq.) was added and the reaction was stirred for 15min. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 98/2) to give the desired product **137** as a white solid (2.57 g, 87 %).

R<sub>f</sub>: 0.56 (DCM/Acetone 95/5)

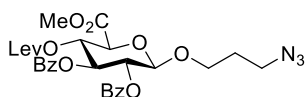
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.98-7.89 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.55-7.48 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.42-7.34 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.70 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.50-5.40 (m, 2H, H-2, H-4), 4.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1), 4.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5), 4.10-4.03 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74-3.66 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.39-3.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.66-2.34 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.18-1.92 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 205.6 (C=O (Lev)), 171.2, 167.2, 165.6, 165.0 (C=O, C-6), 133.4, 133.4, 129.9, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.1, 128.8 (Cq<sub>ar</sub>), 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 101.4 (C-1), 72.8 (C-5), 72.2 (C-3), 71.5 (C-2 or C-4), 69.7 (C-2 or C-4), 67.8 (O-CH<sub>2</sub>), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 32.3 (-CH<sub>2</sub>-), 29.9 (CH<sub>2</sub>-Br), 29.6 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 27.7 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>BrO<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 635.112250, measured: 635.112195

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = + 60.98 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.02)

### Methyl (3-azidopropyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4-*O*-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate **138**



Chemical Formula:  $C_{29}H_{31}N_3O_{11}$

Molecular Weight: 597,58

Sodium azide (3.54 g, 54.50 mmol, 10.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **137** (3.46 g, 5.45 mmol, 1.0 eq.) in acetone/ $H_2O$  2/1 (91 mL, 0.06 M). The reaction was heated at 70 °C for 3h30. Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature and cold water was added. The resulting precipitate was filtered to give the desired product **138** as a white paste (2.77 g, 85 %).

R<sub>f</sub>: 0.56 (DCM/Acetone 95/5)

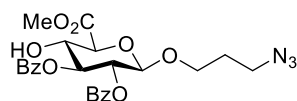
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.00-7.86 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.45 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.43-7.31 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.71 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 5.53-5.40 (m, 2H, H-2, H-4), 4.79 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1), 4.24 (d,  $^3J_{5-4} = 9.6$  Hz, 1H, H-5), 4.10-3.97 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.66-3.57 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.32-3.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.71-2.33 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(Lev)), 2.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)), 1.92-1.67 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 205.7 (C=O (Lev)), 171.3, 167.3, 165.7, 165.11, 165.07 (C=O, C-6), 133.54, 133.49, 130.0, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.2, 128.9 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 101.3 (C-1), 72.9 (C-5), 72.3 (C-3), 71.6 (C-2 or C-4), 69.8 (C-4 or C-2), 67.0 (O-CH<sub>2</sub>), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 37.8 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.7 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 27.8 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{29}H_{31}N_3NaO_{11}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 620.185080, measured: 620.185259

**$[\alpha]_D^{20}$**  = + 61.09 ( $CHCl_3$ ,  $c$  1.01)

### Methyl (3-azidopropyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosid)uronate **128**



Chemical Formula: C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>

Molecular Weight: 499,48

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 68.3 mL) was added to a solution of monosaccharide **138** (1.94 g, 3.25 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (19 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The solution was washed with water, saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **128** was obtained after purification by silica gel column chromatography (95/5 DCM/Acetone) as a white paste (1.50 g, 92 %).

R<sub>f</sub>: 0.42 (DCM/Acetone 95/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.03-7.89 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.56-7.46 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.42-7.32 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.56 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.43 (m, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2), 4.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-1), 4.21 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>4-OH</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 4.05-3.97 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.86 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.58 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.41 (d, <sup>3</sup>J<sub>OH-4</sub> = 3.5 Hz, 1H, OH), 3.32-3.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 1.88-1.68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

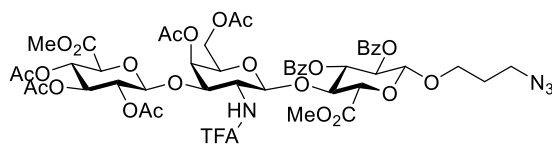
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 169.2, 166.7, 165.3 (C=O, C-6), 133.5, 133.5, 130.0, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.2, 129.1 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 101.6 (C-1), 75.1 (C-3), 74.8 (C-5), 71.4 (C-2), 70.7 (C-4), 67.0 (O-CH<sub>2</sub>), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 522.148300, measured: 522.148004

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 51.81 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.99)

Dinkelaar, J.; Codée, J. D. C.; Van Den Bos, L. J.; Overkleeft, H. S.; Van Der Marel, G. A. Synthesis of Hyaluronic Acid Oligomers Using Ph<sub>2</sub>SO/Tf<sub>2</sub>O-Mediated Glycosylations. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5737–5742. <https://doi.org/10.1021/jo070704s>.

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 139**



Chemical Formula:  $C_{49}H_{55}F_3N_4O_{25}$   
Molecular Weight: 1156,98

**Procedure A:**

A mix of acceptor **128** (63 mg, 126  $\mu$ mol, 1.0 eq.), donor **99** (155 mg, 189  $\mu$ mol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (1.3 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (47  $\mu$ L, 47  $\mu$ mol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 1 h 30 at room temperature. Et<sub>3</sub>N (20  $\mu$ L, 141  $\mu$ mol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (toluene/EA 5/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired trisaccharide **X** as a white solid (27 mg, 18 %).

**Procedure B:**

3-azido-1-propanol (11  $\mu$ L, 115  $\mu$ mol, 1.5 eq.) was added to a solution of imidate **152** (93 mg, 77  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (600  $\mu$ L, 0.2 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 30 min at room temperature. Then TMSOTf 1 M in toluene (19  $\mu$ L, 19  $\mu$ mol, 0.25 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 30 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (8  $\mu$ L, 57  $\mu$ mol, 0.75 eq.) was added and the reaction was stirred for 15 min. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired product **139** as a white solid (52 mg, 59 %).

**Procedure C:**

Sodium azide (26.4 mg, 407  $\mu$ mol, 5.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **148** (97 mg, 81  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in DMF (1.4 mL, 0.06 M). The reaction was stirred at room temperature for 5 h. Then, the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (toluene/EA 5/5) to give the desired product **139** as a white solid (75 mg, 79 %).

R<sub>f</sub>: 0.21 (toluene/EA 5/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.98-7.91 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.55-7.47 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.37 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.16-5.11 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.31 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.25 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.01-3.91 (m, 2H, H-5 GlcA2, H-6a GalN), 3.84 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.57



(m, 3H, H-2 GalN, H-5 GalN, H-6b GalN), 3.45-3.38 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.31-3.15 (m, 3H, O-CH<sub>2</sub>b, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.04, 1.98, 1.97, 1.82 (5s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.81-1.71 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

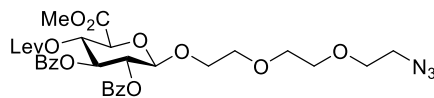
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.4, 170.1, 169.6, 169.5, 169.4, 168.7, 166.9, 165.5, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.53, 133.47, 129.9, 129.83 (CH<sub>ar</sub>), 129.76, 129.2 (C<sub>qar</sub>), 128.6, 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 99.8 (C-1 GlcA2), 98.8 (C-1 GalN), 75.8 (C-4 GlcA1), 74.1 (C-3 GalN, C-5 GlcA1), 72.5 (C-5 GlcA2), 72.3 (C-3 GlcA1), 72.2 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.5, 71.3 (C-2 GlcA1, C-5 GalN), 70.7 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 67.8 (C-4 GalN), 67.1 (C-6 GalN), 61.2 (O-CH<sub>2</sub>), 54.0 (C-2 GalN), 53.3, 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.0 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 20.8, 20.64, 20.57, 20.54, 20.46 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.87 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>49</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>25</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1179.299969, measured: 1179.299517

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = + 13.76 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.05)

**Methyl (2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl 2,3-di-O-benzoyl-4-O-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate **140****



Chemical Formula:  $C_{32}H_{37}N_3O_{13}$   
Molecular Weight: 671,66

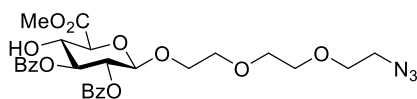
Alcohol azido PEG<sub>3</sub> (170 mg, 0.97 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of imidate **127** (424 mg, 0.65 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (3.2 mL, 0.02 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 30 min at room temperature. Then TMSOTf 1M in toluene (0.13 mL, 0.13 mmol, 0.2 eq.) was added and it was stirred for 1h at room temperature. Et<sub>3</sub>N (0.05 mL, 0.39 mmol, 0.6 eq.) was added and the reaction was stirred for 15 min. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 98/2) to give the desired product **140** as a yellow oily solid (371 mg, 85 %).

R<sub>f</sub>: 0.29 (DCM/Acetone 98/2)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.55-7.47 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.41-7.33 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.70 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.51-5.40 (m, 2H, H-2, H-4), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1), 4.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 4.03-3.96 (m, 1H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>), 3.83-3.71 (m, 4H, CO<sub>2</sub>Me, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>), 3.71-3.58 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.58-3.53 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.50-3.45 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.44-3.38 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.36-3.30 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 2.67-2.34 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(Lev)), 2.04 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 205.7 (C=O (Lev)), 171.3, 167.5, 165.8, 165.1 (C=O, C-6), 133.5, 133.4, 130.04, 129.97, 129.94 (CH<sub>ar</sub>), 129.4, 129.0 (Cq<sub>ar</sub>), 128.55, 128.51 (CH<sub>ar</sub>), 101.3 (C-1), 72.9 (C-5), 72.4 (C-3), 71.7 (C-2 or C-4), 70.8, 70.7, 70.6, 70.1 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 69.9 (C-4 or C-2), 69.7 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.8 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 37.8 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 29.7, 27.9 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

## Methyl (2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate **141**



Chemical Formula:  $C_{27}H_{31}N_3O_{11}$

Molecular Weight: 573,56

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 11.6 mL) was added to a solution of the monosaccharide **140** (371 mg, 0.55 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (3.7 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **141** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (105 mg, 33 %).

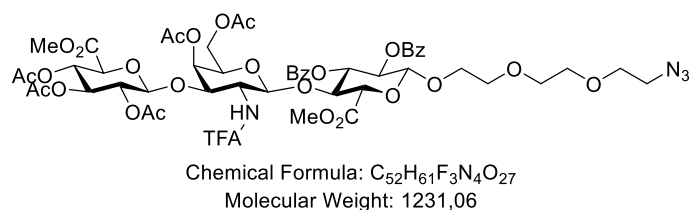
R<sub>f</sub>: 0.27 (DCM/Acetone 95/5)

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.95 (d,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.53-7.43 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.35 (q,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.55 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 5.42 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.5$  Hz, 1H, H-2), 4.89 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H), 4.19 (ddd,  $^3J_{4-OH} = 4.0$  Hz,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4), 4.11 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-5), 4.02-3.94 (m, 1H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>), 3.83 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.82-3.74 (m, 1H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>), 3.66-3.56 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.53 (t,  $^3J_{H-H} = 5.0$  Hz, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.50-3.43 (m, 3H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>), OH), 3.42-3.36 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.30 (t,  $^3J_{H-H} = 5.0$  Hz, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 169.2, 166.6, 165.2 (C=O, C-6), 133.5, 133.3, 130.0, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.4, 129.1 (Cq<sub>ar</sub>), 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 101.5 (C-1), 75.1 (C-3), 74.7 (C-5), 71.5 (C-2), 70.7 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 70.63 (C-4), 70.57, 70.4, 69.9, 69.6 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.7 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for  $C_{27}H_{31}N_3NaO_{11}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 596.185080, measured: 596.184152

**2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate **142****



A mix of acceptor **141** (105 mg, 183 μmol, 1.0 eq.), donor **99** (225 mg, 275 μmol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (1.8 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (55 μL, 55 μmol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 30 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (23 μL, 165 μmol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) to give the desired trisaccharide **142** as a white solid (37 mg, 16 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.54-7.46 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.36 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.16-5.11 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.92-4.84 (m, 2H, H-1 GlcA1, H-2 GlcA2), 4.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.30 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.25 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 3.99-4.11 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>, H-5 GlcA2), 3.84 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.82-3.74 (m, 1H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67-3.53 (m, 4H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>), H-2 GalN, H-5 GalN), 3.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.0 Hz, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.51-3.45 (m, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)), 3.45-3.37 (m, 3H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>), H-6a GalN), 3.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 5.0 Hz, 2H, PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>)), 3.17 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 2.03, 1.98, 1.97, 1.83 (s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

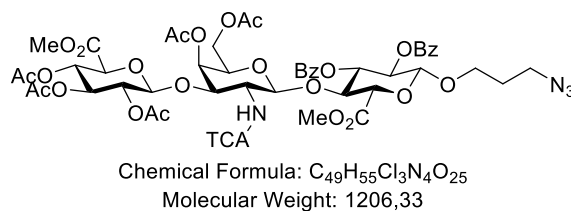
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.4, 170.1, 169.6, 169.5, 169.4, 168.9, 166.9, 165.5, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 133.4, 129.9, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.8, 129.7, 129.4 (C<sub>qar</sub>), 128.5, 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 99.8 (C-1 GlcA2), 98.8 (C-1 GalN), 75.9 (C-4 GlcA1), 74.1 (C-3 GalN), 74.0 (C-5 GlcA1), 72.44, 72.37 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA2), 72.2 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.5 (C-2 GlcA1), 71.3 (C-5 GalN), 70.8, 70.7, 70.6, 70.0, 69.6 (PEG<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>), C-2 GlcA2), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 67.8 (C-4 GalN), 61.2 (C-6 GalN), 54.0 (C-2 GalN), 53.3, 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.8 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 20.8, 20.64, 20.58, 20.54, 20.47 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.87 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>52</sub>H<sub>61</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>27</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1253.336748, measured: 1253.338441

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +9.1667 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.00)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trichloroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 144**



A mix of acceptor **128** (80 mg, 161 μmol, 1.0 eq.), donor **143** (210 mg, 242 μmol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (2.5 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (61 μL, 61 μmol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 30 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (25 μL, 183 μmol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA 5/5, then toluene/EA 5/5) to give the desired trisaccharide **144** as a white solid (43 mg, 22 %).

R<sub>f</sub>: 0.20 (PE/EA 5/5)

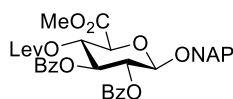
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.52 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.38 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.63 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.38 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.24 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.19-5.06 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 5.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.86 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.43-4.30 (m, 2H, H-3 GalN, H-4 GlcA1), 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.03-3.91 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>a, H-5 GlcA2), 3.85 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.75-3.67 (m, 4H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-5 GalN), 3.66-3.51 (m, 2H, O-CH<sub>2</sub>b, H-2 GalN), 3.47 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.34-3.18 (m, 3H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>, H-6b GalN), 2.06, 2.03, 1.98, 1.97, 1.81 (5s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.79-1.70 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.4, 170.2, 169.6, 169.3, 168.7, 166.8, 165.6, 165.3, 161.7 (C=O, C-6 GlcA), 133.5, 133.4, 129.9 (CH<sub>ar</sub>), 129.7, 129.2, 129.2 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.4, 128.3, 125.4 (CH<sub>ar</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 99.9 (C-1 GlcA2), 98.1 (C-1 GalN), 92.6 (CCl<sub>3</sub>), 74.9 (C-4 GlcA1), 74.3 (C-5 GlcA1), 73.6 (C-3 GalN), 72.5 (C-5 GlcA2), 72.24, 72.17 (C-3 GlcA1, C-3 GlcA2), 71.5 (C-2 GlcA1), 71.3 (C-5 GalN), 71.1 (C-2 GlcA2), 69.3 (C-4 GlcA2), 68.1 (C-4 GalN), 67.1 (O-CH<sub>2</sub>), 61.4 (C-6 GalN), 55.4 (C-2 GalN), 53.4, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 20.90, 20.87, 20.7, 20.6, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>49</sub>H<sub>55</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>25</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1227.211317, measured: 1227.211784

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +9.5778 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)

## Methyl (2-naphtylmethyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4-*O*-levulinoyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate **149**



Chemical Formula:  $C_{37}H_{34}O_{11}$

Molecular Weight: 654,67

2-naphtylmethanol (316 mg, 2.00 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of imidate **127** (877 mg, 1.33 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (6.7 mL, 0.2 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 30 min at room temperature. Then TMSOTf 1M in toluene (0.27 mL, 0.27 mmol, 0.2 eq.) was added and it was stirred for 1h at room temperature. Et<sub>3</sub>N (0.11 mL, 0.80 mmol, 0.6 eq.) was added and the reaction was stirred for 15min. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 98/2) to give the desired product **149** as a white solid (782 mg, 90 %).

R<sub>f</sub>: 0.40 (DCM/Acetone 98/2)

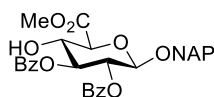
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.8 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.66 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.63-7.37 (m, 6H, H<sub>ar</sub>), 7.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.68-5.45 (m, 3H, H-2, H-3, H-4), 5.09 (d, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 13.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>a-Ar), 4.88-4.79 (m, 2H, H-1, CH<sub>2</sub>b-Ar), 4.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 3.80 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.65-2.32 (m, 4H, CH<sub>2</sub>(Lev)), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>(Lev)).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 205.7 (C=O (Lev)), 171.3, 167.4, 165.7, 165.0 (C=O, C-6), 133.9 (Cq<sub>ar</sub>), 133.5, 133.4 (CH<sub>ar</sub>), 133.2, 133.1 (Cq<sub>ar</sub>), 130.0, 129.9 (CH<sub>ar</sub>), 129.2, 128.9 (Cq<sub>ar</sub>), 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.7, 126.9, 126.23, 126.16, 125.7 (CH<sub>ar</sub>), 99.4 (C-1), 72.9 (C-5), 72.3 (C-3), 71.5 (C-2), 71.0 (CH<sub>2</sub>-Ar), 69.8 (C-4), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 37.7 (CH<sub>2</sub>(Lev)), 29.6 (CH<sub>3</sub>(Lev)), 27.8 (CH<sub>2</sub>(Lev)).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for  $C_{37}H_{34}NaO_{11}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 677.199333, measured: 677.199552

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +45.5097 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 0.97)

## Methyl (2-naphtylmethyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosid)uronate **145**



Chemical Formula:  $C_{32}H_{28}O_9$

Molecular Weight: 556,57

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 25.2 mL) was added to a solution of the monosaccharide **149** (782 mg, 1.20 mmol) in pyridine (7.8 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The solution was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **145** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white solid (599 mg, 90 %).

$R_f$ : 0.35 (PE/EA 6/4)

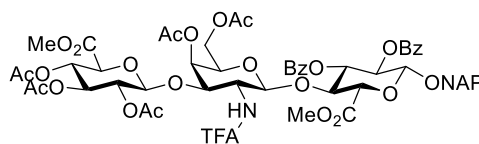
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.96 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.89 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.76 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.67 (s, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.63-7.39 (m, 6H,  $H_{ar}$ ), 7.35 (q,  $^3J_{H-H} = 7.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.30-7.21 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 5.55 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.5$  Hz, 1H, H-2), 5.45 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3), 4.97 (ABq, 2H,  $CH_2-Ar$ ), 4.81 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1), 4.23 (ddd,  $^3J_{4-OH} = 3.5$  Hz,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4), 4.06 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-5), 3.87 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 3.33 (d,  $^3J_{OH-4} = 3.5$  Hz, 1H).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 169.3, 166.8, 165.3 (C=O, C-6), 134.0 ( $C_{qar}$ ), 133.6, 133.4 ( $CH_{ar}$ ), 133.24, 133.18 ( $C_{qar}$ ), 130.1, 130.0 ( $CH_{ar}$ ), 129.4, 129.1 ( $C_{qar}$ ), 128.54, 128.50, 128.4, 128.0, 127.8, 126.9, 126.3, 126.2, 125.8 ( $CH_{ar}$ ), 99.8 (C-1), 75.2 (C-3), 74.8 (C-5), 71.3 (C-2), 71.1 ( $CH_2-Ar$ ), 70.8 (C-4), 53.1 ( $CO_2CH_3$ ).

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{32}H_{28}NaO_9$   $[M+Na]^+$ : 579.162553, measured: 579.162483

$[\alpha]_D^{20} = +33.9222$  ( $CHCl_3$ ,  $c$  1.00)

**2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 146a**



Chemical Formula: C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>25</sub>  
Molecular Weight: 1214,07

A mix of acceptor **145** (125 mg, 224 μmol, 1.0 eq.), donor **99** (275 mg, 336 μmol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous toluene (2.2 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (50 μL, 50 μmol, 0.15 eq.) was added and it was stirred for 30 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (21 μL, 150 μmol, 0.45 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA 5/5 up to 2/8 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired trisaccharide **146** as a white solid (123 mg, 45 %).

R<sub>f</sub>: 0.31 (DCM/Acetone 98/2 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.66 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.64-7.56 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.55-7.40 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.29-7.24 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.58-5.47 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-3 GlcA1), 5.21-5.11 (m, 3H, H-4 GalN, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 5.05 (d, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 12.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>a-Ar), 4.92-4.78 (m, 4H, CH<sub>2</sub>b-Ar, H-1 GalN, H-1 GlcA1, H-2 GlcA2), 4.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.26 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 3.99-3.91 (m, 1H, H-5 GlcA2), 3.84 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.69-3.57 (m, 2H, H-2 GalN, H-5 GalN), 3.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 2.03, 1.99, 1.98, 1.97, 1.81 (5s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.4, 170.1, 169.55, 169.47, 169.4, 168.8, 166.8, 165.5, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 133.9 (C<sub>q</sub><sub>ar</sub>), 133.4 (CH<sub>ar</sub>), 133.21, 133.17 (C<sub>q</sub><sub>ar</sub>), 130.0, 129.81 (CH<sub>ar</sub>), 129.77, 129.3 (C<sub>q</sub><sub>ar</sub>), 128.5, 128.42, 128.37, 128.0, 127.8, 126.9, 126.3, 126.2, 125.7 (CH<sub>ar</sub>), 100.0, 99.8 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 98.7 (C-1 GalN), 75.8 (C-4 GlcA1), 74.1 (C-3 GalN, C-5 GlcA1), 72.4 (C-5 GlcA2), 72.3, 72.2 (C-2 GlcA1 or C-3 GlcA1, C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.4, 71.3 (C-2 GlcA1 or C-3 GlcA1, C-5 GalN), 71.3 (CH<sub>2</sub>-Ar), 70.7 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 67.8 (C-4 GalN), 61.2 (C-6 GalN), 54.0 (C-2 GalN), 53.3, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.8, 20.62, 20.56, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.87 (CF<sub>3</sub>)

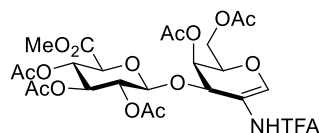
**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>25</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1236.314222, measured: 1236.312020

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +13.6000 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)



Side products from previous reaction:

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4,6-di-*O*-acetyl-1,2-deoxy-2-trifluoroacetamido-D-galactal 150**



Chemical Formula: C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>16</sub>  
Molecular Weight: 657,50

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.62 (s, 1H, NH), 7.33 (s, 1H, H-1 GalN), 5.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 4.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.28-5.16 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.07 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 4.5 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.33-4.21 (m, 2H, H-5 GalN, H-6a GalN), 4.15-4.00 (m, 2H, H-5 GlcA, H-6b GalN), 3.76 (s, 4H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.11, 2.09, 2.06, 2.02 (s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

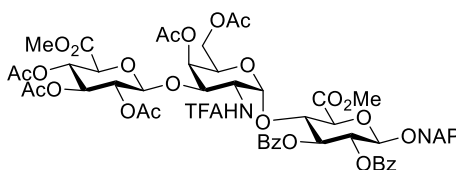
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 170.6, 170.2, 170.0, 169.4, 166.4 (C=O, C-6 GlcA), 142.0 (C-1 GalN), 109.3 (C-2 GalN), 99.8 (C-1 GlcA), 73.7 (C-5 GalN), 73.0 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA), 70.4 (C-2 GlcA), 70.2 (C-3 GalN), 69.1 (C-4 GlcA), 63.9 (C-4 GalN), 62.3 (C-6 GalN), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.80, 20.77, 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.39 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>16</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 680.140889, measured: 680.142098

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +13.3000 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.00)

**2-Naphtylmethyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-methyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate 146b**



Chemical Formula: C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>25</sub>  
Molecular Weight: 1214,07

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.89-7.79 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.69-7.64 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.64-7.54 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.54-7.30 (m, 7H, H<sub>ar</sub>), 6.49 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 9.5 Hz, 1H, NH), 5.63 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.31 (bs, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.24-5.12 (m, 3H, H-1 GalN, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 5.07 (d, <sup>2</sup>J<sub>H-H</sub> = 12.5 Hz, 1H, CH<sub>2a</sub>-Ar), 4.96 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.88-4.78 (m, 2H, H-1 GlcA1, CH<sub>2b</sub>-Ar), 4.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.57 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.20-4.13 (m, 1H, H-6a GalN), 4.07-3.99 (m,

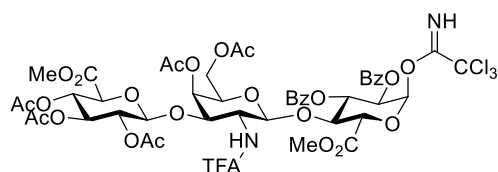
2H, H-3 GalN, H-5 GlcA2), 3.95-3.90 (m, 2H, H-5 GalN, H-6b GalN), 3.88 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.76 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.11, 2.05, 2.03, 1.98 (s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.6, 170.4, 169.8, 169.7, 169.4, 168.4, 166.8, 165.8, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 133.95 (CH<sub>ar</sub>), 133.90 (Cq<sub>ar</sub>), 133.5 (CH<sub>ar</sub>), 133.21, 133.19 (Cq<sub>ar</sub>), 130.0, 129.9 (CH<sub>ar</sub>), 129.1 (Cq<sub>ar</sub>), 128.7, 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 126.9, 126.33, 126.26, 125.7 (CH<sub>ar</sub>), 99.4, 99.3 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 97.0 (C-1 GalN), 74.55, 74.47 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA1), 73.4 (C-4 GlcA1), 72.6 (C-3 GalN or C-5 GlcA2), 72.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.5 (C-2 GlcA1), 71.0 (CH<sub>2</sub>-Ar), 70.7 (C-3 GalN or C-5 GlcA2), 69.7 (C-2 GlcA2), 69.2 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.6, 68.5 (C-4 GalN, C-5 GalN), 61.6 (C-6 GalN), 53.2, 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.9 (C-2 GalN), 20.8, 20.7, 20.63, 20.59, 20.55. (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.70 (CF<sub>3</sub>)

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +25.1889 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.00)

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-methyl 2,3-di-*O*-benzoyl-1-*O*-trichloroacetimidoyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyluronate **152****



Chemical Formula: C<sub>48</sub>H<sub>50</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>25</sub>  
Molecular Weight: 1218,26

DDQ (91 mg, 0.40 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **146** (162 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM/MeOH 9/1 (1.3 mL, 0.1 M) under argon. The reaction was stand protected from light and stirred at room temperature for 24h. After addition of DCM, the organic layer was washed 3 times with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 9/1) to give the desired product as a beige solid (106 mg, 74 %).

Trichloroacetonitrile (100  $\mu$ L, 0.99 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1M in anhydrous DCM (25  $\mu$ L, 25  $\mu$ mol, 0.25 eq.) were added to a solution of the previous trisaccharide (106 mg, 99  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (0.8 mL, 0.13 g/mL) under argon. The reaction mixture was stirred 2h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA 3/7 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired compound **152** as a white solid (94 mg, 78 %).

R<sub>f</sub>: 0.52 (9/1 DCM/Acetone + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 8.67 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 7.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.51 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.42-7.30 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 6.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.98 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.51 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.18-5.09 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.93-4.82 (m, 2H, H-1 GalN, H-2 GlcA2), 4.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.44-4.34 (m, 2H, H-3 GalN, H-4 GlcA1), 3.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-5 GlcA2), 3.83 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 3.61-3.52 (m, 1H, H-2 GalN), 3.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 2.05, 1.99, 1.97, 1.80 (4s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

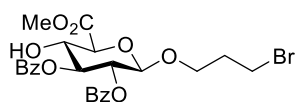
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 170.4, 170.1, 169.52, 169.47, 169.40, 168.6, 165.6, 165.5, 160.6 (C=O, C-6 GlcA), 133.8, 133.6, 130.0, 129.8, 128.6, 128.5 (C<sub>ar</sub>), 99.9 (C-1 GlcA2), 98.2 (C-1 GlcA1), 93.0 (C-1 GalN), 90.7 (CCl<sub>3</sub>), 75.1 (C-4 GlcA1), 73.9 (C-3 GalN), 72.5 (C-5 GlcA2), 72.2, 72.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2, C-5 GlcA1), 71.4 (C-5 GalN), 70.9 (C-2 GlcA2), 69.9, 69.7 (C-2 GlcA1, C-3 GlcA1), 69.2 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 67.9 (C-4 GalN), 61.3 (C-6 GalN), 54.6 (C-2 GalN), 53.5, 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.9, 20.7, 20.6, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.91 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>48</sub>H<sub>50</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>25</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1239.161254, measured: 1239.161741

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +28.5185 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.11)

### Methyl (3-bromopropyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosid)uronate **147**



Chemical Formula: C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>BrO<sub>9</sub>

Molecular Weight: 537,36

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 85.1 mL) was added to a solution of monosaccharide **137** (2.57 g, 4.05 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (26 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The solution was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **147** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) as a white paste (1.84 g, 85 %).

R<sub>f</sub>: 0.42 (DCM/Acetone 95/5)

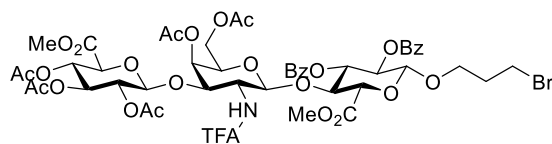
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.00-7.92 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.51 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.37 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.56 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2), 4.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1), 4.20 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>4-OH</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4), 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5), 4.08-4.02 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.86 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.75-3.66 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.45 (bs, <sup>3</sup>J<sub>OH-4</sub> = 3.0 Hz, 1H, OH), 3.38-3.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.17-1.92 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 169.3, 166.7, 165.3 (C=O, C-6), 133.6, 133.5, 130.0, 129.9 (CH<sub>ar</sub>), 129.2, 129.1 (C<sub>qar</sub>), 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 101.7 (C-1), 75.1, 74.8 (C-3, C-5), 71.4 (C-2), 70.7 (C-4), 67.9 (O-CH<sub>2</sub>), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32.5 (-CH<sub>2</sub>-), 30.1 (CH<sub>2</sub>-Br).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>BrNaO<sub>9</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 559.057415, measured: 559.056841

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +55.7756 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.01)

**3-Bromopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4,6-di-O-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 148a**



Chemical Formula: C<sub>49</sub>H<sub>55</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>25</sub>  
Molecular Weight: 1194.86

A mix of acceptor **147** (133 mg, 248 μmol, 1.0 eq.), donor **99** (304 mg, 372 μmol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (2.5 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1 M in toluene (74 μL, 74 μmol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 30 min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (31 μL, 222 μmol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 95/5) to give the desired trisaccharide **148** as a white solid (128 mg, 43 %).

R<sub>f</sub>: 0.24 (DCM/Acetone 95/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.90 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.47 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.38-7.29 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.59 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.13-5.08 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.88-4.82 (m, 1H, H-2 GlcA2), 4.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.02-3.92 (m, 2H, O-CH<sub>2a</sub>, H-5 GlcA2), 3.81 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67-3.59 (m, 3H, O-CH<sub>2b</sub>, H-2 GalN, H-5 GalN), 3.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.34-3.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 3.14 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 2.10-2.02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.01, 1.96, 1.94, 1.80 (4s, 15H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.4, 170.0, 169.6, 169.5, 169.4, 168.6, 166.9, 165.5, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 155.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 24 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.43, 133.38, 129.8, 129.72 (CH<sub>ar</sub>), 129.67, 129.1 (C<sub>qar</sub>), 128.5, 128.3 (CH<sub>ar</sub>), 115.6 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 99.7 (C-1 GlcA2), 98.8 (C-1 GalN), 75.7 (C-4 GlcA1), 74.01, 73.99 (C-3 GalN, C-5 GlcA1), 72.3, 72.2 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA2), 72.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.4 (C-2 GlcA2), 71.2 (C-5 GalN), 70.5 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 67.8 (O-CH<sub>2</sub>), 67.7 (C-4 GalN), 61.1 (C-6 GalN), 53.8 (C-2 GalN), 53.2, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 32.4 (-CH<sub>2</sub>-), 29.9 (CH<sub>2</sub>-Br), 20.7, 20.54, 20.47, 20.44, 20.36 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

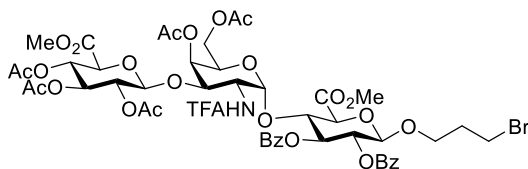
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.82 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>49</sub>H<sub>55</sub>BrF<sub>3</sub>NNaO<sub>25</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1216.209084, measured: 1216.210077

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +12.8070 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.95)

Side products from previous reaction:

**3-Bromopropyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(4,6-di-*O*-acetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-methyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate 148b**



Chemical Formula:  $C_{49}H_{55}BrF_3NO_{25}$

Molecular Weight: 1194.86

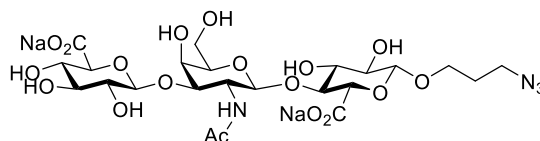
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.85 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.52-7.43 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.33 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 6.71 (d,  $^3J_{NH-2} = 9.0$  Hz, 1H, NH), 5.69 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.35 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.0$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.30 (d,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.21-5.08 (m, 3H, H-1 GalN, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.97-4.91 (m, 1H, H-2 GlcA2), 4.79 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.65 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.50 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.35 (dd,  $^3J_{2-1} = 3.5$  Hz,  $^3J_{2-NH} = 9.0$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-2 GalN), 4.26 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.16-4.10 (m, 1H, H-6a GalN), 4.08-4.02 (m, 2H, H-3 GalN, H-5 GlcA2), 4.02-3.97 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.95-3.87 (m, 2H, H-5 GalN, H-6b GalN), 3.85 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.77 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.63 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.35-3.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.09 (s, 3H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 2.08-2.01 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>-, OC(O)CH<sub>3</sub>), 2.00, 1.97 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 170.6, 170.0, 169.8, 169.4, 168.3, 166.9, 165.8, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.2 (q,  $^2J_{C-F} = 38$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.9, 133.5, 129.9, 129.8, 129.7 (CH<sub>ar</sub>), 128.9 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5, 128.3 (CH<sub>ar</sub>), 128.1 (Cq<sub>ar</sub>), 115.6 (q,  $^1J_{C-F} = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 101.3 (C-1 GlcA1), 99.2 (C-1 GlcA2), 96.8 (C-1 GalN), 74.40 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA1), 73.12 (C-4 GlcA1), 72.45 (C-3 GalN or C-5 GlcA2), 71.99 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.53 (C-2 GlcA1), 70.48 (C-3 GalN or C-5 GlcA2), 69.62 (C-2 GlcA2), 69.16 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.5, 68.4 (C-4 GalN, C-5 GalN), 67.8 (O-CH<sub>2</sub>), 61.5 (C-6 GalN), 53.13, 53.08 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.8 (C-2 GalN), 32.3 (-CH<sub>2</sub>-), 30.0 (CH<sub>2</sub>-Br), 20.7, 20.59, 20.54, 20.49, 20.46 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.64 (CF<sub>3</sub>)

**$[\alpha]_D^{20} = +40.7600$  ( $CHCl_3$ , c 1.00)**

**3-Azidopropyl O-(sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-acetamido-2-deoxy-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-sodium-β-D-glucopyranosyluronate **133****



Chemical Formula:  $C_{23}H_{34}N_4Na_2O_{18}$   
Molecular Weight: 700,51

A cold solution of LiOH 1M (360  $\mu$ L, 360  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and  $H_2O_2$  30 % (180  $\mu$ L) was added at 0 °C to a solution of trisaccharide **139** (42 mg, 36  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (1.2 mL, 0.03 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  3/1 (1.2 mL, 0.03 M). NaOH 4M was added (950  $\mu$ L, 3.81 mmol, 105.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

Et<sub>3</sub>N (70  $\mu$ L, 472  $\mu$ mol, 13.0 eq.) and Ac<sub>2</sub>O (70  $\mu$ L, 726  $\mu$ mol, 20.0 eq.) were added to a solution of the previous crude trisaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (1.8 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02M was added until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4-Na<sup>+</sup> to give the deprotected trisaccharide **133** as a sodium salt (20 mg, 79 % over 3 steps).

R<sub>f</sub>: 0.24 (EA/MeOH/ $H_2O$  4/2/1)

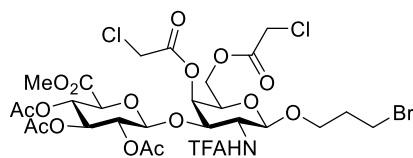
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm):** 4.61-4.46 (m, 3H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2, H-1 GalN), 4.20 (bs, 1H, H-4 GalN), 4.09-3.93 (m, 2H, O-CH<sub>2a</sub>, H-2 GalN), 3.99-3.71 (m, 7H, O-CH<sub>2b</sub>, H-3 GalN, H-4 GlcA1, H-5 GalN, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, H-6 GalN), 3.68-3.60 (m, 1H, H-3 GlcA1), 3.57-3.44 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 3.42-3.30 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 2.06 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.97-1.87 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm):** 175.0 (C=O, C-6 GlcA), 104.1, 102.5 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 101.0 (C-1 GalN), 80.3, 79.9 (C-3 GalN, C-4 GlcA1), 75.3, 75.0 (C-5 GalN, C-5 GlcA1, C-5 GlcA2, C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 74.0 (C-3 GlcA1), 72.8, 72.7 (C-2 GlcA1, C-2 GlcA2), 71.8 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 67.7 (C-4 GalN), 67.6 (O-CH<sub>2</sub>), 61.1 (C-6 GalN), 51.1 (C-2 GalN), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.3 (-CH<sub>2</sub>-), 22.5 (NHC(O)CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{23}H_{37}N_4O_{18}$  [M-2Na+3H]<sup>+</sup>: 657.209737, measured: 657.210566

**$[\alpha]_D^{20}$**  = + 96.6889 ( $H_2O$ ,  $c$  1.00)

**3-Bromopropyl O-(Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-deoxy-4,6-di-O-chloroacetyl-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranose 153**



Chemical Formula:  $C_{28}H_{35}BrCl_2F_3NO_{17}$

Molecular Weight: 865,38

3-bromo-1-propanol (12  $\mu$ L, 98  $\mu$ mol, 1.6 eq.) was added to a solution of imidate **101** (55 mg, 62  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (300  $\mu$ L, 0.2 M) under argon in the presence of molecular sieves 4 Å. The reaction was stirred for 30min at room temperature. Then TMSOTf 1M in toluene (15  $\mu$ L, 15  $\mu$ mol, 0.25 eq.) was added and the reaction mixture was stirred for 45min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (6  $\mu$ L, 46  $\mu$ mol, 0.75 eq.) was added and the reaction was stirred for 15min. Then the solution was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/acetone 95/5) to give the desired product **153** as a white solid (27 mg, 52 %).

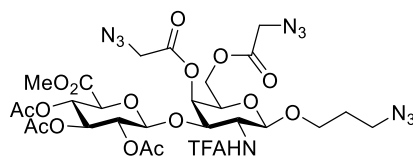
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H), 5.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.22-5.11 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.94 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.78-4.71 (m, 2H, H-1 GlcA, H-1 GalN), 4.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.29-4.21 (m, 2H, H-6 GalN), 4.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.03 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 4.00-3.93 (m, 2H, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.86 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 3.76 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.70-3.62 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.51-3.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.19-2.05 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 2.01, 1.99 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.0, 169.9, 169.5, 167.10, 167.06, 166.8 (C=O, C-6 GlcA), 100.1, 99.6 (C-1 GlcA, C-1 GalN), 73.7 (C-3 GalN), 72.6 (C-5 GlcA), 72.0 (C-3 GlcA), 70.8 (C-5 GalN), 70.5 (C-2 GlcA), 70.1 (C-4 GalN), 69.1 (C-4 GlcA), 67.7 (O-CH<sub>2</sub>), 63.1 (C-6 GalN), 53.6, 53.3 (C-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.73, 40.71 (CH<sub>2</sub>Cl), 32.3 (-CH<sub>2</sub>-), 30.0 (CH<sub>2</sub>-Br), 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.67 (CF<sub>3</sub>)



**3-Azidopropyl O-(Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-4,6-di-O-azidoacetyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranose 154**



Chemical Formula:  $C_{28}H_{35}F_3N_{10}O_{17}$

Molecular Weight: 840,64

Sodium azide (10 mg, 156  $\mu$ mol, 5.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **153** (27 mg, 31  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in DMF (0.5 mL, 0.06 M). The reaction was stirred at room temperature for 4h. Then, the reaction mixture was cooled down to room temperature and cold water was added. Then, the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed twice with NaCl. The solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was analysed without any further purification.

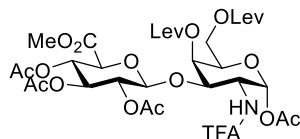
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.57 (d,  $^3J_{NH-2} = 8.0$  Hz, 1H, NH), 5.44 (d,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.24-5.08 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.93 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.75-4.64 (m, 2H, H-1 GlcA, H-1 GalN), 4.40 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.0$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.35-4.19 (m, 2H, H-6 GalN), 4.05-3.85 (m, 8H, H-2 GalN, H-5 GlcA, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>a, OC(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 3.75 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.61-3.49 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.34 (t,  $^3J_{H-H} = 6.5$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.00, 1.99 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.88-1.72 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 170.1, 169.9, 169.4, 168.1, 168.0, 167.0, 162.8 (C=O, C-6 GlcA), 100.2, 99.8 (C-1 GlcA, C-1 GalN), 73.6 (C-3 GalN), 72.5 (C-5 GlcA or C-5 GalN), 71.7 (C-3 GlcA), 70.7 (C-5 GlcA or C-5 GalN), 70.3 (C-2 GlcA), 69.7 (C-4 GalN), 69.2 (C-4 GlcA), 66.6 (O-CH<sub>2</sub>), 62.5 (C-6 GalN), 53.3, 53.2 (C-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 50.2, 50.1 (OC(O)CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>), 48.0 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.71 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{28}H_{35}F_3N_{10}NaO_{17}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 863.202595, measured: 863.202648

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1-*O*-acetyl-2-deoxy-4,6-di-*O*-levulinoyl-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **155****



Chemical Formula: C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>20</sub>  
Molecular Weight: 829,68

DMAP (147 mg, 1.20 mmol, 0.3 eq.), DCC (2.48 g, 12.00 mmol, 3.0 eq.) and levulinic acid (1.39 g, 12.00 mmol, 3.0 eq.) were added to a solution of the disaccharide **96** (2.53 g, 4.00 mmol, 1.0 eq.) in DCM (30 mL, 0.12 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h then filtered. The filtrate was washed once with water, once with a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **155** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5) as a white solid (3.60 g, quant.).

R<sub>f</sub>: 0.46 (DCM/Acetone 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 7.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.34 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.25-5.12 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.51 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.35 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.24 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.16-3.98 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6 GalN), 3.74 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.78-2.71 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.64 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.20 (s, 3H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 2.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.05, 2.03, 2.00 (3s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

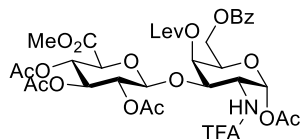
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 206.8, 206.2 (C=O (Lev)), 172.3, 171.4, 170.3, 169.8, 169.5, 169.0, 167.1 (C=O, C-6 GlcA), 98.0 (C-1 GlcA), 90.6 (C-1 GalN), 72.4 (C-5 GlcA), 72.0 (C-3 GlcA), 69.6 (C-5 GalN), 69.01, 68.96 (C-3 GalN, C-4 GlcA), 68.8 (C-2 GlcA), 68.5 (C-4 GalN), 61.5 (C-6 GalN), 53.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.9 (C-2 GalN), 38.08, 38.02 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.84, 29.80 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.04, 28.00 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.9, 20.7, 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.75 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>33</sub>H<sub>42</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>20</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 852.214448, measured: 852.215185

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +32.2424 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.1)

**O-(Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-1-O-acetyl-6-O-benzoyl-2-deoxy-4-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranose 156**



Chemical Formula: C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>19</sub>  
Molecular Weight: 835,69

Benzoyl cyanide (892 mg, 6.80 mmol, 4.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **96** (1.15 g, 1.70 mmol, 1.0 eq.) in pyridine (24 mL, 0.07 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 24h. The reaction was quenched by adding methanol (10 mL), stirred 30min then the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The resulting solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give the crude benzoylated compound which was used without any further purification.

DMAP (66.0 mg, 0.54 mmol, 0.3 eq.), DCC (561 mg, 2.72 mmol, 1.5 eq.) and levulinic acid (316 mg, 2.72 mmol, 1.5 eq.) were added to a solution of the previous crude (1.33 g, 1.81 mmol, 1.0 eq.) in DCM (15 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 6h then filtered. The filtrate was washed once with water, once with a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **156** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 9/1) as a white solid (1.17 g, 77 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.34 (DCM/Acetone 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.05 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.53 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.44 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.50 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.27-5.11 (m, 3H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.55 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.46-4.35 (m, 3H, H-3 GalN, H-5 GalN, H-6a), 4.26-4.11 (m, 1H, H-6b), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.82-2.59 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.19 (s, 3H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 2.12 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.03, 2.01, 2.00 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

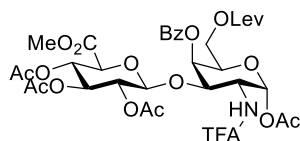
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.1 (C=O (Lev)), 171.3, 170.4, 169.8, 169.5, 168.9, 167.2, 166.1 (C=O, C-6 GlcA), 157.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.2, 130.1 (CH<sub>ar</sub>), 129.7 (Cq<sub>ar</sub>), 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 97.7 (C-1 GlcA), 90.7 (C-1 GalN), 72.5 (C-5 GlcA), 72.0 (C-3 GlcA), 69.7 (C-5 GalN), 69.0, 68.6, 68.5, 68.4 (C-3 GalN, C-4 GalN, C-2 GlcA, C-4 GlcA), 61.5 (C-6 GalN), 53.3 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.0 (C-2 GalN), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.8 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.9, 20.7, 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.71 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>19</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 858.203883, measured: 858.203482

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +16.5193 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.98)

**O-(Methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-1-O-acetyl-4-O-benzoyl-2-deoxy-6-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-α-D-galactopyranose 157**



Chemical Formula: C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>19</sub>  
Molecular Weight: 835,69

DMAP (209 mg, 1.71 mmol, 0.3 eq.), DCC (1.29 g, 6.27 mmol, 1.1 eq.) and levulinic acid (728 mg, 6.27 mmol, 1.1 eq.) were added at 0 °C to a solution of disaccharide **96** (3.61 g, 5.70 mmol, 1.0 eq.) in DCM (48 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred 1h30 at 0 °C then filtered. The filtrate was washed once with water, once with a solution of aqueous saturated NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5).

Benzoyl chloride (1.2 mL, 10.48 mmol, 2.0 eq.) was added to a solution of previous crude solid (3.83 g, 5.24 mmol, 1.0 eq.) in pyridine/DCM 1/2 (44 mL, 0.12 M). The reaction was stirred at 0 °C for 3h. MeOH (2.3 mL, 5 % of V<sub>total</sub>) was added, then the reaction was stirred for 20min at room temperature. DCM was added and the resulting organic layer was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **157** was obtained after purification by silica gel column chromatography (toluene/EA 4/6) as a white solid (2.54 g, 53 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.24 (toluene/EA 4/6)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.00 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.43 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.0 Hz, 1H, NH), 6.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.58 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.24-5.09 (m, 3H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.88 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.62 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.35 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.16-4.05 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6 GalN), 3.70 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.72 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.20 (s, 3H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.11, 2.00, 1.98 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

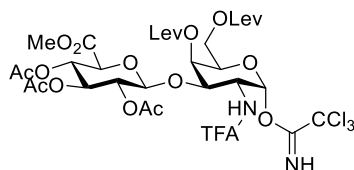
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.8 (C=O (Lev)), 172.2, 170.4, 169.7, 169.5, 169.0, 167.1, 165.1 (C=O, C-6 GlcA), 157.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.6, 129.9 (CH<sub>ar</sub>), 129.0 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6 (CH<sub>ar</sub>), 115.6 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 97.4 (C-1 GlcA), 90.5 (C-1 GalN), 72.3 (C-5 GlcA), 71.9 (C-3 GlcA), 69.7 (C-5 GalN), 68.81, 68.77, 68.6, 68.5 (C-2 GlcA, C-4 GlcA, C-3 GalN, C-4 GalN), 61.5 (C-6 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.2 (C-2 GalN), 37.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.7 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 27.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.79, 20.77, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.75 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>35</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>19</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 858.203883, measured: 858.204283

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +41.7427 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.95)

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-deoxy-4,6-di-*O*-levulinoyl-1-*O*-trichloroacetimidoyl-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **163****



Chemical Formula:  $C_{33}H_{40}Cl_3F_3N_2O_{19}$   
Molecular Weight: 932,02

**Protocole A :**

Benzylamine (190  $\mu$ L, 1.73 mmol, 1.5 eq.) was added to a solution of disaccharide **155** (957 mg, 1.15 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (5.0 mL, 0.23 M) under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature for 7h. EA was added and the organic layer was washed once with HCl 1M, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with brine. The solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. Benzylacetamide was removed by Sephadex LH-20 (DCM/MeOH 1/1) to give the crude product.

Trichloroacetonitrile (910  $\mu$ L, 9.12 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1 M in anhydrous DCM (230  $\mu$ L, 230  $\mu$ mol, 0.25 eq.) were added to a solution of the previous crude disaccharide (718 mg, 0.91 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (9.1 mL, 0.1 M) under argon. The reaction mixture was stirred 1h30 at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **163** was obtained after purification by silica gel column chromatography (toluene/acetone 75/25 + 0.5 %  $Et_3N$ ) as a beige solid (497 mg, 46 % over 2 steps).

**Protocole B :**

Trichloroacetonitrile (0.95 mL, 9.51 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1M in anhydrous DCM (0.24 mL, 0.24 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of disaccharide **168** (749 mg, 0.95 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM (4.8 mL, 0.2 M) under argon. The reaction mixture was stirred 4h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **163** was obtained after purification by silica gel column chromatography (toluene/acetone 75/25 + 0.5 %  $Et_3N$ ) as a beige solid (561 mg, 63 %).

R<sub>f</sub>: 0.31 (toluene/acetone 75/25 + 0.5 %  $Et_3N$ )

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.78 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 6.98 (d,  $^3J_{NH-2}$  = 8.0 Hz, 1H, NH), 6.49 (d,  $^3J_{1-2}$  = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.39 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.18 (dd,  $^3J_{3-2}$  =  $^3J_{3-4}$  = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.12-4.99 (m, 2H, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 4.82 (d,  $^3J_{1-2}$  = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.56 (ddd,  $^3J_{2-1}$  = 3.5 Hz,  $^3J_{2-NH}$  = 8.0 Hz,  $^3J_{2-3}$  = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.36-4.26 (m, 2H, H-3 GalN, H-5 GalN), 4.14-4.00 (m, 3H, H-5 GlcA, H-6 GalN), 3.68 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.78-2.66 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.62 (t,  $^3J_{H-H}$  = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.52 (t,  $^3J_{H-H}$  = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.15, 2.14 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.01, 1.98, 1.98 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

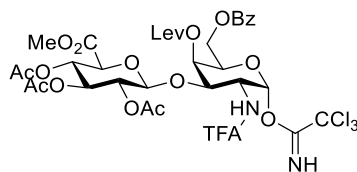
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 206.6, 206.2 (C=O (Lev)), 172.2, 171.4, 170.2, 169.8, 169.4, 166.6, 160.4 (C=O, C-6 GlcA), 157.5 (q,  $^2J_{C-F}$  = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 115.6 (q,  $^1J_{C-F}$  = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 98.4 (C-1 GlcA), 94.4 (C-1 GalN), 90.7 (C-Cl<sub>3</sub>), 72.6 (C-5 GlcA), 72.0 (C-3 GlcA), 69.9, 69.8 (C-3 GalN, C-5 GalN), 69.3, 69.0 (C-2 GlcA, C-4 GlcA), 68.1 (C-4 GalN), 61.4 (C-6 GalN), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.4 (C-2 GalN), 38.0, 37.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.8, 29.7 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 27.9, 27.8 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.7, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.73 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{33}H_{40}Cl_3F_3N_2NaO_{19}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 953.113515, measured: 953.114826

**$[\alpha]_D^{20}$**  = +30.4151 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.99)

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-4-*O*-levulinoyl-1-*O*-trichloroacetimidoyl-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **164****



Chemical Formula: C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 938,03

Benzylamine (0.59 mL, 5.4 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **156** (1.50 g, 1.80 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (7.8 mL, 0.23 M) under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. EA was added and the organic layer was washed once with HCl 1M, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with brine. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (1.8 mL, 18.00 mmol, 10.0 eq.) and DBU (70  $\mu$ L, 0.45 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the crude disaccharide in anhydrous DCM (18 mL, 0.2 M) under argon. The reaction mixture was stirred 3h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **164** was obtained after purification by silica gel column chromatography (PE/EA 55/45 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (858 mg, 51 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.30 (PE/EA 55/45 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 8.74 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 8.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.42 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 6.57 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA), 5.15-5.07 (m, 2H, H-2 GlcA, H-4 GlcA), 4.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.65 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.47 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.43-4.34 (m, 2H, H-3 GalN, H-6a GalN), 4.29 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>2</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6b GalN), 4.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 10.0 Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.68 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.82-2.62 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.14 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.02, 2.01 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

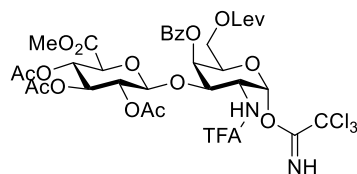
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 206.1 (C=O (Lev)), 171.4, 170.3, 169.9, 169.4, 166.6, 166.0, 160.5 (C=O, C-6 GlcA), 157.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.2, 130.0 (CH<sub>ar</sub>), 129.7 (Cq<sub>ar</sub>), 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 98.4 (C-1 GlcA), 94.6 (C-1 GalN), 90.7 (CCl<sub>3</sub>), 72.8 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA), 70.1, 70.0 (C-3 GalN, C-5 GalN), 69.13, 69.06 (C-2 GlcA, C-4 GlcA), 68.4 (C-4 GalN), 62.0 (C-6 GalN), 53.2 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.4 (C-2 GalN), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.8 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.0 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.7, 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.71 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 959.102951, measured: 959.103625

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +26.6564 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.08)

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-4-*O*-benzoyl-2-deoxy-6-*O*-levulinoyl-1-*O*-trichloroacetimidoyl-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranose **165****



Chemical Formula: C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>18</sub>  
Molecular Weight: 938,03

Benzylamine (0.34 mL, 3.12 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **157** (869 mg, 1.04 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (4.5 mL, 0.23 M) under argon. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. EA was added and the organic layer was washed once with HCl 1M, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with brine. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The crude product was used without any further purification.

Trichloroacetonitrile (1.0 mL, 10.40 mmol, 10.0 eq.) and DBU 1M in anhydrous DCM (260  $\mu$ L, 0.26 mmol, 0.25 eq.) were added to a solution of the previous crude disaccharide in anhydrous DCM (10.0 mL, 0.2 M) under argon. The reaction mixture was stirred 4 h at room temperature then concentrated under reduced pressure. The desired product **165** was obtained after purification by silica gel column chromatography (toluene/EA 6/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) as a white solid (434 mg, 45 % over 2 steps).

R<sub>f</sub>: 0.46 (toluene/EA 6/4 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 8.86 (s, 1H, C(NH)CCl<sub>3</sub>), 8.15-8.01 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.71-7.55 (m, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.43 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 5.72 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.33-5.07 (m, 3H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.78 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-NH</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-2 GalN), 4.60 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.51 (dd, <sup>3</sup>J<sub>5-6a</sub> = <sup>3</sup>J<sub>5-6b</sub> = 6.5 Hz, 1H, H-5 GalN), 4.23-4.16 (m, 2H, H-6 GalN), 4.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.81-2.64 (m, 4H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.18, 2.05 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** 206.6 (C=O (Lev)), 172.1, 170.4, 169.8, 169.4, 166.5, 165.1, 160.5 (C=O, C-6 GlcA), 157.7 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 38 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 137.90 (C<sub>qar</sub>), 133.7, 130.0 (CH<sub>ar</sub>), 129.0 (C<sub>qar</sub>), 128.7 (CH<sub>ar</sub>), 115.6 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 97.8 (C-1 GlcA), 94.3 (C-1 GalN), 90.7 (CCl<sub>3</sub>), 72.7 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA), 69.9 (C-5 GalN), 69.1 (C-3 GalN), 68.95, 68.86 (C-2 GlcA, C-4 GlcA), 68.5 (C-4 GalN), 61.5 (C-6 GalN), 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.8 (C-2 GalN), 37.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.8 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 27.8 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.9, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

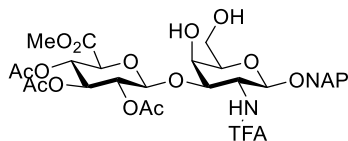
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm):** -75.69 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>35</sub>H<sub>38</sub>Cl<sub>3</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>18</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 959.102951, measured: 959.102407

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +93.0045 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.98)



**2-Napthylmethyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-2-deoxy-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranoside **166****



Chemical Formula:  $C_{32}H_{36}F_3NO_{15}$   
Molecular Weight: 731,63

A solution of trifluoroacetic acid (2.4 mL, 31.95 mmol, 15.0 eq.) and water 3/1 (0.8 mL) was added at 0 °C to a solution of the disaccharide **63** (1.75 g, 2.13 mmol, 1.0 eq.) in DCM (36 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 4h. Then, sodium acetate (5.24 g, 63.90 mmol, 30.0 eq.) was added. After 10 min, DCM and water were added and the reaction was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The solution was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **166** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 96/4) as a white solid (1.31 g, 84 %).

$R_f$ : 0.44 (DCM/MeOH 96/4)

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ /MeOD 1/3)  $\delta$  (ppm):** 7.50-7.42 (m, 3H,  $H_{ar}$ ), 7.41-7.38 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 7.17-7.08 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.07-7.01 (m, 1H,  $H_{ar}$ ), 4.93 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA), 4.80 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA), 4.72-4.62 (m, 2H,  $CH_{2a-Ar}$ , H-2 GlcA), 4.48-4.39 (m, 2H,  $CH_{2b-Ar}$ , H-1 GlcA), 4.29-4.22 (m, 1H, H-1 GalN), 3.92-3.80 (m, 2H, H-2 GalN, H-5 GlcA), 3.77 (d,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 1H, H-4 GalN), 3.62-3.44 (m, 3H, H-3 GalN, H-6 GalN), 3.41 (s, 3H,  $CO_2CH_3$ ), 3.23 (td,  $^3J_{5-6a} = ^3J_{5-6b} = 6.0$  Hz, 1H, H-5 GalN), 1.70, 1.68, 1.67 (s, 9H,  $OC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ /MeOD 1/3)  $\delta$  (ppm):** 169.9, 169.6, 167.5 (C=O, C-6 GalN), 134.2, 132.9, 132.7 ( $C_{qar}$ ), 127.7, 127.3, 127.1, 126.2, 125.6, 125.5, 125.2 ( $CH_{ar}$ ), 100.7 (C-1 GlcA), 98.7 (C-1 GalN), 78.7 (C-3 GalN), 74.5 (C-5 GalN), 71.7 (C-3 GlcA), 71.3 (C-5 GlcA), 70.6 (C-2 GlcA), 69.9 ( $CH_{2-Ar}$ ), 69.1 (C-4 GlcA), 67.4 (C-4 GalN), 60.9 (C-6 GalN), 52.3 ( $CO_2CH_3$ ), 51.7 (C-2 GalN), 19.6, 19.5, 19.4 ( $OC(O)CH_3$ ).

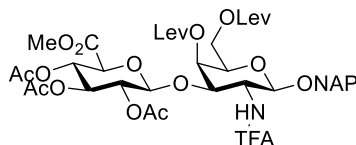
**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ /MeOD 1/3)  $\delta$  (ppm):** -76.08 ( $CF_3$ )

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{32}H_{36}F_3NNaO_{15}$   $[M+Na]^+$ : 754.192925, measured: 754.193071

**$[\alpha]_D^{20}$**  = -27.3732 (MeOH, c 0.92)



**2-Naphtylmethyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-deoxy-4,6-di-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranoside **167****



Chemical Formula:  $C_{42}H_{48}F_3NO_{19}$   
Molecular Weight: 927.83

DMAP (9.0 mg, 74  $\mu$ mol, 0.3 eq.), DCC (154 mg, 744  $\mu$ mol, 3.0 eq.) and levulinic acid (86 mg, 744  $\mu$ mol, 3.0 eq.) were added to a solution of the disaccharide **166** (181 mg, 248  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in DCM (4.5 mL, 0.06 M). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3h30 then filtered. The filtrate was washed once with water, once with a solution of aqueous saturated  $NaHCO_3$  and once with water. The combined organic layers were dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **167** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/Acetone 9/1) as a white solid (206 mg, 90 %).

R<sub>f</sub>: 0.35 (DCM/Acetone 9/1)

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.82-7.75 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.72 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.48-7.42 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.36 (d,  $^3J_{H-H} = 8.5$  Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.22 (d,  $^3J_{NH-2} = 8.0$  Hz, 1H, NH), 5.35 (bs, 1H, H-4 GalN), 5.18-5.09 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.99 (d,  $^2J_{H-H} = 12.0$  Hz, 1H, CH<sub>2a</sub>-Ar), 4.91 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.77-4.68 (m, 2H, CH<sub>2b</sub>-Ar, H-1 GalN), 4.65 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.25 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.5$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H), 4.19-4.07 (m, 2H, H-6 GalN), 4.02-3.91 (m, 2H, H-2 GalN, H-5 GlcA), 3.80 (dd,  $^3J_{5-6a} = ^3J_{5-6b} = 6.5$  Hz, 1H, H-5 GalN), 3.67 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.81-2.46 (m, 8H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.14-2.07 (m, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.96, 1.95, 1.93 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

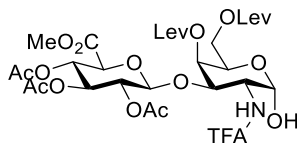
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 207.1, 207.0 (C=O (Lev)), 172.4, 171.5, 170.1, 169.6, 169.4, 166.8 (C=O, C-6 GalN), 157.5 (q,  $^2J_{C-F} = 37$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 134.2, 133.2, 133.1 (C<sub>qar</sub>), 128.4, 127.9, 127.7, 127.1, 126.4, 126.2, 125.8 (CH<sub>ar</sub>), 115.8 (q,  $^1J_{C-F} = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 99.9 (C-1 GlcA), 98.3 (C-1 GalN), 74.4 (C-3 GalN), 72.3 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 71.2 (C-5 GalN), 70.8 (CH<sub>2</sub>-Ar), 70.5 (C-2 GlcA), 69.1 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 68.5 (C-4 GalN), 62.2 (C-6 GalN), 53.5 (C-2 GalN), 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.1, 37.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.73, 29.70 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.0, 27.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.5, 20.44, 20.36 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.56 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{42}H_{48}F_3NNaO_{19}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 950.266484, measured: 950.266731

**$[\alpha]_D^{20}$**  = -20.5219 ( $CHCl_3$ , c 0.99).

**O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-2-deoxy-4,6-di-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranose 168**



Chemical Formula: C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>19</sub>

Molecular Weight: 787.64

DDQ (844 mg, 3.72 mmol, 3.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **167** (1.15 g, 1.24 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DCM/MeOH 9/1 (12.4 mL, 0.1 M) under argon. The reaction was stand protected from light and stirred at room temperature overnight. After addition of DCM, the organic layer was washed 3 times with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (toluene/acetone 6/4) to give the desired product **168** as an orange solid (749 mg, 77 %).

R<sub>f</sub>: 0.48 (toluene/acetone 6/4)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 9.0 Hz, 1H, NH), 5.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.28 (bs, 1H, H-1 GalN), 5.19-5.10 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.98 (bs, 1H, OH), 4.92 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.45-4.31 (m, 2H, H-2 GalN, H-5 GalN), 4.22-4.11 (m, 2H, H-3 GalN, H-6a GalN), 4.06-3.93 (m, 2H, H-5 GlcA, H-6b GalN), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.91-2.44 (m, 8H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.97, 1.96 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

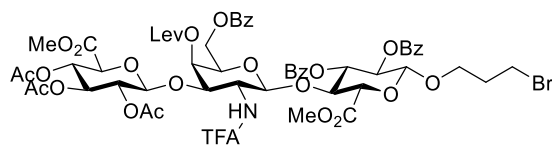
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 208.8, 207.3 (C=O (Lev)), 172.4, 171.9, 170.1, 169.7, 169.5, 167.0 (C=O, C-6 GlcA), 157.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 115.9 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 100.3 (C-1 GlcA), 91.5 (C-1 GalN), 72.6 (C-3 GalN), 72.3 (C-5 GlcA), 72.0 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 70.3 (C-2 GlcA), 69.6 (C-4 GalN), 69.3 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 66.8 (C-5 GalN), 62.8 (C-6 GalN), 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 49.9 (C-2 GalN), 38.23, 38.20 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.9, 29.8 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.1, 28.0 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.6, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.57 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>NNaO<sub>19</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 810.203883, measured: 810.204109

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +27.9493 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.02)

**3-Bromopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(6-O-benzoyl-2-deoxy-4-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 170a**



Chemical Formula: C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>26</sub>  
Molecular Weight: 1313,00

A mix of acceptor **147** (150 mg, 280 μmol, 1.0 eq.), donor **164** (393 mg, 420 μmol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (2.8 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1 M in toluene (110 μL, 110 μmol, 0.25 eq.) was added and it was stirred for 1 h at room temperature. Et<sub>3</sub>N (44 μL, 315 μmol, 0.75 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15 min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA 5/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired trisaccharide **170a** as a white solid (118 mg, 32 % of β).

R<sub>f</sub>: 0.21 (PE/EA 5/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.06-7.89 (m, 6H, H<sub>ar</sub>), 7.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.43 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.39-7.31 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.63 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.31 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.22-5.08 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.88 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 2H, H-3 GalN), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.03-3.92 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.82 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.82-3.72 (m, 1H, H-5 GalN), 3.73-3.63 (m, 2H, H-2 GalN, O-CH<sub>2</sub>b), 3.60-3.53 (m, 4H, H-6a GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-6b GalN), 3.36-3.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.72-2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.49-2.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.10-2.00 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.96 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.6 (C=O (Lev)), 171.2, 170.1, 169.6, 169.4, 168.8, 166.8, 165.9, 165.7, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.4, 133.3, 129.8, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.72, 129.67, 129.1 (C<sub>qar</sub>), 128.6, 128.5, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.8 (C-1 GlcA1), 100.1 (C-1 GlcA2), 99.1 (C-1 GalN), 76.2 (C-4 GlcA1), 74.4 (C-3 GalN), 74.0 (C-5 GlcA1), 72.3, 72.2, 72.1 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA1, C-3 GlcA2), 71.4, 71.3 (C-2 GlcA1, C-5 GalN), 70.6 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-4 GlcA2), 68.5 (C-4 GalN), 67.9 (O-CH<sub>2</sub>), 61.2 (C-6 GalN), 53.7 (C-2 GalN), 53.3, 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 32.4 (-CH<sub>2</sub>-), 30.0 (CH<sub>2</sub>-Br), 29.8 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 27.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.6, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

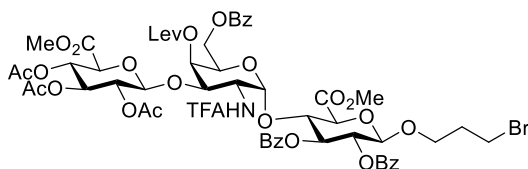
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.82 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>BrF<sub>3</sub>NNaO<sub>26</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1334.250949, measured: 1334.251026

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +16.1111 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.02)

Side products from previous reaction:

**3-Bromopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(6-O-benzoyl-2-deoxy-4-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate 170b**



Chemical Formula:  $C_{57}H_{61}BrF_3NO_{26}$   
Molecular Weight: 1313,00

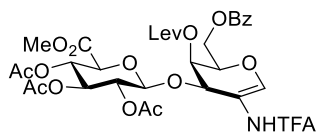
**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.92-7.85 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.54-7.44 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.40-7.31 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.57 (d,  $^3J_{\text{NH}-2} = 9.0$  Hz, 1H, NH), 5.70 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.50 (d,  $^3J_{4-3} = 3.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.36 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.26-5.12 (m, 3H, H-1 GalN, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.97 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.78 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.62 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.55 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.45-4.36 (m, 2H, H-2 GalN, H-6a GalN), 4.28 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.22 (dd,  $^3J_{6b-5} = 7.0$  Hz,  $^3J_{6b-6a} = 11.0$  Hz, 1H, H-6b GalN), 4.14-4.03 (m, 3H, H-3 GalN, H-5 GalN, H-5 GlcA2), 4.01-3.94 (m, 1H, O- $\text{CH}_2\text{a}$ ), 3.81 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.71 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.69-3.61 (m, 1H, O- $\text{CH}_2\text{b}$ ), 3.37-3.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Br}$ ), 2.85-2.51 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  (Lev)), 2.13-1.92 (m, 14H,  $-\text{CH}_2-$ ,  $\text{CH}_3$  (Lev),  $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 206.4 ( $\text{C}=\text{O}$  (Lev)), 171.5, 170.1, 169.8, 169.5, 168.2, 166.9, 166.1, 166.0, 165.2 ( $\text{C}=\text{O}$ , C-6 GlcA), 157.3 (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 38$  Hz,  $\text{NHC}(\text{O})\text{CF}_3$ ), 134.0, 133.5, 133.3, 130.0, 129.84 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.82, 129.0 ( $\text{C}_{\text{qar}}$ ), 128.7, 128.6 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 128.2 ( $\text{C}_{\text{qar}}$ ), 115.6 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 288$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 101.4 (C-1 GlcA1), 99.6 (C-1 GlcA2), 97.0 (C-1 GalN), 74.6 (C-5 GlcA1), 74.4 (C-3 GlcA1), 73.7 (C-4 GlcA1), 72.6 (C-5 GlcA2), 72.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.6 (C-2 GlcA1), 71.1 (C-3 GalN or C-5 GalN), 69.7 (C-2 GlcA2), 69.3 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.9 (C-4 GalN), 68.6 (C-3 GalN or C-5 GalN), 67.8 (O- $\text{CH}_2$ ), 61.9 (C-6 GalN), 53.2, 53.1 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 49.0 (C-2 GalN), 38.2 ( $\text{CH}_2$  (Lev)), 32.4 ( $-\text{CH}_2-$ ), 30.0 ( $\text{CH}_2\text{-Br}$ ), 29.7 ( $\text{CH}_3$  (Lev)), 28.1 ( $\text{CH}_2$  (Lev)), 20.7, 20.6, 20.4 ( $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ ).

**$^{19}\text{F}$  NMR (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.66 ( $\text{CF}_3$ )

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +12.6000$  ( $\text{CHCl}_3$ , c 1.00)

***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-6-*O*-benzoyl-1,2-deoxy-4-*O*-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-D-galactal 172**



Chemical Formula:  $C_{33}H_{36}F_3NO_{17}$   
Molecular Weight: 775,64

**$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 8.08-8.01 (m, 2H,  $H_{\text{ar}}$ ), 7.74 (s, 1H, NH), 7.60-7.50 (m, 1H,  $H_{\text{ar}}$ ), 7.49-7.41 (m, 2H,  $H_{\text{ar}}$ ), 7.27 (s, 1H, H-1 GalN), 5.55 (d,  $^3J_{4-3} = 4.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.26-5.04 (m, 3H, H-2 GlcA, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 4.81 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.77 (d,  $^3J_{3-4} = 4.5$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.48-4.37 (m, 3H, H-5 GalN, H-6 GalN), 4.05 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.71 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.81-2.58 (m, 4H,  $\text{CH}_2$  (Lev)), 2.16 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (Lev)), 2.02, 1.99 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ ).

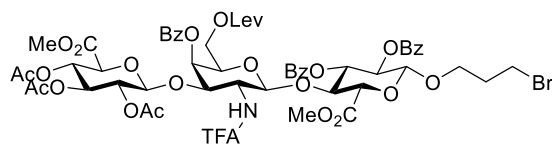
**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 206.6 ( $\text{C}=\text{O}$  (Lev)), 171.8, 170.0, 169.4, 166.5, 166.2 ( $\text{C}=\text{O}$ , C-6 GlcA), 142.0 (C-1 GalN), 133.4, 130.0 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.7 ( $\text{Cq}_{\text{ar}}$ ), 128.5 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 109.3 (C-2 GalN), 99.8 (C-1 GlcA), 73.9 (C-5 GalN), 72.8 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA), 70.4 (C-2 GlcA), 70.0 (C-3 GalN), 69.1 (C-4 GlcA), 64.3 (C-4 GalN), 62.7 (C-6 GalN), 53.1 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 38.0 ( $\text{CH}_2$  (Lev)), 29.8 ( $\text{CH}_3$  (Lev)), 28.1 ( $\text{CH}_2$  (Lev)), 20.6, 20.5 ( $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ ).

**$^{19}\text{F}$  NMR (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.35 ( $\text{CF}_3$ )

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{NNaO}_{17}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ : 798.182754, measured: 798.183741

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = +7.5300 ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c$  1.00)

**3-Bromopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4-O-benzoyl-2-deoxy-6-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 171**



Chemical Formula: C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>BrF<sub>3</sub>NO<sub>26</sub>  
Molecular Weight: 1313,00

A mix of acceptor **147** (188 mg, 350 μmol, 1.0 eq.), donor **165** (492 mg, 525 μmol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (3.5 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30 min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (79 μL, 79 μmol, 0.15 eq.) was added and it was stirred for 1h min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (38 μL, 237 μmol, 0.45 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (toluene/EA 5/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired trisaccharide **171** as a white solid (165 mg, 36 % of β).

R<sub>f</sub>: 0.21 (toluene/EA 5/5 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.46 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.34 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.46-5.35 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-4 GalN), 5.15-5.03 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.43-4.30 (m, 2H, H-3 GalN, H-4 GlcA1), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.07-3.91 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.88-3.77 (m, 4H, H-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.79-3.60 (m, 5H, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.39-3.24 (m, 3H, H-6a GalN, CH<sub>2</sub>-Br), 3.14 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H), 2.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.20 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.11-1.98 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.96, 1.94, 1.91 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

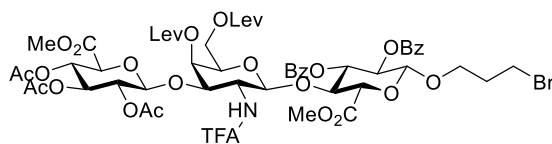
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.8 (C=O (Lev)), 172.1, 170.0, 169.4, 169.3, 168.6, 166.8, 165.6, 165.2, 165.0 (C=O, C-6 GlcA), 157.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.4, 133.3, 133.10, 130.06, 129.8, 129.6 (CH<sub>ar</sub>), 129.4, 129.2, 129.1 (Cq<sub>ar</sub>), 128.49, 128.46, 128.3, 128.1 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.8 (C-1 GlcA1), 99.6 (C-1 GlcA2), 98.9 (C-1 GalN), 76.0 (C-3 GalN or C-4 GlcA1), 74.3, 74.1 (C-3 GalN or C-4 GlcA1, C-5 GlcA1), 72.41, 72.36, 72.2 (C-3 GlcA1, C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2, C-5 GlcA2), 71.4, 71.3 (C-2 GlcA1, C-5 GalN), 70.6 (C-2 GlcA2), 69.0 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.5 (C-4 GalN), 67.9 (C-6 GalN), 61.3 (O-CH<sub>2</sub>), 54.2 (C-2 GalN), 53.2, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 32.4 (-CH<sub>2</sub>-), 30.0 (CH<sub>2</sub>-Br), 29.9 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.53, 20.50, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.84 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>BrF<sub>3</sub>NNaO<sub>26</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1334.250949, measured: 1334.251029

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 39.1134 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.99)

**3-Bromopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-deoxy-4,6-di-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 169a**



Chemical Formula:  $C_{55}H_{63}BrF_3NO_{27}$   
Molecular Weight: 1306.99

A mix of acceptor **147** (86 mg, 161  $\mu$ mol, 1.0 eq.), donor **163** (224 mg, 241  $\mu$ mol, 1.5 eq.) and molecular sieves (4 Å) in anhydrous DCM (1.6 mL, 0.1 M) under argon was stirred for 30min at room temperature. Then, TMSOTf 1M in toluene (36  $\mu$ L, 36  $\mu$ mol, 0.15 eq.) was added and it was stirred for 30min at room temperature. Et<sub>3</sub>N (15  $\mu$ L, 108  $\mu$ mol, 0.45 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 15min, then filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (DCM/acetone 92/8 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N) to give the desired trisaccharide **169a** as a white solid (74 mg, 35 %).

R<sub>f</sub>: 0.21 (DCM/acetone 92/8 + 0.5 % Et<sub>3</sub>N)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.92 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.44 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.40-7.32 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.60 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.37 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.16-5.09 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.86 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 8.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.17 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.04-3.91 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.83 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.74-3.60 (m, 6H, H-2 GalN, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.43-3.23 (m, 4H, H-6 GalN, CH<sub>2</sub>-Br), 2.74 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.65-2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.42-2.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.19, 2.16 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 2.08-1.93 (m, 11H, -CH<sub>2</sub>-, OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.8, 206.5 (C=O (Lev)), 172.1, 171.2, 170.1, 169.6, 169.4, 168.9, 166.8, 165.6, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.5, 133.4, 129.9, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.7, 129.2 (Cq<sub>ar</sub>), 128.5, 128.4 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 289 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 100.0 (C-1 GlcA2), 99.0 (C-1 GalN), 75.9 (C-4 GlcA1), 74.3 (C-3 GalN), 74.0 (C-5 GlcA1), 72.3, 72.1 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA2, C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.4 (C-2 GlcA1), 71.1 (C-5 GalN), 70.6 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.2 (C-4 GalN), 67.9 (O-CH<sub>2</sub>), 61.1 (C-6 GalN), 53.7 (C-2 GalN), 53.3, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 32.4 (-CH<sub>2</sub>-), 30.0 (CH<sub>2</sub>-Br), 29.9, 29.8 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.0, 27.8 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.6, 20.54, 20.47 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

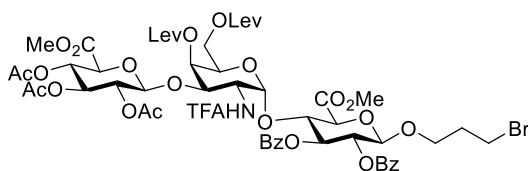
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.85 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>55</sub>H<sub>63</sub>BrF<sub>3</sub>NNaO<sub>27</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1328.261513, measured: 1328.260501

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +15.6317 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.93)

Side products from previous reaction:

**3-Bromopropyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2-deoxy-4,6-di-*O*-levulinoyl-2-trifluoroacetamido- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-methyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate 169b**



Chemical Formula:  $C_{55}H_{63}BrF_3NO_{27}$

Molecular Weight: 1306.99

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.88 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 7.50 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.35 (q,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 4H,  $H_{ar}$ ), 6.48 (d,  $^3J_{NH-2} = 10.0$  Hz, 1H, NH), 5.69 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.41 (dd,  $^3J_{2-1} = 7.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.34 (d,  $^3J_{4-3} = 3.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.21-5.09 (m, 3H, H-1 GalN, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.92 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.82 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.60 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.54 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.35 (ddd,  $^3J_{2-1} = 3.5$  Hz,  $^3J_{2-NH} = ^3J_{2-3} = 10.0$  Hz, 1H, H-2 GalN), 4.28 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.17-4.09 (m, 1H, H-6a GalN), 4.06-3.97 (H-3 GalN, H-5 GlcA2, H-6b GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.93 (dd,  $^3J_{5-6a} = ^3J_{5-6b} = 6.5$  Hz, 1H, H-5 GalN), 3.86 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.78 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.71-3.63 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.39-3.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-Br), 2.87-2.46 (m, 8H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.20, 2.13 (s, 6H, (CH<sub>3</sub> (Lev))), 2.08-2.14 (m, 5H, -CH<sub>2</sub>-, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.98, 1.95 (s, 6H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

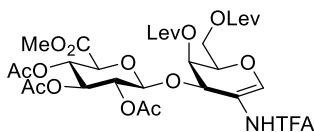
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 206.8, 206.5 (C=O (Lev)), 172.3, 171.5, 170.0, 169.7, 169.4, 168.2, 166.8, 166.0, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.2 (q,  $^2J_{C-F} = 38$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 134.0, 133.5, 130.0, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.0 (Cq<sub>ar</sub>), 128.7, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 128.2 (Cq<sub>ar</sub>), 115.6 (q,  $^1J_{C-F} = 288$  Hz, CF<sub>3</sub>), 101.4 (C-1 GlcA1), 99.7 (C-1 GlcA2), 97.0 (C-1 GalN), 74.6, 74.5 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA1), 73.8 (C-4 GlcA1), 72.5 (C-3 GalN or C-5 GlcA2), 72.0 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.5 (C-2 GlcA1), 71.3 (C-3 GalN or C-5 GlcA2), 69.9 (C-2 GlcA2), 69.3 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.8 (C-4 GalN), 68.6 (C-5 GalN), 67.8 (O-CH<sub>2</sub>), 61.7 (C-6 GalN), 53.2, 53.1 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.9 (C-2 GalN), 38.2, 38.0 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 32.4 (-CH<sub>2</sub>-), 30.0 (CH<sub>2</sub>-Br), 29.9, 29.7 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 28.0, 27.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.62, 20.58, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.68 (CF<sub>3</sub>)

**$[\alpha]_D^{20} = +41.5222$  ( $CHCl_3$ , c 1.00)**



***O*-(Methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-1,2-deoxy-4,6-di-*O*-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-D-galactal 173**



Chemical Formula:  $C_{31}H_{38}F_3NO_{18}$   
Molecular Weight: 769,63

**$^1\text{H}$  NMR (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.76 (s, 1H, NH), 7.23 (s, 1H, H-1 GalN), 5.43 (d,  $^3J_{4-3} = 4.5$  Hz, 1H, H-4 GalN), 5.25-5.09 (m, 2H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 5.04 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA), 4.78 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA), 4.72 (d,  $^3J_{3-4} = 4.5$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.29-4.23 (m, 1H, H-5 GalN), 4.23-4.07 (m, 2H, H-6 GalN), 4.02 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA), 3.72 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.84-2.44 (m, 8H,  $\text{CH}_2$  (Lev)), 2.16-2.14 (s, 6H,  $\text{CH}_3$  (Lev)), 2.01, 1.98 (s, 9H,  $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ ).

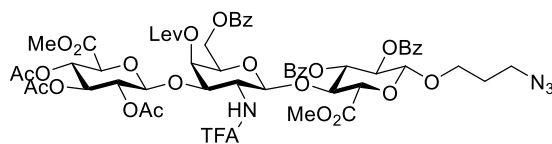
**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** 206.7, 206.5 ( $\text{C}=\text{O}$  (Lev)), 172.33, 171.76, 169.96, 169.86, 169.34, 166.48 ( $\text{C}=\text{O}$ , C-6 GlcA), 155.5 (q,  $^2J_{\text{C-F}} = 38$  Hz,  $\text{NHC}(\text{O})\text{CF}_3$ ), 142.0 (C-1 GalN), 115.7 (q,  $^1J_{\text{C-F}} = 288$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 109.3 (C-2 GalN), 99.7 (C-1 GlcA), 73.7 (C-5 GalN), 72.7 (C-5 GlcA), 72.1 (C-3 GlcA), 70.5 (C-2 GlcA), 70.0 (C-3 GalN), 69.1 (C-4 GlcA), 64.0 (C-4 GalN), 62.3 (C-6 GalN), 53.0 ( $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 38.0 ( $\text{CH}_2$  (Lev)), 29.8, 29.7 ( $\text{CH}_3$  (Lev)), 28.0, 27.9 ( $\text{CH}_2$  (Lev)), 20.56, 20.52, 20.49 ( $\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$ ).

**$^{19}\text{F}$  NMR (376.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.37 ( $\text{CF}_3$ )

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{F}_3\text{NNaO}_{18}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ : 792.193319, measured: 792.192510

**$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$**  = +17.6555 ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c$  1.00)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(6-O-benzoyl-2-deoxy-4-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 174**



Chemical Formula: C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>26</sub>  
Molecular Weight: 1275,11

Sodium azide (102 mg, 1.57 mmol, 10.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **170** (206 mg, 0.16 mmol, 1.0 eq.) in acetone/H<sub>2</sub>O 2/1 (2.6 mL, 0.06 M). The reaction was stirred at 70 °C overnight. Then, the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub>. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (PE/EA 5/5) to give the desired product **174** as a white solid (175 mg, 88 %).

R<sub>f</sub>: 0.23 (PE/EA 5/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.52-7.41 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.37 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.75-6.66 (bs, 1H, NH), 5.64 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.38 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.32 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.23-5.09 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.95-4.82 (m, 2H, H-1 GalN, H-2 GlcA2), 4.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.20 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.06-3.91 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.83 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80-3.65 (m, 2H, H-2 GalN, H-5 GalN), 3.65-3.46 (m, 6H, H-6 GalN, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.29-3.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.81-2.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.53-2.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.98, 1.97 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.85-1.69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

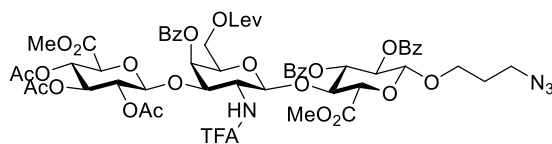
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.4 (C=O (Lev)), 171.2, 170.1, 169.5, 169.4, 168.9, 166.8, 165.9, 165.6, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.5, 133.4, 129.90, 129.86, 129.84 (CH<sub>ar</sub>), 129.78, 129.72, 129.2 (Cq<sub>ar</sub>), 128.7, 128.6, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 115.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 289 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 100.2 (C-1 GlcA2), 99.1 (C-1 GalN), 76.3 (C-4 GlcA1), 74.5 (C-3 GalN), 74.1 (C-5 GlcA1), 72.3 (C-5 GlcA2), 72.2, 72.1 (C-3 GlcA1, C-3 GlcA2), 71.5, 71.3 (C-2 GlcA1, C-5 GalN), 70.7 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-4 GlcA2), 68.4 (C-4 GalN), 67.1 (O-CH<sub>2</sub>), 61.2 (C-6 GalN), 53.8 (C-2 GalN), 53.3, 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.9 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 27.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.7, 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.85 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>26</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1297.340496, measured: 1297.341012

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +14.5753 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.04)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4-O-benzoyl-2-deoxy-6-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 175**



Chemical Formula: C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>26</sub>  
Molecular Weight: 1275.11

Sodium azide (307 mg, 4.73 mmol, 15.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **171** (414 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq.) in acetone/H<sub>2</sub>O 2/1 (5.3 mL, 0.06 M). The reaction was stirred at room temperature overnight. Then, the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed 3 times with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure to give the desired product **175** as a white solid (375 mg, 94 %).

R<sub>f</sub>: 0.24 (toluene/EA 5/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.59 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.48 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.36 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.47-5.36 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-4 GalN), 5.15-5.05 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.42-4.32 (m, 2H, H-3 GalN, H-4 GlcA1), 4.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.02-3.91 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.88-3.77 (m, 4H, H-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.77-3.71 (m, 1H, H-5 GalN), 3.70-3.57 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 6.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.30-3.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6b-5</sub> = 7.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6b-6a</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6b GalN), 2.78 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.97, 1.95, 1.92 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.85-1.70 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

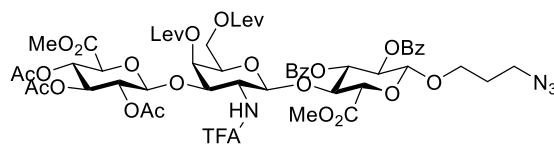
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.7 (C=O (Lev)), 172.2, 170.1, 169.5, 169.4, 168.6, 166.8, 165.6, 165.2, 165.0 (C=O, C-6 GlcA), 133.5, 133.3, 133.2, 130.1, 129.8, 129.7 (CH<sub>ar</sub>), 129.5, 129.2 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5, 128.1 (CH<sub>ar</sub>), 101.7 (C-1 GlcA1), 99.7 (C-1 GlcA2), 98.9 (C-1 GalN), 76.0 (C-4 GlcA1), 74.4 (C-3 GalN), 74.2 (C-5 GlcA1), 72.5, 72.4, 72.3 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA2, C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.45, 71.42 (C-2 GlcA1, C-5 GalN), 70.7 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.6 (C-4 GalN), 67.1 (O-CH<sub>2</sub>), 61.3 (C-6 GalN), 54.3 (C-2 GalN), 53.3, 52.9 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.0 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 38.2 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.9 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 29.1 (-CH<sub>2</sub>-), 28.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.59, 20.56, 20.49 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.86 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>57</sub>H<sub>61</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>26</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1297.341833, measured: 1297.342014

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 1.1806 (CHCl<sub>3</sub>, *c* 1.1)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-deoxy-4,6-di-O-levulinoyl-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 176**



Chemical Formula:  $C_{55}H_{63}F_3N_4O_{27}$   
Molecular Weight: 1269,11

Sodium azide (311 mg, 4.79 mmol, 15.0 eq.) was added to a solution of bromo derivative **169** (416 mg, 0.32 mmol, 1.0 eq.) in acetone/H<sub>2</sub>O 2/1 (5.3 mL, 0.06 M). The reaction was stirred at room temperature for 22 h. Then, the reaction mixture was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were washed twice with water. The solution was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **176** was obtained as a brown solid (367 mg, 91 %) and was used without further purification.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 7.94 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.50 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 6.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, NH), 5.61 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.42-5.34 (m, 1H, H-2 GlcA1), 5.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.16-5.10 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.20-4.09 (m, 2H, H-3 GalN, H-5 GlcA1), 4.00-3.92 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.84 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.76-3.56 (m, 6H, H-2 GalN, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.45-3.33 (m, 1H, H-6a GalN), 3.31-3.17 (m, 3H, H-6b GalN, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.79-2.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.71-2.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.52 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.44-2.26 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (Lev)), 2.20, 2.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub> (Lev)), 1.98, 1.97 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.84-1.69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

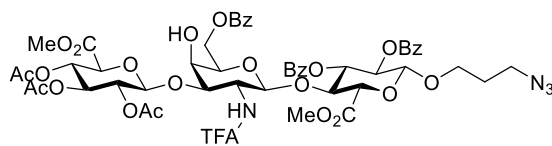
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 206.8, 206.5 (C=O (Lev)), 172.2, 171.2, 170.1, 169.6, 169.4, 169.0, 166.8, 165.6, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 133.5, 133.4, 129.9 (CH<sub>ar</sub>), 129.7, 129.2 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5 (CH<sub>ar</sub>), 101.6 (C-1 GlcA1), 100.0 (C-1 GlcA2), 99.0 (C-1 GalN), 76.0 (C-4 GlcA1), 74.4, 74.1 (C-3 GalN, C-5 GlcA1), 72.34, 72.29 (C-3 GlcA1, C-5 GlcA2), 72.2 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 71.5 (C-2 GlcA1), 71.1 (C-5 GalN), 70.6 (C-2 GlcA1), 69.1 (C-3 GlcA2 or C-4 GlcA2), 68.2 (C-4 GalN), 67.1 (O-CH<sub>2</sub>), 61.1 (C-6 GalN), 53.7, 53.3, 53.0 (C-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 38.1 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 29.90, 29.86 (CH<sub>3</sub> (Lev)), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 28.1, 27.9 (CH<sub>2</sub> (Lev)), 20.7, 20.6, 20.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.87 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>55</sub>H<sub>63</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>27</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1291.352398, measured: 1291.351193

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = +49.4524 (CHCl<sub>3</sub>, c 1.05)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(6-O-benzoyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate **177****



Chemical Formula: C<sub>52</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>24</sub>  
Molecular Weight: 1177.01

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 5.2 mL) was added to a solution of the disaccharide **174** (322 mg, 0.25 mmol) in pyridine (3.2 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **177** was obtained after purification by silica gel column chromatography (toluene/EA 4/6) as a white solid (228 mg, 77 %).

R<sub>f</sub>: 0.47 (toluene/EA 4/6)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 8.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.98-7.92 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.59 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.55-7.42 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.37 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 6.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>NH-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, NH), 5.62 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = 7.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.24-5.11 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.97 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.87 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.32 (dd, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.03-3.92 (m, 4H, H-4 GalN, H-5 GlcA2, H-6a GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.81 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.73-3.51 (m, 7H, H-2 GalN, H-5 GalN, H-6b GalN, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.35-3.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>OH-4</sub> = 3.0 Hz, 1H, OH), 2.00, 1.98 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.83-1.67 (m, 2H, OC(O)CH<sub>3</sub>).

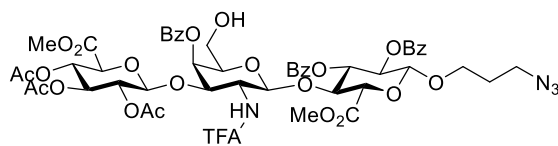
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 170.1, 169.6, 169.5, 168.7, 167.0, 166.2, 165.9, 165.33, 165.29 (C=O, C-6 GlcA), 157.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.5, 133.4, 133.3, 130.0, 129.9, 129.8 (CH<sub>ar</sub>), 129.3, 129.2 (Cq<sub>ar</sub>), 128.7, 128.6, 128.3 (CH<sub>ar</sub>), 115.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 289 Hz, CF<sub>3</sub>), 101.6 (C-1 GlcA1), 100.9 (C-1 GlcA2), 98.7 (C-1 GalN), 78.1 (C-3 GalN), 76.0 (C-4 GlcA1), 74.2 (C-5 GlcA1), 72.4 (C-3 GlcA1), 72.2 (C-5 GalN), 72.1, 72.0 (C-3 GlcA2, C-5 GlcA2), 71.5 (C-2 GlcA1), 71.1 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-4 GlcA2), 67.5 (C-4 GalN), 67.1 (O-CH<sub>2</sub>), 62.5 (C-6 GalN), 53.7 (C-2 GalN), 53.2, 53.0 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.0 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.0 (-CH<sub>2</sub>-), 20.62, 20.56, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -75.75 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>52</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>24</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1199.305054, measured: 1199.307591

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 23.67 (CHCl<sub>3</sub>, c 0.83)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4-O-benzoyl-2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 178**



Chemical Formula:  $C_{52}H_{55}F_3N_4O_{24}$   
Molecular Weight: 1177.01

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 6.1 mL) was added to a solution of the disaccharide **175** (375 mg, 0.29 mmol) in pyridine (3.8 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of  $NaHCO_3$  and once with water. The organic layer was dried over  $MgSO_4$ , filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **178** was obtained after purification by silica gel column chromatography (toluene/EA 4/6) as a white solid (265 mg, 73 %).

R<sub>f</sub>: 0.32 (toluene/EA 4/6)

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 7.97 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.91 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.66 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.61 (d,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.57-7.45 (m, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.34 (t,  $^3J_{H-H} = 8.0$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.25 (t,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.94-6.86 (m, 3H, NH, H<sub>ar</sub>), 5.58 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.46-5.36 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-4 GalN), 5.17-5.02 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.94 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.84 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.76 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.69 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GlcA2), 4.43 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.0$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.33 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.15 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.03-3.92 (m, 2H, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>a), 3.89-3.79 (m, 4H, H-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.58 (m, 4H, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.57-3.50 (m, 1H, H-5 GalN), 3.31-3.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.92-2.77 (m, 2H, H-6a GalN, OH), 2.36-2.28 (m, 1H, H-6b GalN), 1.96, 1.93 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.85-1.67 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

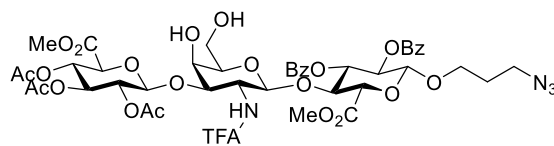
**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** 170.1, 169.4, 169.3, 168.5, 167.1, 166.6, 165.5, 165.2 (C=O, C-6 GlcA), 157.3 (q,  $^2J_{C-F} = 37$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.8, 133.4, 133.0, 130.3, 129.7 (CH<sub>ar</sub>), 129.5 (CH<sub>ar</sub>, Cq<sub>ar</sub>), 129.08, 129.06 (Cq<sub>ar</sub>), 128.6, 128.5, 128.1 (CH<sub>ar</sub>), 115.7 (q,  $^1J_{C-F} = 289$  Hz, CF<sub>3</sub>), 101.6 (C-1 GlcA1), 100.5 (C-1 GlcA2), 98.8 (C-1 GalN), 75.9 (C-4 GlcA1), 75.5 (C-3 GalN), 74.1 (C-5 GlcA1), 73.6 (C-5 GalN), 72.5 (C-3 GlcA1), 72.4 (C-5 GlcA2), 72.1 (C-3 GlcA2), 71.2 (C-2 GlcA1), 70.8 (C-2 GlcA2), 69.4 (C-4 GalN), 69.0 (C-4 GlcA2), 67.0 (O-CH<sub>2</sub>), 59.1 (C-6 GalN), 54.5 (C-2 GalN), 53.2, 52.8 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.8 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.9 (-CH<sub>2</sub>-), 20.51, 20.47, 20.3 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**$^{19}F$  NMR (376.5 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm):** -75.75 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$ : calculated for  $C_{52}H_{55}F_3N_4NaO_{24}$  [M+Na]<sup>+</sup>: 1199.305054, measured: 1199.304076

**$[\alpha]_D^{20}$**  = + 14.4444 ( $CHCl_3$ ,  $c$  1.08)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-deoxy-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate 179**



Chemical Formula: C<sub>45</sub>H<sub>51</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>23</sub>  
Molecular Weight: 1072,90

A solution of hydrazine hydrate/acetic acid/pyridine (1/8/12, 6.1 mL) was added to a solution of the disaccharide **176** (367 mg, 0.29 mmol) in pyridine (3.7 mL) under argon at room temperature. The reaction was stirred for 8 min and then diluted with DCM. The reaction mixture was washed once with water, once with a saturated aqueous solution of NaHCO<sub>3</sub> and once with water. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. The desired product **179** was obtained after purification by silica gel column chromatography (DCM/acetone 85/15 to 7/3) as a white solid (140 mg, 45 %).

R<sub>f</sub>: 0.36 (DCM/acetone 85/15)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD/CDCl<sub>3</sub> 1/1) δ (ppm):** 7.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.58-7.51 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.41 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.63 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA2), 5.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA2), 4.96 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-2 GlcA2), 4.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 7.5 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.76-4.67 (m, 2H, H-1 GalN, H-1 GlcA2), 4.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA1), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>5-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-5 GlcA2), 4.02-3.94 (m, 2H, H-3 GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 3.86-3.77 (m, 4H, H-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.71 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.60 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.32-3.19 (m, 3H, H-5 GalN, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.18-3.06 (m, 2H, H-6 GalN), 2.02, 2.01 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.83-1.71 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD/CDCl<sub>3</sub> 1/1) δ (ppm):** 170.0, 169.9, 169.6, 168.2, 167.4, 165.7, 165.3 (C=O, C-6 GlcA), 157.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 133.1, 132.9, 129.4, 129.3 (CH<sub>ar</sub>), 129.2, 128.6 (Cq<sub>ar</sub>), 128.1, 127.9 (CH<sub>ar</sub>), 115.6 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 100.7 (C-1 GlcA1), 100.5 (C-1 GlcA2), 99.3 (C-1 GalN), 77.8 (C-3 GalN), 75.3 (C-4 GlcA1), 74.2 (C-5 GalN), 73.8 (C-5 GlcA1), 72.7 (C-3 GlcA1), 71.8 (C-3 GlcA2), 71.5, 71.4 (C-2 GlcA1, C-5 GlcA2), 70.6 (C-2 GlcA2), 69.1 (C-4 GlcA2), 66.59, 66.57 (C-4 GalN, O-CH<sub>2</sub>), 59.5 (C-6 GalN), 52.4, 52.3 (C-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 47.4 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.4 (-CH<sub>2</sub>-), 19.8, 19.7, 19.5 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

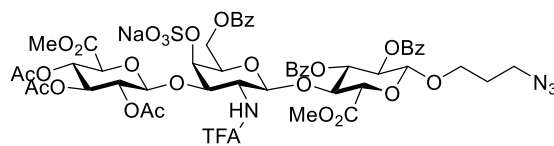
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** -76.10 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>45</sub>H<sub>51</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>23</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1095.278839, measured: 1095.278626

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +4.6617 (MeOH/CHCl<sub>3</sub> 1/1, *c* 1.01)



**3-Azidopropyl *O*-(methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(sodium-6-*O*-benzoyl-2-deoxy-4-*O*-sulfonato-2-trifluoroacetamido- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-methyl 2,3-di-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-glucopyranosyluronate **180****



Chemical Formula:  $C_{52}H_{54}F_3N_4NaO_{27}S$   
Molecular Weight: 1279,05

Sulfur trioxide trimethylamine complex (210 mg, 1.51 mmol, 20.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **177** (89 mg, 75.3  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in dry DMF (0.8 mL, 0.1 M). The reaction mixture was stirred for 48h at 70 °C. The reaction was cooled down to room temperature, then quenched by addition of methanol (10.0 mL) and stirred 30min. The crude mixture was purified by Sephadex LH-20 (DCM/MeOH 1/1) then by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5). Finally, the residue was purified by Sephadex SP C25[Na<sup>+</sup>] (DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O 9/5/1) to give the desired trisaccharide **180** as a sodium salt (67 mg, 70 %).

R<sub>f</sub>: 0.16 (DCM/MeOH 95/5)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm):** 8.10 (d,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 8.03-7.91 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.68-7.50 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.46 (t,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 3H, H<sub>ar</sub>), 7.31 (t,  $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 5.74 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.36 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.33-5.24 (m, 2H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 5.17 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 1H, H-2 GlcA2), 5.01 (d,  $^3J_{1-2} = 7.5$  Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.92-4.84 (m, 2H, H-1 GlcA2, H-4 GalN), 4.80 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 1H, H-1 GalN), 4.46-4.32 (m, 3H, H-4 GlcA1, H-5 GlcA1, H-6a GalN), 4.27 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 1H, H-5 GlcA2), 4.17 (dd,  $^3J_{3-4} = 3.0$  Hz,  $^3J_{3-2} = 11.0$  Hz, 1H, H-3 GalN), 4.06 (dd,  $^3J_{2-1} = 8.0$  Hz,  $^3J_{2-3} = 11.0$  Hz, 1H, H-2 GalN), 3.97 (dt,  $^3J_{H-H} = 6.0$  Hz,  $^3J_{H-H} = 11.0$  Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.86 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.81-3.63 (m, 6H, H-5 GalN, H-6b GalN, O-CH<sub>2</sub>b, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.32-3.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.04, 2.01 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.83-1.73 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm):** 171.7, 171.5, 171.2, 169.8, 169.6, 167.4, 167.3, 166.7 (C=O, C-6 GlcA), 159.2 (q,  $^2J_{C-F} = 37$  Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 134.6, 134.19, 134.16 (CH<sub>ar</sub>), 131.4, 131.0 (Cq<sub>ar</sub>), 130.73, 130.71, 130.6 (CH<sub>ar</sub>), 130.4 (Cq<sub>ar</sub>), 129.60, 129.58, 129.54, 129.4 (CH<sub>ar</sub>), 117.4 (q,  $^1J_{C-F} = 289$  Hz, CF<sub>3</sub>), 102.1, 102.0 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 101.4 (C-1 GalN), 77.5 (C-4 GlcA1), 76.4 (C-3 GalN), 75.7 (C-4 GalN), 75.2 (C-5 GlcA1), 74.0 (C-3 GlcA1), 73.7, 73.6 (C-3 GlcA2, C-5 GalN), 73.2, 73.0 (C-2 GlcA1, C-5 GlcA2), 72.4 (C-2 GlcA2), 70.6 (C-4 GlcA2), 68.0 (O-CH<sub>2</sub>), 64.4 (C-6 GalN), 53.9 (C-2 GalN), 53.6, 53.5 (CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 29.9 (-CH<sub>2</sub>-), 20.6, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

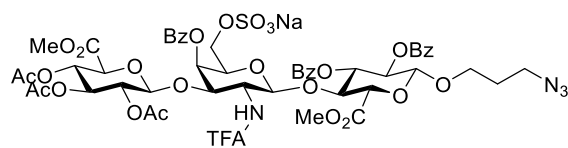
**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, MeOD)  $\delta$  (ppm):** -76.52 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for  $C_{52}H_{55}F_3N_4NaO_{27}S$  [M+H]<sup>+</sup>: 1279.261869, measured: 1279.262358

**$[\alpha]_D^{20}$**  = + 5.6270 (MeOH, *c* 1.05)



**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(4-O-benzoyl-2-deoxy-6-O-sulfonato-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate **181****



Chemical Formula: C<sub>52</sub>H<sub>54</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>27</sub>S  
Molecular Weight: 1279,05

Sulfur trioxide trimethylamine complex (125 mg, 0.90 mmol, 4.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **178** (265 mg, 0.23 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (1.5 mL, 0.2 M). The reaction mixture was stirred at 40 °C overnight. The reaction was cooled down to room temperature, then quenched by addition of methanol (3.0 mL) and stirred 30 min. The crude mixture was purified by Sephadex LH-20 (DCM/MeOH 1/1) then by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5 up to 9/1). Finally, the residue was purified by Sephadex SP C25[Na<sup>+</sup>] (DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O 9/5/1) to give the desired trisaccharide **181** as a sodium salt (226 mg, 78 %).

R<sub>f</sub>: 0.30 (DCM/MeOH 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1/1) δ (ppm):** 7.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.87-7.79 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.52 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.47-7.34 (m, 4H, H<sub>ar</sub>), 7.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>ar</sub>), 7.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 5.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.5 Hz, 1H, H-4 GalN), 5.36 (dd, <sup>3</sup>J<sub>2-1</sub> = <sup>3</sup>J<sub>2-3</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-2 GlcA1), 5.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-3 GlcA2), 5.04 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.5 Hz, 1H, H-4 GlcA2), 4.86 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.82-4.71 (m, 3H, H-1 GlcA2, H-1 GalN, H-2 GlcA2), 4.47 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.25-4.15 (m, 2H, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2), 4.03-3.94 (m, 3H, H-2 GalN, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.92 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.72 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.69-3.60 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.51 (dd, <sup>3</sup>J<sub>6a-5</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>6a-6b</sub> = 11.5 Hz, 1H, H-6a GalN), 3.32-3.23 (m, 2H, H-6b GalN, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.00, 1.93, 1.92 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.83-1.68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

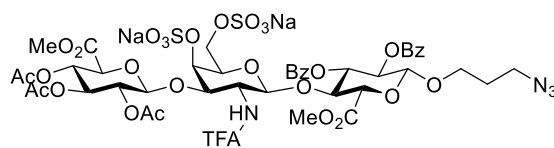
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1/1) δ (ppm):** 170.7, 170.6, 170.4, 169.0, 168.8, 166.54, 166.50, 166.0 (C=O, C-6 GlcA), 158.5 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 134.0, 133.8, 133.8, 130.4, 130.2, 130.1 (CH<sub>ar</sub>), 129.9, 129.7, 129.6 (Cq<sub>ar</sub>), 129.0, 128.8, 128.6 (CH<sub>ar</sub>), 116.6 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 288 Hz, CF<sub>3</sub>), 102.0 (C-1 GlcA1), 101.0, 100.3 (C-1 GlcA2, C-1 GalN), 76.1 (C-3 GalN), 75.9 (C-4 GlcA1), 74.7 (C-5 GlcA1 or C-5 GlcA2), 73.1 (C-3 GlcA1), 72.7 (C-3 GlcA2), 72.4 (C-5 GlcA1 or C-5 GlcA2), 72.2, 72.1 (C-2 GlcA1, C-5 GalN), 71.4 (C-2 GlcA2), 70.0 (C-4 GlcA2), 69.7 (C-4 GalN), 67.5 (O-CH<sub>2</sub>), 65.3 (C-6 GalN), 53.7, 53.5, 53.4 (C-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.3 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.3 (-CH<sub>2</sub>-), 20.53, 20.51, 20.3 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>/MeOD 1/1) δ (ppm):** -76.16 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>52</sub>H<sub>55</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>27</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 1279.261869, measured: 1279.260942

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 2.4175 (MeOH, c 1.01)

**3-Azidopropyl O-(methyl 2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(2-deoxy-4,6-di-O-sulfonato-2-trifluoroacetamido-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-methyl 2,3-di-O-benzoyl-β-D-glucopyranosyluronate **182****



Chemical Formula:  $C_{45}H_{49}F_3N_4Na_2O_{29}S_2$   
Molecular Weight: 1276,98

Sulfur trioxide trimethylamine complex (365 mg, 2.62 mmol, 20.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **179** (140 mg, 131  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in dry DMF (1.5 mL, 0.09 M). The reaction mixture was stirred for 24h at 70 °C. The reaction was cooled down to room temperature, then quenched by addition of methanol (2.0 mL) and stirred 30 min. The crude mixture was purified by Sephadex LH-20 (DCM/MeOH 1/1) then by silica gel column chromatography (DCM/MeOH 95/5). Finally, the residue was purified by Sephadex SP C25[Na<sup>+</sup>] (DCM/MeOH/H<sub>2</sub>O 9/5/1) to give the desired trisaccharide **182** as a sodium salt as a white solid (116 mg, 69 %).

R<sub>f</sub>: 0.24 (DCM/MeOH 9/1)

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD) δ (ppm):** 7.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 8.0 Hz, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.59-7.49 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.43 (q, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 7.5 Hz, 4H, H<sub>ar</sub>), 5.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 5.34-5.24 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-3 GlcA2), 5.22-5.09 (m, 2H, H-2 GlcA2, H-4 GlcA2), 4.95 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GlcA1), 4.91-4.84 (m, 1H, H-1 GlcA2), 4.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = 3.0 Hz, 1H, H-4 GalN), 4.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.0 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.49 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA1), 4.33-4.24 (m, 2H, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2), 4.13 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 3.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = 11.0 Hz, 1H, H-3 GalN), 4.04-3.85 (m, 6H, H-2 GalN, H-6a GalN, O-CH<sub>2</sub>a, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.80-3.68 (m, 5H, H-5 GalN, H-6b GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.68-3.60 (m, 1H, O-CH<sub>2</sub>b), 3.25-3.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2.01, 2.00, 1.97 (s, 9H, OC(O)CH<sub>3</sub>), 1.78-1.69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

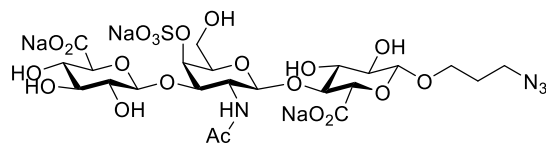
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, MeOD) δ (ppm):** 172.1, 171.4, 171.3, 170.5, 169.9, 167.6, 166.7 (C=O, C-6 GlcA), 159.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 37 Hz, NHC(O)CF<sub>3</sub>), 134.6, 134.3, 130.9 (CH<sub>ar</sub>), 130.8 (Cq<sub>ar</sub>), 130.6 (CH<sub>ar</sub>), 130.5 (Cq<sub>ar</sub>), 129.60, 129.56 (CH<sub>ar</sub>), 117.4 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 285 Hz, CF<sub>3</sub>), 102.3 (C-1 GlcA1), 102.1 (C-1 GlcA2), 101.3 (C-1 GalN), 76.95, 76.86 (C-3 GalN, C-4 GlcA1), 75.7 (C-4 GalN), 75.3 (C-5 GlcA1 or C-5 GlcA2), 74.0 (C-3 GlcA1), 73.7 (C-5 GalN), 73.3, 73.2 (C-2 GlcA1, C-3 GlcA2), 72.9 (C-5 GlcA1 or C-5 GlcA2), 72.2 (C-2 GlcA2), 70.8 (C-4 GlcA2), 68.0 (O-CH<sub>2</sub>), 66.8 (C-6 GalN), 53.94, 53.87 (C-2 GalN, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 48.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 29.9 (-CH<sub>2</sub>-), 20.6, 20.5, 20.4 (OC(O)CH<sub>3</sub>).

**<sup>19</sup>F NMR (376.5 MHz, MeOD) δ (ppm):** -76.39 (CF<sub>3</sub>)

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>45</sub>H<sub>49</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>29</sub>S<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1299.156357, measured: 1299.157041

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -20.9513 (MeOH, c 1.06)

**3-Azidopropyl O-(sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(sodium-2-acetamido-2-deoxy-4-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-sodium β-D-glucopyranosyluronate 135**



Chemical Formula:  $C_{23}H_{33}N_4Na_3O_{21}S$   
Molecular Weight: 802,55

A cold solution of LiOH 1M (290  $\mu$ L, 360  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and  $H_2O_2$  30% (150  $\mu$ L) was added at 0 °C to a solution of trisaccharide **180** (37 mg, 29  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (0.96 mL, 0.03 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  3/1 (0.96 mL, 0.03 M). NaOH 4M was added (650  $\mu$ L, 2.60 mmol, 90.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

Et<sub>3</sub>N (52  $\mu$ L, 375  $\mu$ mol, 13.0 eq.) and Ac<sub>2</sub>O (55  $\mu$ L, 578  $\mu$ mol, 20.0 eq.) were added to a solution of the previous crude trisaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (1.4 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02 M was added until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4-Na<sup>+</sup> to give the deprotected trisaccharide **135** as a sodium salt (18 mg, 76 % over 3 steps).

R<sub>f</sub>: 0.27 (EA/MeOH/ $H_2O$  4/2/1)

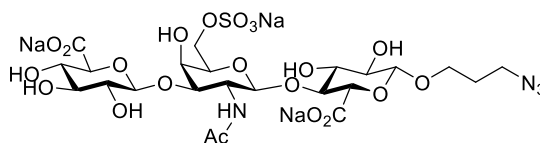
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm):** 4.83-4.76 (m, 1H, H-4 GalN), 4.61-4.57 (m, 1H, H-1 GalN), 4.50-4.45 (m, 2H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2), 4.08-4.04 (m, 2H, H-2 GalN, H-3 GalN), 3.98 (dt, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 6.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 10.5 Hz, 1H, O-CH<sub>2</sub>a), 3.87-3.59 (m, 8H, H-3 GlcA1, H-4 GlcA1, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, H-5 GalN, H-6 GalN, O-CH<sub>2</sub>b), 3.54 (dd, <sup>3</sup>J<sub>4-3</sub> = <sup>3</sup>J<sub>4-5</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-4 GlcA2), 3.51-3.43 (m, 3H, H-3 GlcA2, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.32-3.24 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 2.06 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.95-1.87 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  (ppm):** 175.9, 175.0, 174.2 (C=O, C-6 GlcA), 103.4, 102.4 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 100.9 (C-1 GalN), 80.2 (C-4 GlcA1), 76.5, 76.3 (C-4 GalN, C-5 GlcA1, C-5 GlcA2), 75.14, 75.08 (C-3 GlcA2, C-3 GalN), 74.7 (C-5 GalN), 74.0 (C-3 GlcA1), 72.7, 72.6 (C-2 GlcA1, C-2 GlcA2), 71.9 (C-4 GlcA2), 67.5 (O-CH<sub>2</sub>), 61.1 (C-6 GalN), 51.7 (C-2 GalN), 47.9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.2 (-CH<sub>2</sub>-), 22.6 (NHC(O)CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>23</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>21</sub>S [M-H]<sup>-</sup>: 735.151999, measured: 735.151013

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>** = + 57.9778 ( $H_2O$ , *c* 1.00)

**3-Azidopropyl O-(sodium β-D-glucopyranosyluronate)-(1→3)-(sodium-2-acetamido-2-deoxy-6-O-sulfonato-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-sodium β-D-glucopyranosyluronate 136**



Chemical Formula:  $C_{23}H_{33}N_4Na_3O_{21}S$   
Molecular Weight: 802,55

A cold solution of LiOH 1M (1.8 mL, 1.76 mmol, 10.0 eq.) and  $H_2O_2$  30 % (0.9 mL) was added at 0 °C to a solution of trisaccharide **181** (225 mg, 176  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (8.8 mL, 0.02 M). The reaction mixture was stirred from 0 °C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  4/1 (8.8 mL, 0.02 M). NaOH 4M was added (4.0 mL, 15.84 mmol, 90.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

Et<sub>3</sub>N (0.32 mL, 2.29 mmol, 13.0 eq.) and Ac<sub>2</sub>O (0.33 mL, 3.52 mmol, 20.0 eq.) were added to a solution of the previous crude trisaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (8.8 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 5h. Amberlite IR 120[H<sup>+</sup>] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was washed 3 times with EtOH then NaOH 0.02 M was added until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4-Na<sup>+</sup> to give the deprotected trisaccharide **136** as a sodium salt (18 mg, 13 % over 3 steps).

R<sub>f</sub>: 0.25 (EA/MeOH/ $H_2O$  4/2/1)

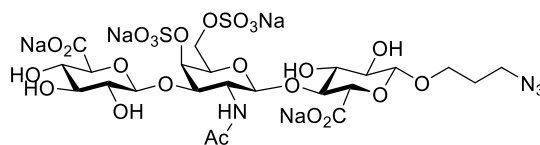
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm):** 4.57 (d, <sup>3</sup>J<sub>1-2</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-1 GalN), 4.55-4.48 (m, 2H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2), 4.27-4.21 (m, 3H, H-4 GalN, H-6 GalN), 4.08-3.91 (m, 3H, H-2 GalN, H-5 GalN, O-CH<sub>2</sub>a), 3.89-3.72 (m, 5H, H-3 GalN, H-4 GlcA1, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, O-CH<sub>2</sub>b), 3.65 (dd, <sup>3</sup>J<sub>3-2</sub> = <sup>3</sup>J<sub>3-4</sub> = 9.0 Hz, 1H, H-3 GlcA1), 3.57-3.42 (m, 4H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 3.40-3.30 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 2.03 (s, 3H, NHC(O)CH<sub>3</sub>), 1.95-1.86 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm):** 175.2, 174.9, 173.0 (C=O, C-6 GlcA), 104.1, 102.4 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 101.5 (C-1 GalN), 81.3 (C-4 GlcA1), 79.9 (C-3 GalN), 75.7, 75.7 (C-5 GlcA1, C-5 GlcA2), 75.2 (C-3 GlcA2), 74.1 (C-3 GlcA1), 72.6, 72.5 (C-2 GlcA1, C-2 GlcA2, C-5 GalN), 71.7 (C-4 GlcA2), 67.5, 67.4 (C-4 GalN, C-6 GalN, O-CH<sub>2</sub>), 50.9 (C-2 GalN), 47.8 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 28.2 (-CH<sub>2</sub>-), 22.5 (NHC(O)CH<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** *m/z*: calculated for  $C_{23}H_{33}N_4Na_3O_{21}S$  [M-Na]<sup>-</sup>: 779.115887, measured: 779.118822

*Insufficient product for  $[\alpha]_D^{20}$*

**3-Azidopropyl O-(sodium  $\beta$ -D-glucopyranosyluronate)-(1 $\rightarrow$ 3)-(sodium-2-acetamido-2-deoxy-4,6-O-sulfonato- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-sodium  $\beta$ -D-glucopyranosyluronate **134****



Chemical Formula:  $C_{23}H_{32}N_4Na_4O_{24}S_2$   
Molecular Weight: 904,59

A cold solution of LiOH 1M (910  $\mu$ L, 907  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and  $H_2O_2$  30 % (460  $\mu$ L) was added at 0  $^{\circ}$ C to a solution of trisaccharide **182** (116 mg, 91  $\mu$ mol, 1.0 eq.) in THF/ $H_2O$  3/1 (4.5 mL, 0.02 M). The reaction mixture was stirred from 0  $^{\circ}$ C to room temperature for 24h, then diluted with MeOH/ $H_2O$  3/1 (4.5 mL, 0.02 M). NaOH 4M was added (1.7 mL, 6.80 mmol, 75.0 eq.) and the reaction mixture was stirred over weekend at room temperature. Then the solution was neutralised at pH = 7 with Amberlite IR 120[H $^{+}$ ] resin, filtered, evaporated under reduced pressure to give the crude compound which was used without any further purification.

Et $_3$ N (0.16 mL, 1.18 mmol, 13.0 eq.) and Ac $_2$ O (0.17 mL, 1.81 mmol, 20.0 eq.) were added to a solution of the previous crude trisaccharide in MeOH/ $H_2O$  4/1 (11.6 mL, 0.02 M) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4h. Amberlite IR 120[H $^{+}$ ] resin was added until pH = 3.0 and the mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. The residue was co-evaporated 3 times with  $H_2O$  then NaOH 0.02 M was added until pH = 11.0. This crude compound was purified by Sephadex LH-20 (100 %  $H_2O$ ) then eluted from a column of DOWEX 50WX4-Na $^{+}$  to give the deprotected trisaccharide **134** as a sodium salt (38 mg, 46 % over 3 steps).

R $_f$ : 0.22 (EA/MeOH/ $H_2O$  4/2/1)

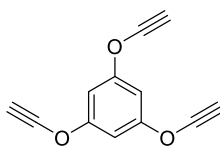
**$^1H$  NMR (400 MHz, D $_2$ O)  $\delta$  (ppm):** 4.86 (s, 1H, H-4 GalN), 4.66-4.60 (m, 1H, H-1 GalN), 4.54-4.47 (m, 2H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2), 4.35-4.21 (m, 2H, H-6 GalN), 4.17-4.07 (m, 3H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-5 GalN), 3.98 (dt,  $^3J_{H-H} = 6.5$  Hz,  $^3J_{H-H} = 12.0$  Hz, 1H, O-CH $_2$ a), 3.82-3.69 (m, 4H, H-4 GlcA1, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, O-CH $_2$ b), 3.66 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 7.0$  Hz, 1H, H-3 GlcA1), 3.56 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.0$  Hz, 1H, H-4 GlcA2), 3.52-3.42 (m, 3H, H-3 GlcA2, CH $_2$ -N $_3$ ), 3.42-3.32 (m, 2H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 2.05 (s, 3H, NHC(O)CH $_3$ ), 1.96-1.86 (m, 2H, -CH $_2$ -).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz, D $_2$ O)  $\delta$  (ppm):** 175.4, 175.0, 173.4 (C=O, C-6 GlcA), 103.4, 102.4 (C-1 GlcA1, C-1 GlcA2), 101.5 (C-1 GalN), 81.8 (C-4 GlcA1), 76.1, 76.0 (C-4 GalN, C-5 GlcA1, C-5 GlcA2), 75.1 (C-3 GlcA2), 74.9 (C-3 GalN), 74.2 (C-3 GlcA1), 72.5, 72.4 (C-2 GlcA1, C-2 GlcA2, C-5 GalN), 71.7 (C-4 GlcA2), 67.8 (C-6 GalN), 67.5 (O-CH $_2$ ), 51.5 (C-2 GalN), 47.9 (CH $_2$ -N $_3$ ), 28.2 (-CH $_2$ -), 22.6 (NHC(O)CH $_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{23}H_{33}N_4Na_2O_{24}S_2$  [M+H-2Na] $^{+}$ : 859.072702, measured: 859.071815

$[\alpha]_D^{20} = + 56.3222$  ( $H_2O$ , c 1.00)

### 1,3,5-tris(alkynyloxy)benzene **190**



Chemical Formula: C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

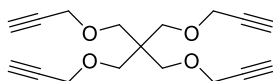
Molecular Weight: 198,18

Anhydrous potassium carbonate (4.65 g, 33.64 mmol, 4.0 eq.) was added to a solution of phloroglucinol **189** (1.06 g, 8.41 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (28 mL, 0.3 M) under argon. The reaction was heated at 50 °C for 1h. Propargyl bromide 80 % (2.5 mL, 33.64 mmol, 4.0 eq.) was added dropwise and the reaction was stirred at 65 °C for 36h. After cooling to room temperature, water was added and the mixture was filtered. The filtrate was extracted 3 times with DCM and the combined organic layers were washed 4 times with brine. The resulting layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel column chromatography (9/1 EP/Et<sub>2</sub>O), the desired product **190** was obtained as a white solid (862 mg, 43 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 6.26 (s, 3H, H<sub>ar</sub>), 4.64 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2.5 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>), 2.54 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2.5 Hz, 3H, CH<sub>alkyne</sub>).

Xie, J.; Deng, X.; Cao, Z.; Shen, Q.; Zhang, W.; Shi, W. Synthesis and Second-Order Nonlinear Optical Properties of Hyperbranched Polymers Containing Pendant Azobenzene Chromophores. *Polymer* **2007**, *48*, 5988–5993.

### Tetrapropargylpentaerythritol **192**



Chemical Formula: C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 288,34

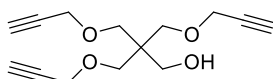
Potassium hydroxide (6.62 g, 118.08 mmol, 16.0 eq.) was added to a solution of pentaerythritol **191** (1.00 g, 7.38 mmol, 1.0 eq.) in dry DMF (12 mL, 0.6 M) under argon at 0 °C. After 30min, propargyl bromide 80 % (7.9 mL, 88.56 mmol, 12.0 eq.) was added dropwise and the reaction was stirred at 40 °C for 12h. After cooling to room temperature, water was added and the aqueous phase was extracted 3 times with Et<sub>2</sub>O. The combined organic layers were washed 3 times with water and 3 times with brine. The resulting layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated under reduced pressure. After purification by silica gel column chromatography (EA/cyclohexane 2/8), the desired product **192** was obtained as an orange-brown solid (638 mg, 30 %).

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm):** 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2.5 Hz, 8H, CH<sub>2</sub>-Alkyne), 3.53 (s, 8H, CH<sub>2</sub>), 2.40 (t, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2.5 Hz, 4H, CH<sub>alkyne</sub>).

Ladd, E.; Sheikhi, A.; Li, N.; van de Ven, T. G. M.; Kakkar, A. Design and Synthesis of Dendrimers with Facile Surface Group Functionalization, and an Evaluation of Their Bactericidal Efficacy. *Molecules* **2017**, 22 (6), 868.

### Side product from this reaction:

#### Trispropargylpentaerythritol **193**

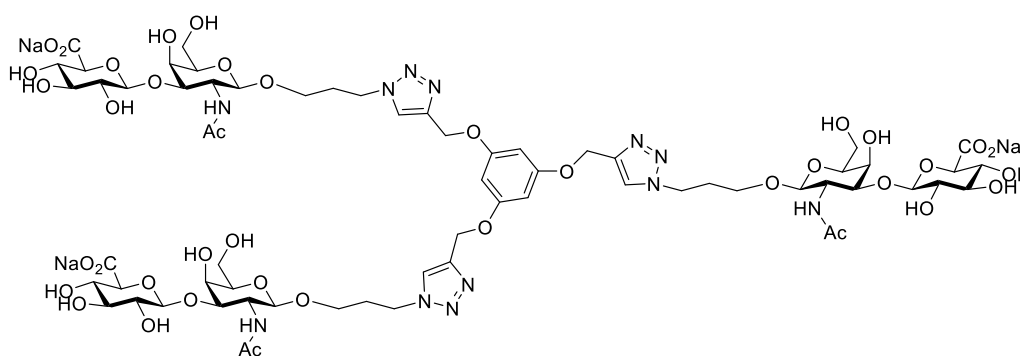


Chemical Formula: C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>  
Molecular Weight: 250,29

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) :** 4.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> = 2.5 Hz, 6H, CH<sub>2</sub>-Alkyne), 3.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-OH), 3.56 (s, 6H, CH<sub>2</sub>), 2.45-2.35 (m, 4H, CH<sub>alkyne</sub>, CH<sub>2</sub>-OH).

Mousavifar, L.; Parreira, P.; Taponard, A.; Graça, V. C. D.; Martins, M. C. L.; Roy, R. Validation of Selective Capture of Fimbriated Uropathogenic Escherichia Coli by a Label-Free Engineering Detection System Using Mannosylated Surfaces. *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, 5, 5877–5886.

### Glycocluster OS-P3 194



Chemical Formula:  $C_{66}H_{93}N_{12}Na_3O_{39}$   
Molecular Weight: 1747,48

A solution of the trivalent platform **190** in DMSO 0.033 M (300  $\mu$ L, 10.0  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **65** (21 mg, 41.8  $\mu$ mol, 4.2 eq.) in PBS 0.034 M (1.2 mL). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (300  $\mu$ L, 40.0  $\mu$ mol, 4.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (300  $\mu$ L, 80.0  $\mu$ mol, 8.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (300  $\mu$ L, 120.0  $\mu$ mol, 12.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **194** as a sodium salt (15.2 mg, 87 %).

**$^1H$  NMR (700 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 8.05 (s, 3H, H triazol), 6.41 (s, 3H,  $H_{ar}$ ), 5.23 (s, 6H, O- $CH_2$ -triazol), 4.54-4.47 (m, 9H, H-1 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 4.41 (d,  $^3J_{1-2} = 9.0$  Hz, 3H, H-1 GalN), 4.17 (bs, 3H, H-4 GalN), 4.02 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 3H, H-2 GalN), 3.88-3.82 (m, 6H, H-3 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.80-3.73 (m, 6H, H-6 GalN), 3.70 (d,  $^3J_{5-4} = 7.5$  Hz, 3H, H-5 GlcA), 3.66-3.61 (m, 3H, H-5 GalN), 3.52-3.44 (m, 9H, H-3 GlcA, H-4 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.35 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 7.5$  Hz, 3H, H-2 GlcA), 2.20-2.13 (m, 6H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.02 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

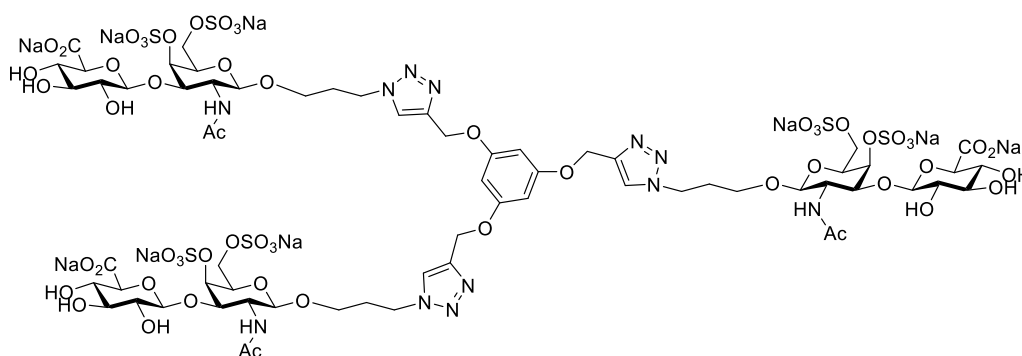
**$^{13}C$  NMR (176 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.5, 174.4 (C=O, C-6 GlcA), 159.0 ( $C_{qar}$ ), 142.7 (C triazol), 124.8 (CH triazol), 103.7 (C-1 GlcA), 101.1 (C-1 GalN), 96.5 ( $CH_{ar}$ ), 79.8 (C-3 GalN), 75.7 (C-5 GlcA), 74.9 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 74.4 (C-5 GalN), 72.3 (C-2 GlcA), 71.4 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 67.3 (C-4 GalN), 65.7 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 61.1 (O- $CH_2$ -triazol), 60.6 (C-6 GalN), 50.8 (C-2 GalN), 46.6 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 29.0 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{66}H_{94}N_{12}NaO_{39}$  [ $M-2Na+1H$ ] $^+$ : 1701.5644, measured: 1701.5635

$[\alpha]_D^{20} = + 2.9778$  ( $H_2O$ ,  $c$  0.50)



### Glycocluster 4,6S-P3 195



Chemical Formula:  $C_{66}H_{87}N_{12}Na_9O_{57}S_6$   
Molecular Weight: 2359,72

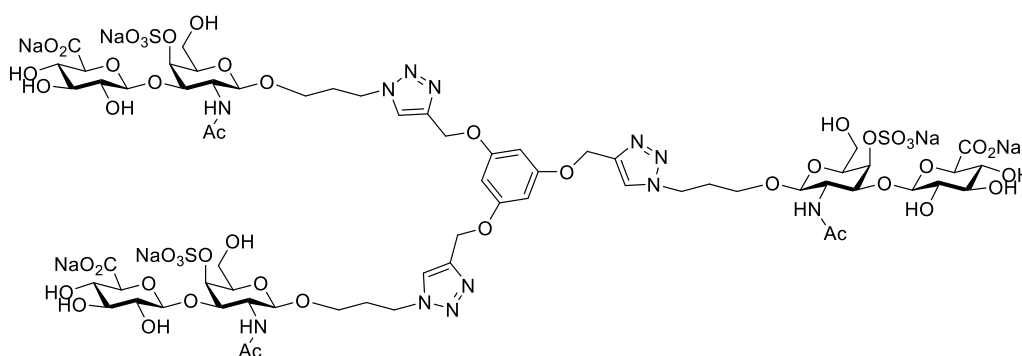
A solution of the trivalent platform **190** in DMSO 0.033 M (120  $\mu$ L, 4.0  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **52** (12 mg, 17.0  $\mu$ mol, 4.2 eq.) in PBS 0.034 M (500  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (130  $\mu$ L, 16.0  $\mu$ mol, 4.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (130  $\mu$ L, 32.0  $\mu$ mol, 8.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (120  $\mu$ L, 48.0  $\mu$ mol, 12.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **195** as a sodium salt (4.9 mg, 52 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 8.07 (s, 3H, H triazol), 6.42 (s, 3H,  $H_{ar}$ ), 5.25 (s, 6H, O- $CH_2$ -triazol), 4.87-4.82 (m, 3H, H-4 GalN), 4.57-4.46 (m, 12H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 4.34-4.28 (m, 3H, H-6a GalN), 4.21 (dd,  $^3J_{6a-5} = ^3J_{6a-6b} = 8.5$  Hz, 3H, H-6b GalN), 4.14-4.05 (m, 6H, H-2 GalN, H-3 GalN), 4.04-4.01 (m, 3H, H-5 GalN), 3.88-3.83 (m, 3H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.68 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 3H, H-5 GlcA), 3.57-3.51 (m, 6H, H-4 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.48 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 3H, H-3 GlcA), 3.37 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 3H, H-2 GlcA), 2.22-2.15 (m, 6H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.04 (s, 9H, NHC(O) $CH_3$ ).

**HRMS (ESI $^-$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{66}H_{92}N_{12}Na_2O_{57}S_6$  [ $M-7Na+5H$ ] $^{2-}$ : 1101.1400, measured: 1101.1373

Domínguez-Rodríguez, P.; Reina, J. J.; Gil-Caballero, S.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. Glycodendrimers as Chondroitin Sulfate Mimetics: Synthesis and Binding to Growth Factor Midkine. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (47), 11338–11345. <https://doi.org/10.1002/chem.201701890>.

### Glycocluster 4S-P3 196



Chemical Formula:  $C_{66}H_{90}N_{12}Na_6O_{48}S_3$   
Molecular Weight: 2053,60

A solution of the trivalent platform **190** in DMSO 0.033 M (160  $\mu$ L, 5.4  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **66** (13.7 mg, 22.7  $\mu$ mol, 4.2 eq.) in PBS 0.034 M (670  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (180  $\mu$ L, 21.6  $\mu$ mol, 4.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (180  $\mu$ L, 43.2  $\mu$ mol, 8.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (160  $\mu$ L, 64.8  $\mu$ mol, 12.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **196** as a sodium salt (9.5 mg, 86 %).

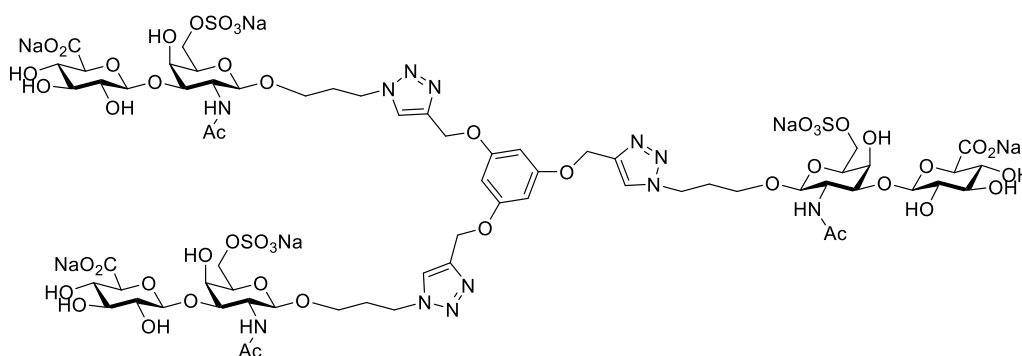
**$^1H$  NMR (700 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 8.06 (s, 3H, H triazol), 6.42 (s, 3H,  $H_{ar}$ ), 5.24 (s, 6H, O- $CH_2$ -triazol), 4.81-4.78 (m, 3H, H-4 GalN), 4.55-4.44 (m, 12H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 4.11-4.03 (m, 6H, H-2 GalN, H-3 GalN), 3.91-3.85 (m, 3H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.84-3.74 (m, 9H, H-5 GalN, H-6 GalN), 3.72 (dd,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 3H, H-5 GlcA), 3.56 (dd,  $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 9.5$  Hz, 3H, H-4 GlcA), 3.52-3.46 (m, 6H, H-3 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.38 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 7.5$  Hz, 3H, H-2 GlcA), 2.20-2.14 (m, 6H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.04 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (176 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 174.9, 174.3 (C=O, C-6 GlcA), 159.0 ( $C_{qar}$ ), 142.7 ( $C_q$  triazol), 124.9 (CH triazol), 103.0 (C-1 GlcA), 100.8 (C-1 GalN), 96.3 ( $CH_{ar}$ ), 76.0 (C-4 GalN), 75.7 (C-5 GlcA), 74.7 (C-3 GlcA), 74.6 (C-3 GalN), 74.0 (C-5 GalN), 72.1 (C-2 GlcA), 71.3 (C-4 GlcA), 66.0 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 61.1 (O- $CH_2$ -triazol), 60.6 (C-6 GalN), 51.4 (C-2 GalN), 46.6 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 29.0 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{66}H_{94}N_{12}O_{48}S_3$  [ $M-6Na+4H$ ] $^{2-}$ : 959.2228, measured: 959.2229

$[\alpha]_D^{20} = -11.5333$  ( $H_2O$ ,  $c$  0.50)

### Glycocluster 6S-P3 197



Chemical Formula:  $C_{66}H_{90}N_{12}Na_6O_{48}S_3$   
Molecular Weight: 2053,60

A solution of the trivalent platform **190** in DMSO 0.033 M (130  $\mu$ L, 4.3  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **67** (11 mg, 18.2  $\mu$ mol, 4.2 eq.) in PBS 0.034 M (540  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (140  $\mu$ L, 17.2  $\mu$ mol, 4.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (140  $\mu$ L, 34.4  $\mu$ mol, 8.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (130  $\mu$ L, 51.6  $\mu$ mol, 12.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **197** as a sodium salt (5.9 mg, 67 %).

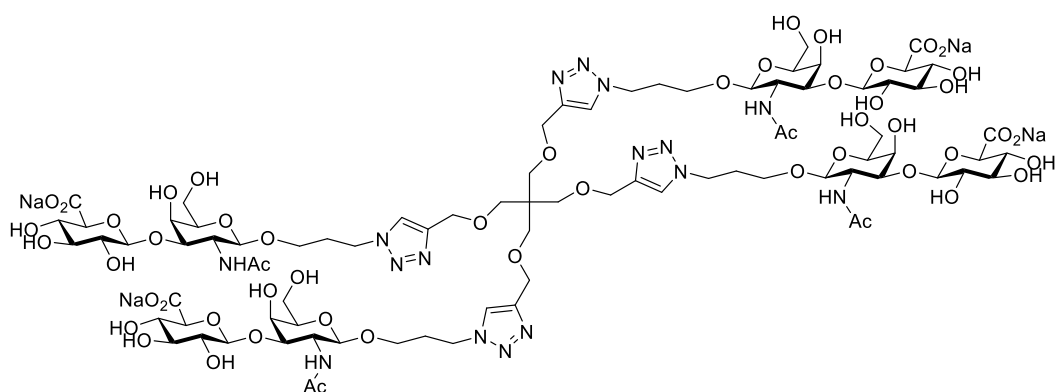
**$^1H$  NMR (700 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 8.06 (s, 3H, H triazol), 6.42 (s, 3H,  $H_{ar}$ ), 5.25 (s, 6H, O- $CH_2$ -triazol), 4.56-4.47 (m, 9H, H-1 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 4.42 (d,  $^3J_{1-2} = 8.5$  Hz, 3H, H-1 GalN), 4.27-4.17 (m, 9H, H-4 GalN, H-6 GalN), 4.03 (dd,  $^3J_{2-1} = 8.5$  Hz,  $^3J_{2-3} = 11.0$  Hz, 3H, H-2 GalN), 3.89-3.81 (m, 9H, H-3 GalN, H-5 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.75 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 3H, H-5 GlcA), 3.52-3.46 (m, 9H, H-3 GlcA, H-4 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.37-3.33 (m, 3H, H-2 GlcA), 2.21-2.14 (m, 6H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.03 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (176 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.3, 174.4 (C=O, C-6 GlcA), 159.0 ( $C_{qar}$ ), 142.7 ( $C_q$  triazol), 124.9 (CH triazol), 103.7 (C-1 GlcA), 101.0 (C-1 GalN), 96.6 ( $CH_{ar}$ ), 79.6 (C-3 GalN or C-5 GalN), 75.8 (C-5 GlcA), 74.9 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 72.3, 72.2 (C-2 GlcA C-3 GalN or C-5 GalN), 71.4 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 67.3, 67.1 (C-4 GalN, C-6 GalN), 66.0 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 61.1 (O- $CH_2$ -triazol), 50.7 (C-2 GalN), 46.6 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 29.1 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI $^+$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{66}H_{94}N_{12}O_{48}S_3$  [ $M-6Na+4H$ ] $^{2+}$ : 959.2228, measured: 959.2263

$[\alpha]_D^{20} = -2.6889$  ( $H_2O$ ,  $c$  0.50)

### Glycocluster OS-P4 198



Chemical Formula:  $C_{85}H_{128}N_{16}Na_4O_{52}$   
Molecular Weight: 2297.98

A solution of the tetravalent platform **192** in DMSO 0.033 M (120  $\mu$ L, 4.10  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **65** (12 mg, 22.90  $\mu$ mol, 5.6 eq.) in PBS 0.034 M (670  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (200  $\mu$ L, 24.60  $\mu$ mol, 6.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (200  $\mu$ L, 49.20  $\mu$ mol, 12.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (180  $\mu$ L, 73.80  $\mu$ mol, 18.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **198** as a sodium salt (4.6 mg, 49 %).

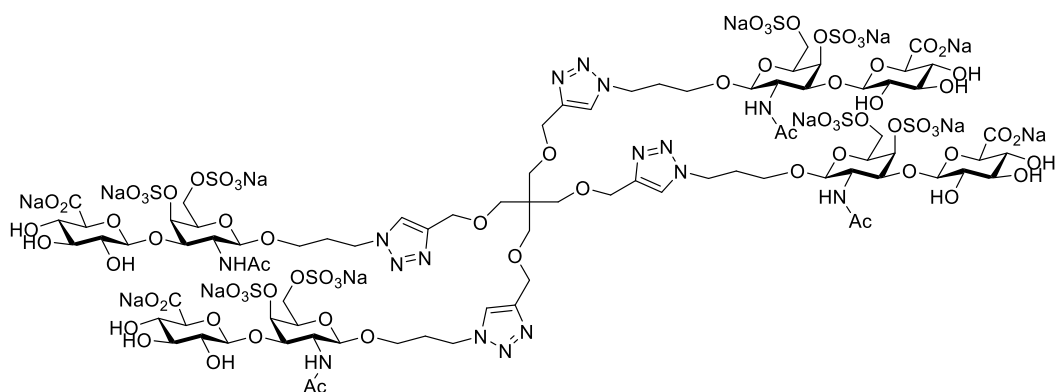
**$^1H$  NMR (700 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.93 (s, 4H, H triazol), 4.53-4.41 (m, 24H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ -triazol, O- $CH_2$ -triazol), 4.18 (bs,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 4H, H-4 GalN), 4.03 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 9.0$  Hz, 4H, H-2 GalN), 3.94-3.82 (m, 8H, H-3 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.80-3.75 (m, 8H, H-6 GalN), 3.72-3.65 (m, 8H, H-5 GlcA, H-5 GalN), 3.56-3.45 (m, 12H, H-3 GlcA, H-4 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.40-3.32 (m, 12H, H-2 GlcA,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 2.17-2.10 (m, 8H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.03 (s, 12H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (176 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.6, 174.3, 174.1 (C=O, C-6 GlcA), 143.7 (Cq triazol), 124.5 (CH triazol), 103.7 (C-1 GlcA), 101.0 (C-1 GalN), 79.8 (C-3 GalN), 75.7 (C-5 GlcA), 74.9 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 74.5 (C-5 GalN), 72.3 (C-2 GlcA), 71.4 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 67.3 (C-4 GalN,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 65.8 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 63.1 (O- $CH_2$ -triazol), 60.6 (C-6 GalN), 50.8 (C-2 GalN), 46.5 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 44.1 (Cq (pentaerythritol)), 29.1 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{85}H_{130}N_{16}O_{52}$  [ $M-4Na+2H$ ] $^{2-}$ : 1103.401548, measured: 1103.401885

Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$

### Glycocluster 4,6S-P4 199



Chemical Formula:  $C_{85}H_{120}N_{16}Na_{12}O_{76}S_8$   
Molecular Weight: 3114,29

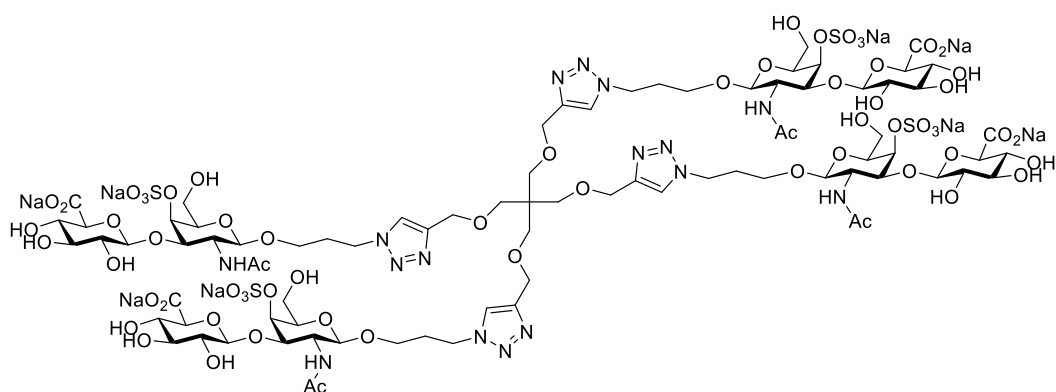
A solution of the tetravalent platform **192** in DMSO 0.0132 M (230  $\mu$ L, 3.00  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **52** (11 mg, 14.90  $\mu$ mol, 4.9 eq.) in PBS 0.14 M (110  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (110  $\mu$ L, 12.90  $\mu$ mol, 4.3 eq.), TBTA in DMSO 0.096 M (270  $\mu$ L, 25.80  $\mu$ mol, 8.6 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (90  $\mu$ L, 37.80  $\mu$ mol, 12.6 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **199** as a sodium salt (3.3 mg, 35 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.95 (s, 4H, H triazol), 4.85 (s, 4H, H-4 GalN), 4.59-4.41 (m, 24H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol, O- $CH_2$ -triazol), 4.35-4.28 (m, 4H, H-6a GalN), 4.21 (dd,  $^3J_{6a-5} = ^3J_{6a-6b} = 9.0$  Hz, 4H, H-6b GalN), 4.16-4.05 (m, 12H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-5 GalN), 3.97-3.86 (m, 4H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.69 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 4H, H-5 GlcA), 3.62-3.44 (m, 12H, H-3 GlcA, H-4 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.43-3.32 (m, 12H, H-2 GlcA,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 2.22-2.11 (m, 8H, O- $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.05 (s, 12H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{85}H_{129}N_{16}O_{76}S_8$   $[M-12Na+9H]^{3-}$ : 948.483446, measured: 948.483160

Domínguez-Rodríguez, P.; Reina, J. J.; Gil-Caballero, S.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. Glycodendrimers as Chondroitin Sulfate Mimetics: Synthesis and Binding to Growth Factor Midkine. *Chemistry – A European Journal* **2017**, 23 (47), 11338–11345.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201701890>.

## Glycocluster 4S-P4 200



Chemical Formula:  $C_{85}H_{124}N_{16}Na_8O_{64}S_4$   
Molecular Weight: 2706,13

A solution of the tetravalent platform **192** in DMSO 0.033 M (100  $\mu$ L, 3.40  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **66** (12 mg, 19.00  $\mu$ mol, 5.6 eq.) in PBS 0.034 M (560  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (140  $\mu$ L, 17.0  $\mu$ mol, 5.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (140  $\mu$ L, 34.0  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (130  $\mu$ L, 51.0  $\mu$ mol, 15.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **200** as a sodium salt (4.0 mg, 43 %).

**$^1H$  NMR (700 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.94 (s, 4H, H triazol), 4.83-4.78 (m, 4H, H-4 GalN), 4.57-4.40 (m, 24H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol, O- $CH_2$ -triazol), 4.10-4.03 (m, 8H, H-2 GalN, H-3 GalN), 3.93-3.88 (m, 4H, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol a), 3.85-3.76 (m, 12H, H-5 GalN, H-6 GalN), 3.67 (d,  $^3J_{5-4} = 10.0$  Hz, 4H, H-5 GlcA), 3.58-3.52 (m, 8H, H-4 GlcA, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol b), 3.48 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 9.0$  Hz, 4H, H-3 GlcA), 3.40-3.35 (m, 12H, H-2 GlcA,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 2.18-2.11 (m, 8H, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 2.03 (s, 12H,  $NHC(O)CH_3$ ).

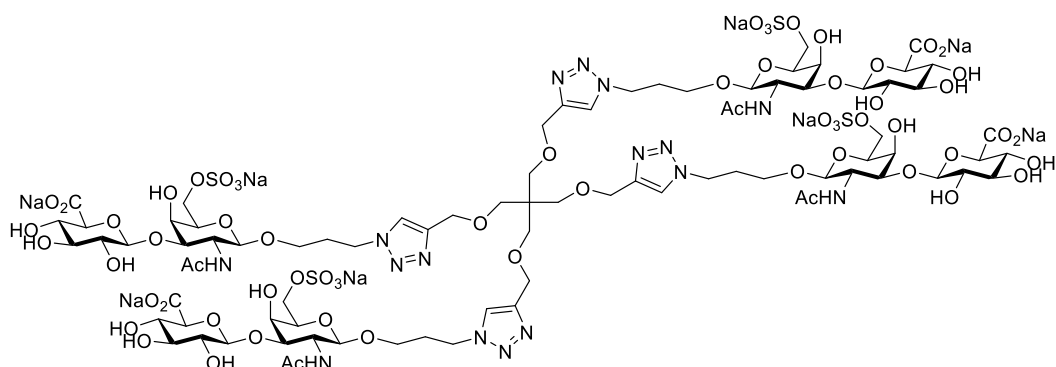
**$^{13}C$  NMR (176 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.5, 174.3, (C=O, C-6 GlcA), 143.7 (Cq triazol), 124.5 (CH triazol), 102.9 (C-1 GlcA), 100.8 (C-1 GalN), 76.1, 75.9 (C-4 GalN, C-5 GlcA), 74.7 (C-3 GlcA), 74.5 (C-3 GalN), 74.1 (C-5 GalN), 72.2 (C-2 GlcA), 71.5 (C-4 GlcA), 67.6 ( $CH_2$  (pentaerythritol)), 66.1 (O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 63.1 (O- $CH_2$ -triazol), 60.6 (C-6 GalN), 51.4 (C-2 GalN), 46.6 (O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 44.1 (Cq (pentaerythritol)), 29.1 (O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI $^-$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{85}H_{130}N_{16}O_{64}S_4$  [ $M-8Na+6H$ ] $^{2-}$ : 1263.315178, measured: 1263.316629

$[\alpha]_D^{20} = +56.3222$  ( $H_2O$ ,  $c$  1.00)

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$*

## Glycocluster 6S-P4 201



Chemical Formula:  $C_{85}H_{124}N_{16}Na_8O_{64}S_4$   
Molecular Weight: 2706,13

A solution of the tetravalent platform **192** in DMSO 0.033 M (160  $\mu$ L, 5.30  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **67** (18 mg, 29.60  $\mu$ mol, 5.6 eq.) in PBS 0.034 M (870  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (220  $\mu$ L, 26.50  $\mu$ mol, 5.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (220  $\mu$ L, 53.00  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (200  $\mu$ L, 79.50  $\mu$ mol, 15.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **201** as a sodium salt (6.5 mg, 45 %).

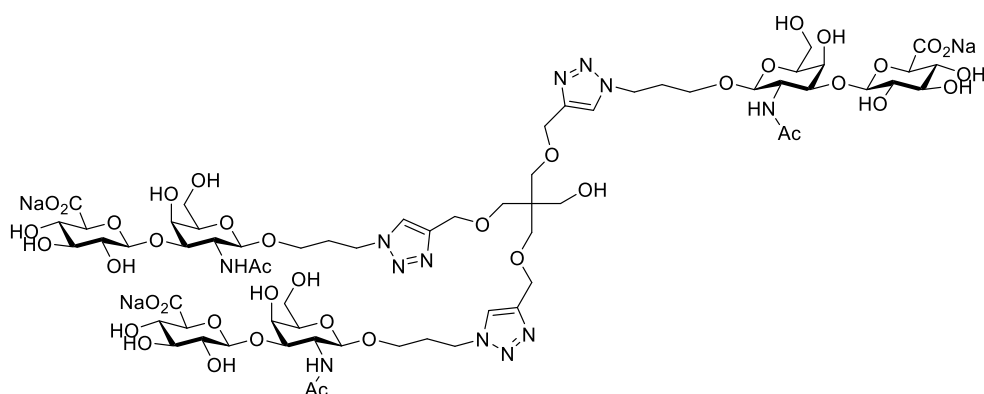
**$^1H$  NMR (700 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.84 (s, 4H, H triazol), 4.48-4.30 (m, 24H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ -triazol, O- $CH_2$ -triazol), 4.17-4.07 (m, 12H, H-4 GalN, H-6 GalN), 3.95 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 10.0$  Hz, 4H, H-2 GalN), 3.85-3.81 (m, 4H, H-5 GalN), 3.80-3.74 (m, 8H, H-3 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.61 (d,  $^3J_{5-4} = 8.0$  Hz, 4H, H-5 GlcA), 3.48-3.44 (m, 4H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.41-3.38 (m, 8H, H-3 GlcA, H-4 GlcA), 3.29 (s, 8H,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 3.25 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.0$  Hz, 4H, H-2 GlcA), 2.10-2.01 (m, 8H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 1.93 (s, 12H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (176 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.9, 174.7, (C=O, C-6 GlcA), 144.0 (Cq triazol), 124.9 (CH triazol), 104.1 (C-1 GlcA), 101.3 (C-1 GalN), 80.0 (C-3 GalN), 76.1 (C-5 GlcA), 75.3 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 72.7 (C-2 GlcA), 72.6 (C-5 GalN), 71.8 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 67.9 ( $CH_2$  (pentaerythritol)), 67.6 (C-6 GalN), 67.5 (C-4 GalN), 66.5 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 63.4 (O- $CH_2$ -triazol), 51.1 (C-2 GalN), 47.0 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 44.5 (Cq (pentaerythritol)), 29.5 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 22.3 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{85}H_{130}N_{16}O_{64}S_4 [M-8Na+6H]^{2-}$ : 1263.315178, measured: 1263.315788

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$*

### Glycocluster OS-P3-OH 202



Chemical Formula:  $C_{65}H_{99}N_{12}Na_3O_{40}$   
Molecular Weight: 1757,52

A solution of the trivalent platform **193** in DMSO 0.033 M (180  $\mu$ L, 6.80  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **65** (17 mg, 33.90  $\mu$ mol, 5.0 eq.) in PBS 0.034 M (1.0 mL). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (280  $\mu$ L, 34.00  $\mu$ mol, 5.0 eq.), THPTA in DMSO 0.24 M (280  $\mu$ L, 68.00  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (260  $\mu$ L, 102.00  $\mu$ mol, 15.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **202** as a sodium salt (15.4 mg, quant.).

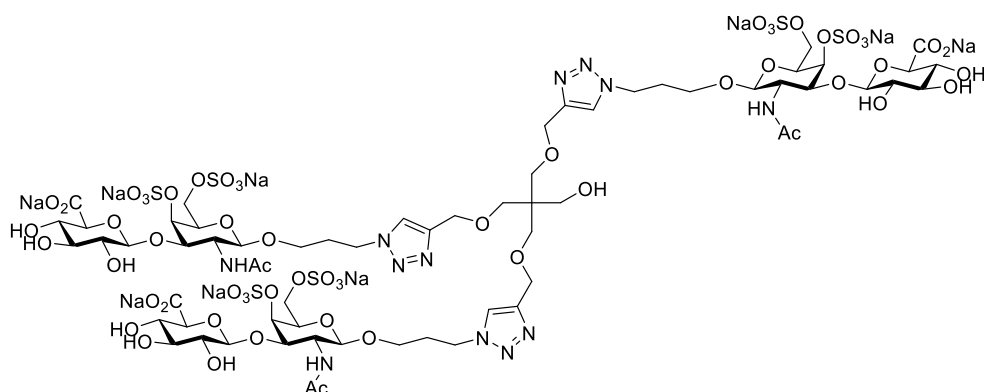
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.97 (s, 3H, H triazol), 4.60-4.43 (m, 18H, H-1 GlcA, H-1 GalN,  $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol,  $O-CH_2$ -triazol), 4.19 (bs,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 3H, H-4 GalN), 4.03 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 10.0$  Hz, 3H, H-2 GalN), 3.92-3.81 (m, 6H, H-3 GalN,  $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol a), 3.80-3.75 (m, 6H, H-6 GalN), 3.73-3.63 (m, 8H, H-5 GlcA, H-5 GalN,  $CH_2-OH$ ), 3.57-3.45 (m, 9H, H-3 GlcA, H-4 GlcA,  $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol b), 3.42 (s, 9H,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 3.35 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 3H, H-2 GlcA), 2.19-2.10 (m, 6H,  $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 2.03 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.5, 174.3 (C=O, C-6 GlcA), 143.7 (Cq triazol), 124.5 (CH triazol), 103.7 (C-1 GlcA), 100.9 (C-1 GalN), 79.8 (C-3 GalN), 75.7 (C-5 GalN), 74.9 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 74.4 (C-5 GlcA), 72.3 (C-2 GlcA), 71.4 (C-3 GlcA or C-4 GlcA), 68.0 ( $CH_2$  (pentaerythritol)), 67.3 (C-4 GalN), 65.8 ( $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 63.1 ( $O-CH_2$ -triazol), 62.4 ( $CH_2-OH$ ), 60.6 (C-6 GalN), 50.8 (C-2 GalN), 46.5 ( $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 44.4 (Cq (pentaerythritol)), 29.1 ( $O-CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI $^-$ ):**  $m/z$ : calculated for  $C_{65}H_{100}N_{12}O_{40} [M-3Na+H]^{2-}$ : 844.308537, measured: 844.308864



### Glycocluster 4,6S-P3-OH 203



Chemical Formula:  $C_{65}H_{93}N_{12}Na_9O_{58}S_6$   
Molecular Weight: 2369,75

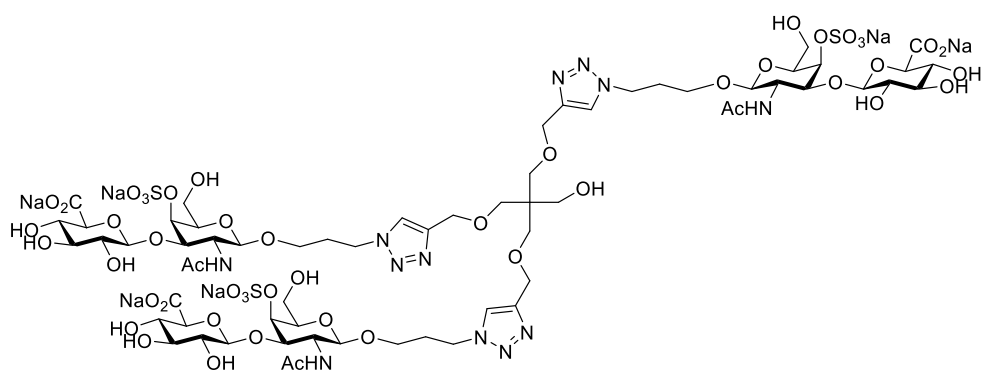
A solution of the trivalent platform **193** in DMSO 0.0132 M (240  $\mu$ L, 3.60  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **52** (11 mg, 15.60  $\mu$ mol, 4.3 eq.) in PBS 0.14 M (110  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (150  $\mu$ L, 18.00  $\mu$ mol, 4.3 eq.), TBTA in DMSO 0.096 M (380  $\mu$ L, 36.00  $\mu$ mol, 8.6 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (140  $\mu$ L, 54.00  $\mu$ mol, 12.6 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **203** as a sodium salt (5.6 mg, 56 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.99 (s, 3H, H triazol), 4.88 (s, 3H, H-4 GalN), 4.61-4.46 (m, 18H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol, O- $CH_2$ -triazol), 4.38-4.30 (m, 3H, H-6a GalN), 4.21 (dd,  $^3J_{6a-5} = ^3J_{6a-6b} = 8.5$  Hz, 3H, H-6b GalN), 4.15-4.07 (m, 9H, H-2 GalN, H-3 GalN, H-5 GalN), 3.97-3.88 (m, 3H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.71 (d,  $^3J_{5-4} = 9.0$  Hz, 3H, H-5 GlcA), 3.63-3.48 (m, 11H, H-3 GlcA, H-4 GlcA, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b,  $CH_2$ -OH), 3.46 (s, 6H,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 3.40 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 3H, H-2 GlcA), 2.23-2.14 (m, 6H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.07 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{65}H_{100}N_{12}O_{58}S_6$   $[M-9Na+7H]^{2-}$ : 1084.178981, measured: 1084.174583

*Insufficient product for  $[\alpha]_D^{20}$  and  $^{13}C$  NMR*

### Glycocluster 4S-P3-OH 204



Chemical Formula:  $C_{65}H_{96}N_{12}Na_6O_{49}S_3$   
Molecular Weight: 2063,64

A solution of the trivalent platform **193** in DMSO 0.033 M (150  $\mu$ L, 5.70  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **66** (17 mg, 28.80  $\mu$ mol, 5.0 eq.) in PBS 0.034 M (850  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (240  $\mu$ L, 28.50  $\mu$ mol, 5.0 eq.), THPTA in DMSO 0.24 M (240  $\mu$ L, 57.00  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (210  $\mu$ L, 85.50  $\mu$ mol, 15.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **204** as a sodium salt (6.2 mg, 53 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.96 (s, 3H, H triazol), 4.86-4.71 (m, 3H, H-4 GalN), 4.57-4.43 (m, 12H, H-1 GlcA, H-1 GalN, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol, O- $CH_2$ -triazol), 4.10-4.03 (m, 6H, H-2 GalN, H-3 GalN), 3.92-3.85 (m, 3H, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol a), 3.85-3.76 (m, 9H, H-5 GalN, H-6 GalN), 3.68 (d,  $^3J_{5-4} = 9.5$  Hz, 3H, H-5 GlcA), 3.59-3.45 (m, 11H, H-3 GlcA, H-4 GlcA, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol b,  $CH_2-OH$ ), 3.42 (s, 6H,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 3.37 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 8.5$  Hz, 3H, H-2 GlcA), 2.20-2.10 (m, 6H, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 2.05 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.5, 174.3, (C=O, C-6 GlcA), 143.7 (Cq triazol), 124.6 (CH triazol), 102.9 (C-1 GlcA), 100.8 (C-1 GalN), 76.1, 75.9 (C-4 GalN, C-5 GlcA), 74.7 (C-3 GlcA), 74.5 (C-3 GalN), 74.0 (C-5 GalN), 72.2 (C-2 GlcA), 71.4 (C-4 GlcA), 68.0 ( $CH_2$  (pentaerythritol)), 66.1 (O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 63.1 (O- $CH_2$ -triazol), 60.6 (C-6 GalN), 60.4 ( $CH_2-OH$ ), 51.4 (C-2 GalN), 46.6 (O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 44.4 (Cq (pentaerythritol)), 29.1 (O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 21.9 ( $NHC(O)CH_3$ ).

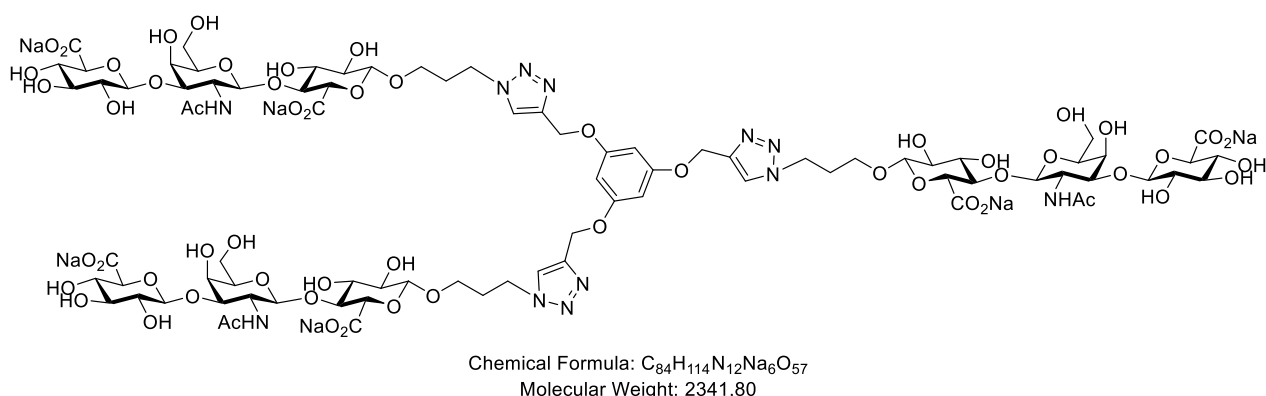
**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{65}H_{100}N_{12}O_{49}S_3 [M-6Na+4H]^{2-}$ : 964.243759, measured: 964.245440

A solution of the trivalent platform **193** in DMSO 0.033 M (130  $\mu$ L, 4.90  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of disaccharide **67** (15 mg, 24.30  $\mu$ mol, 5.0 eq.) in PBS 0.034 M (710  $\mu$ L). Then, solutions of CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O in PBS 0.12 M (200  $\mu$ L, 24.50  $\mu$ mol, 5.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (200  $\mu$ L, 49.00  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (180  $\mu$ L, 73.50  $\mu$ mol, 15.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using H<sub>2</sub>O as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4-Na<sup>+</sup> column using H<sub>2</sub>O as eluent to afford product **205** as a sodium salt (3.0 mg, 30 %).

**HRMS (ESI<sup>-</sup>):** *m/z*: calculated for C<sub>65</sub>H<sub>100</sub>N<sub>12</sub>O<sub>49</sub>S<sub>3</sub> [M-6Na+4H]<sup>2-</sup>: 964.243759, measured: 964.244552

293

### Glycocluster Trisaccharide OS-P3 206



A solution of the trivalent platform **190** in DMSO 0.033 M (110  $\mu$ L, 3.70  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of trisaccharide **133** (11 mg, 15.70  $\mu$ mol, 4.2 eq.) in PBS 0.034 M (460  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (120  $\mu$ L, 14.80  $\mu$ mol, 4.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (120  $\mu$ L, 29.60  $\mu$ mol, 8.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (110  $\mu$ L, 44.40  $\mu$ mol, 12.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **206** as a sodium salt (3.8 mg, 44 %).

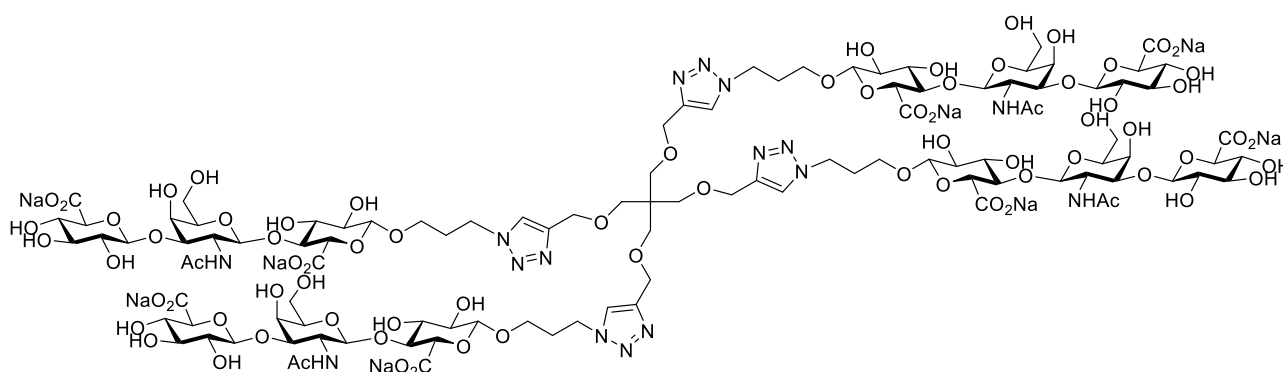
**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 8.09 (s, 3H, H triazol), 6.39 (s, 3H,  $H_{ar}$ ), 5.23 (s, 6H, O- $CH_2$ -triazol), 4.59-4.52 (m, 9H, H-1 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 4.50 (d,  $^3J_{1-2} = 8.0$  Hz, 3H, H-1 GlcA2), 4.37-4.32 (m, 3H, H-1 GlcA1), 4.17 (bs,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 3H, H-4 GalN), 4.01 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 9.5$  Hz, 3H, H-2 GalN), 3.89-3.74 (m, 15H, H-3 GalN, H-4 GlcA1, H-6 GalN, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol a), 3.73-3.65 (m, 9H, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, H-5 GalN), 3.58 (dd,  $^3J_{3-2} = ^3J_{3-4} = 8.5$  Hz, 3H, H-3 GlcA1), 3.55-3.51 (m, 3H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol b), 3.51-3.46 (m, 6H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 3.38-3.30 (m, 6H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2), 2.24-2.14 (m, 6H, O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 2.03 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 175.6, 174.6, 173.9 (C=O, C-6 GlcA1, C-6 GlcA2), 158.9 ( $C_{qar}$ ), 142.6 ( $C_q$  triazol), 125.2 (CH triazol), 103.8 (C-1 GlcA2), 101.9 (C-1 GlcA1), 100.5 (C-1 GalN), 96.3 ( $CH_{ar}$ ), 80.0 (C-3 GalN), 79.4 (C-4 GlcA1), 76.2, 75.7, 74.9, 74.6 (C-3 GlcA2, C-5 GlcA1, C-5 GlcA2, C-5 GalN), 73.5 (C-3 GlcA1), 72.4, 72.3 (C-2 GlcA1, C-2 GlcA2), 71.4 (C-4 GlcA2), 67.3 (C-4 GalN), 66.0 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 61.0, 60.7 (C-6 GalN, O- $CH_2$ -triazol), 50.6 (C-2 GalN), 46.7 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 29.1 (O- $CH_2$ - $CH_2$ - $CH_2$ -triazol), 22.1 ( $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{84}H_{118}N_{12}O_{57} [M-6Na+4H]^{2-}$ : 1103.335736, measured: 1103.333381

*Insufficient product for  $[\alpha]_D^{20}$*

### Glycocluster Trisaccharide **OS-P4 207**



Chemical Formula:  $C_{109}H_{156}N_{16}Na_8O_{76}$   
Molecular Weight: 3090,40

A solution of the tetravalent platform **192** in DMSO 0.033 M (100  $\mu$ L, 3.20  $\mu$ mol, 1.0 eq.) was added to a solution of trisaccharide **133** (13 mg, 17.90  $\mu$ mol, 5.6 eq.) in PBS 0.034 M (530  $\mu$ L). Then, solutions of  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in PBS 0.12 M (130  $\mu$ L, 16.00  $\mu$ mol, 5.0 eq.), TBTA in DMSO 0.24 M (130  $\mu$ L, 32.00  $\mu$ mol, 10.0 eq.) and NaAsc in PBS 0.40 M (120  $\mu$ L, 48.00  $\mu$ mol, 15.0 eq.) were added successively. The mixture was stirred at room temperature for 24h. Then, Cu was removed using Quadrasil MP resin and the reaction mixture was purified by size exclusion chromatography Sephadex LH-20 using  $H_2O$  as eluent. Finally, it was eluted from an ion exchange DOWEX 50WX4- $Na^+$  column using  $H_2O$  as eluent to afford product **207** as a sodium salt (4.6 mg, 46 %).

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  (ppm):** 7.95 (s, 4H, H triazol), 4.59-4.52 (m, 28H, H-1 GlcA1, H-1 GlcA2, H-1 GalN, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 4.19 (bs,  $^3J_{4-3} = 3.0$  Hz, 4H, H-4 GalN), 4.01 (dd,  $^3J_{2-1} = ^3J_{2-3} = 10.0$  Hz, 4H, H-2 GalN), 3.89-3.74 (m, 20H, H-3 GalN, H-4 GlcA1, H-6 GalN, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol a), 3.75-3.67 (m, 12H, H-5 GlcA1, H-5 GlcA2, H-5 GalN), 3.65-3.56 (m, 8H, H-3 GlcA1, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol b), 3.52-3.45 (m, 8H, H-3 GlcA2, H-4 GlcA2), 3.41-3.30 (m, 16H, H-2 GlcA1, H-2 GlcA2,  $CH_2$  (pentaerythritol)), 2.22-2.12 (m, 8H, O- $CH_2-CH_2-CH_2$ -triazol), 2.04 (s, 9H,  $NHC(O)CH_3$ ).

**HRMS (ESI):**  $m/z$ : calculated for  $C_{109}H_{162}N_{16}O_{76}$   $[M-8Na+6H]^2$ : 1455.465724, measured: 1455.463192

*Unsatisfactory product purity for  $[\alpha]_D^{20}$  and insufficient product for  $^{13}C$  NMR*



# Références Bibliographiques





- (1) Kjellén, L.; Lindahl, U. Proteoglycans: Structures and Interactions. *Annual Review of Biochemistry* **1991**, *60*, 443–475.  
DOI : [10.1146/annurev.bi.60.070191.002303](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.002303).
- (2) Merry, C. L. R.; Lindahl, U.; Couchman, J.; Esko, J. D. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology 4<sup>th</sup> edition*; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al. Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor (NY), **2022**.  
DOI : [10.1101/glycobiology.4e.17](https://doi.org/10.1101/glycobiology.4e.17).
- (3) Meyer, K.; Palmer, J. W. The Polysaccharide of The Vitreous Humor. *Journal of Biological Chemistry* **1934**, *107* (3), 629–634.  
DOI : [10.1016/S0021-9258\(18\)75338-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75338-6).
- (4) Sodhi, H.; Panitch, A. Glycosaminoglycans in Tissue Engineering: A Review. *Biomolecules* **2021**, *11* (1), 29.  
DOI : [10.3390/biom11010029](https://doi.org/10.3390/biom11010029).
- (5) Cooper, C. A.; Brown, K. K.; Meletis, C. D.; Zabriskie, N. Inflammation and Hyaluronic Acid. *Alternative and Complementary Therapies* **2008**, *14*, 78–84.  
DOI : [10.1089/act.2008.14201](https://doi.org/10.1089/act.2008.14201).
- (6) Köwitsch, A.; Zhou, G.; Groth, T. Medical Application of Glycosaminoglycans: A Review. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2018**, *12* (1), e23–e41.  
DOI : [10.1002/term.2398](https://doi.org/10.1002/term.2398).
- (7) Yasin, A.; Ren, Y.; Li, J.; Sheng, Y.; Cao, C.; Zhang, K. Advances in Hyaluronic Acid for Biomedical Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*.  
DOI : [10.3389/fbioe.2022.910290](https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.910290).
- (8) Howell, W. H.; Holt, E. Two New Factors in Blood Coagulation—Heparin and pro-Antithrombin. *American Journal of Physiology-Legacy Content* **1918**, *47* (3), 328–341.  
DOI : [10.1152/ajplegacy.1918.47.3.328](https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1918.47.3.328).
- (9) Koganti, R.; Memon, A.; Shukla, D. Emerging Roles of Heparan Sulfate Proteoglycans in Viral Pathogenesis. *Semin Thromb Hemost* **2021**, *47* (03), 283–294.  
DOI : [10.1055/s-0041-1725068](https://doi.org/10.1055/s-0041-1725068).
- (10) Sarrazin, S.; Lamanna, W. C.; Esko, J. D. Heparan Sulfate Proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2011**, *3* (7), a004952.  
DOI : [10.1101/cshperspect.a004952](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952).
- (11) Suzuki, M. Prosthetic group of cornea mucoid. *J. Biochem.*, **1939**, *30*, 185–191.
- (12a) Funderburgh, J. L. MINI REVIEW Keratan Sulfate: Structure, Biosynthesis, and Function. *Glycobiology* **2000**, *10* (10), 951–958.  
DOI : [10.1093/glycob/10.10.951](https://doi.org/10.1093/glycob/10.10.951).
- (12b) Pomin, V. H. Keratan Sulfate: An up-to-Date Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *72*, 282–289.  
DOI : [10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029).
- (13) Caterson, B.; Melrose, J. Keratan Sulfate, a Complex Glycosaminoglycan with Unique Functional Capability. *Glycobiology* **2018**, *28* (4), 182–206.  
DOI : [10.1093/glycob/cwy003](https://doi.org/10.1093/glycob/cwy003).
- (14) Meyer, K.; Chaffee, E. The Mucopolysaccharides of Skin. *Journal of Biological Chemistry* **1941**, *138* (2), 491–49.  
DOI : [10.1016/S0021-9258\(18\)51374-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51374-0).
- (15) Mizumoto, S.; Yamada, S. The Specific Role of Dermatan Sulfate as an Instructive Glycosaminoglycan in Tissue Development. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23* (13), 7485.  
DOI : [10.3390/ijms23137485](https://doi.org/10.3390/ijms23137485).
- (16a) Zhang, B.; Chi, L. Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate-Protein Interactions and Their Biological Functions in Human Diseases: Implications and Analytical Tools. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*.  
DOI : [10.3389/fcell.2021.693563](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.693563).

- (16b)** Volpi, N. Dermatan Sulfate: Recent Structural and Activity Data. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *82* (2), 233–239.  
DOI : [10.1016/j.carbpol.2010.05.009](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.009).
- (17)** Lensen, J. F. M.; Vlag, J. van der; Versteeg, E. M. M.; Wetzels, J. F. M.; Heuvel, L. P. W. J. van den; Berden, J. H. M.; Kuppevelt, T. H. van; Rops, A. L. W. M. M. Differential Expression of Specific Dermatan Sulfate Domains in Renal Pathology. *PLOS ONE* **2015**, *10* (8), e0134946.  
DOI : [10.1371/journal.pone.0134946](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134946).
- (18)** Sylvén, B. Biological Aspects of the Physiology of Hyaline Cartilage. *Acta Orthopaedica* **1949**, *18*, 21–27.  
DOI : [10.3109/17453674908988954](https://doi.org/10.3109/17453674908988954).
- (18)** Wang, K.; Qi, L.; Zhao, L.; Liu, J.; Guo, Y.; Zhang, C. Degradation of Chondroitin Sulfate: Mechanism of Degradation, Influence Factors, Structure-Bioactivity Relationship and Application. *Carbohydrate Polymers* **2023**, *301*, 120361.  
DOI : [10.1016/j.carbpol.2022.120361](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120361).
- (19)** Handley, C. J.; Samiric, T.; Ilic, M. Z. Structure, Metabolism, and Tissue Roles of Chondroitin Sulfate Proteoglycans. In *Advances in Pharmacology*; Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity; Academic Press, **2006**, *53*, pp 219–232.  
DOI : [10.1016/S1054-3589\(05\)53010-2](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53010-2).
- (20)** Xu, T.; Bianco, P.; Fisher, L. W.; Longenecker, G.; Smith, E.; Goldstein, S.; Bonadio, J.; Boskey, A.; Heegaard, A. M.; Sommer, B.; Satomura, K.; Dominguez, P.; Zhao, C.; Kulkarni, A. B.; Robey, P. G.; Young, M. F. Targeted Disruption of the Biglycan Gene Leads to an Osteoporosis-like Phenotype in Mice. *Nat Genet* **1998**, *20*, 78–82.  
DOI : [10.1038/1746](https://doi.org/10.1038/1746).
- (21)** Mishra, S.; Ganguli, M. Functions of, and Replenishment Strategies for, Chondroitin Sulfate in the Human Body. *Drug Discovery Today* **2021**, *26* (5), 1185–1199.  
DOI : [10.1016/j.drudis.2021.01.029](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.01.029).
- (22)** Zhang, B.; Chi, L. Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate-Protein Interactions and Their Biological Functions in Human Diseases: Implications and Analytical Tools. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*.  
DOI : [10.3389/fcell.2021.693563](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.693563).
- (23)** Shen, Q.; Guo, Y.; Wang, K.; Zhang, C.; Ma, Y. A Review of Chondroitin Sulfate's Preparation, Properties, Functions, and Applications. *Molecules* **2023**, *28* (20), 7093.  
DOI : [10.3390/molecules28207093](https://doi.org/10.3390/molecules28207093).
- (24)** Kitagawa, H. Chondroitin Sulfate and Neuronal Disorders. *Front Biosci* **2016**, *21* (7), 1330–1340.  
DOI : [10.2741/4460](https://doi.org/10.2741/4460).
- (25)** Lin, J.; Duan, M.; Lin, N.; Zhao, W. The Emerging Role of the Chondroitin Sulfate Proteoglycan Family in Neurodegenerative Diseases. *Reviews in the Neurosciences* **2021**, *32* (7), 737–750.  
DOI : [10.1515/revneuro-2020-0146](https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0146).
- (26a)** Cilpa, G.; Koivuniemi, A.; Hyvönen, M. T.; Riekkola, M.-L. A Molecular Dynamics Approach for the Association of ApolipoproteinB-100 and Chondroitin-6-Sulfate. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115* (16), 4818–4825.  
DOI : [10.1021/jp110987r](https://doi.org/10.1021/jp110987r).
- (26b)** Karangelis, D. E.; Kanakis, I.; Asimakopoulou, A. P.; Karousou, E.; Passi, A.; Theocharis, A. D.; Triposkiadi, F.; Tsilimingas, N. B.; Karamanos, N. K. Glycosaminoglycans as Key Molecules in Atherosclerosis: The Role of Versican and Hyaluronan. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17* (33), 4018–4026.  
DOI : [10.2174/092986710793205354](https://doi.org/10.2174/092986710793205354).
- (27)** Kim, J. S.; and Werth, V. P. Identification of specific chondroitin sulfate species in cutaneous autoimmune disease. *J. Histochem. Cytochem.* **2011**, *59*, 780–790.  
DOI : [10.1369/0022155411411304](https://doi.org/10.1369/0022155411411304)
- (28a)** Kovalszky, I.; Pogany, G.; Molnar, G.; Jeney, A.; Lapis, K.; Karacsonyi, S.; Szecseny, A.; and Iozzo, R. V. Altered glycosaminoglycan composition in reactive and neoplastic human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *167*, 883–890.  
DOI : [10.1016/0006-291x\(90\)90606-n](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)90606-n)

- (28b)** Lapis, K., Kavalsky, I., Jeney, A., Pogany, G., Molnar, G., Repassy, D., Szecseny, A., and Karacsonyi, S. Alterations of glycosaminoglycans in human liver and kidney tumors. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **1990**, *15*, 155–165.
- (29a)** Ricciardelli, C.; Mayne, K.; Sykes, P. J.; Raymond, W. A.; McCaul, K.; Marshall, V. R.; Tilley, W. D.; Skinner, J. M.; Horsfall, D. J. Elevated Stromal Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan Predicts Progression in Early-Stage Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* **1997**, *3* (6), 983–992.
- (29b)** Ricciardelli, C.; Mayne, K.; Sykes, P. J.; Raymond, W. A.; McCaul, K.; Marshall, V. R.; Horsfall, D. J. Elevated Levels of Versican but Not Decorin Predict Disease Progression in Early-Stage Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* **1998**, *4* (4), 963–971.
- (30)** Suwiwat, S.; Ricciardelli, C.; Tammi, R.; Tammi, M.; Auvinen, P.; Kosma, V.-M.; LeBaron, R. G.; Raymond, W. A.; Tilley, W. D.; Horsfall, D. J. Expression of Extracellular Matrix Components Versican, Chondroitin Sulfate, Tenascin, and Hyaluronan, and Their Association with Disease Outcome in Node-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2004**, *10* (7), 2491–2498.  
DOI : [10.1158/1078-0432.ccr-03-0146](https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0146).
- (31)** Lidholt, K., Eriksson, I., and Kjellen, L. Heparin proteoglycans synthesized by mouse mastocytoma contain chondroitin sulphate. *Biochem. J.* **1995**, *311* (Pt 1), 233–238.  
DOI : [10.1042/bj3110233](https://doi.org/10.1042/bj3110233)
- (32)** Wegrowski, Y.; Maquart, F. Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Tumor Progression. In *Advances in Pharmacology*; Chondroitin Sulfate: Structure, Role and Pharmacological Activity; Academic Press, **2006**; Vol. 53, pp 297–321.  
DOI : [10.1016/S1054-3589\(05\)53014-X](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(05)53014-X).
- (33)** Asimakopoulou, A. P.; Theocharis, A. D.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. The Biological Role of Chondroitin Sulfate in Cancer and Chondroitin-Based Anticancer Agents. *In Vivo* **2008**, *22* (3), 385–389.
- (34)** Galtrey, C. M.; Fawcett, J. W. The Role of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Regeneration and Plasticity in the Central Nervous System. *Brain Research Reviews* **2007**, *54* (1), 1–18.  
DOI : [10.1016/j.brainresrev.2006.09.006](https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.09.006).
- (35)** DeWitt, D.A., Silver, J., Canning, D.R., Perry, G. Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **1993**, *121*, 149–152.  
DOI : [10.1006/exnr.1993.1081](https://doi.org/10.1006/exnr.1993.1081)
- (36)** Lin, J.; Duan, M.; Lin, N.; Zhao, W. The Emerging Role of the Chondroitin Sulfate Proteoglycan Family in Neurodegenerative Diseases. *Reviews in the Neurosciences* **2021**, *32* (7), 737–750.  
DOI : [10.1515/revneuro-2020-0146](https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0146).
- (37a)** Negroni, E.; Henault, E.; Chevalier, F.; Gilbert-Sirieix, M.; Van Kuppevelt, T. H.; Papy-Garcia, D.; Uzan, G.; Albanese, P. Glycosaminoglycan Modifications in Duchenne Muscular Dystrophy: Specific Remodeling of Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate. *J Neuropathol Exp Neurol* **2014**, *73* (8), 789–797.  
DOI : [10.1097/NEN.0000000000000098](https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000098).
- (37b)** An, H.; Zheng, H.; Zhang, L.; Ma, L.; Liu, Z. Partial Least Squares Based Identification of Duchenne Muscular Dystrophy Specific Genes. *J Zhejiang Univ Sci B* **2013**, *14* (11), 973–982.  
DOI : [10.1631/jzus.B1300060](https://doi.org/10.1631/jzus.B1300060).
- (37c)** Ralston, E.; Gutierrez-Cruz, G.; Kenea, A. D.; Brooks, S. R. Transcriptomic Analysis of Mdx Mouse Muscles Reveals a Signature of Early Human Duchenne Muscular Dystrophy. *BioRxiv*, **2021**.  
DOI : [10.1101/2021.07.16.452553](https://doi.org/10.1101/2021.07.16.452553).
- (38)** Maciej-Hulme, M. L.; Melrose, J.; Farrugia, B. L. Arthritis and Duchenne Muscular Dystrophy: The Role of Chondroitin Sulfate and Its Associated Proteoglycans in Disease Pathology and as a Diagnostic Marker. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **2023**, *324* (1), C142–C152.  
DOI : [10.1152/ajpcell.00103.2022](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00103.2022).
- (39)** Amhare, A. F.; Lei, J.; Deng, H.; Lv, Y.; Han, J.; Zhang, L. Biomedical Application of Chondroitin Sulfate with Nanoparticles in Drug Delivery Systems: Systematic Review. *Journal of Drug Targeting* **2021**, *29*, 259–268.  
DOI : [10.1080/1061186X.2020.1833018](https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1833018)

- (40) Liu, P.; Chen, N.; Yan, L.; Gao, F.; Ji, D.; Zhang, S.; Zhang, L.; Li, Y.; Xiao, Y. Preparation, characterisation and in vitro and in vivo evaluation of CD44-targeted chondroitin sulphate-conjugated doxorubicin PLGA nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 17–26.  
DOI : [10.1016/j.carbpol.2019.02.084](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.084)
- (41) Okubo, M.; Miyazaki, M.; Yuba, E.; Harada, A. Chondroitin Sulfate-Based pH-Sensitive Polymer-Modified Liposomes for Intracellular Antigen Delivery and Induction of Cancer Immunity. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 1518–1529.  
DOI : [10.1021/acs.bioconjchem.9b00221](https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00221)
- (42) Gao, Y.; Li, B.; Kong, W.; Yuan, L.; Guo, L.; Li, C.; Fan, H.; Fan, Y.; Zhang, X. Injectable and self-crosslinkable hydrogels based on collagen type II and activated chondroitin sulfate for cell delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 2014–2020.  
DOI : [10.1016/j.ijbiomac.2018.07.079](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.079)
- (43) Iovu, M.; Dumais, G.; du Souich, P. Anti-Inflammatory Activity of Chondroitin Sulfate. *Osteoarthritis and Cartilage* **2008**, *16*, S14–S18.  
DOI : [10.1016/j.joca.2008.06.008](https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.06.008).
- (44) [https://www.lecofer.org/item-cours-1-7-0.php#ch\\_1](https://www.lecofer.org/item-cours-1-7-0.php#ch_1)
- (45) Willers, C.; Norton, N.; Harvey, N. C.; Jacobson, T.; Johansson, H.; Lorentzon, M.; McCloskey, E. V.; Borgström, F.; Kanis, J. A.; the SCOPE review panel of the IOF. Osteoporosis in Europe: A Compendium of Country-Specific Reports. *Arch Osteoporos* **2022**, *17* (1), 23.  
DOI : [10.1007/s11657-021-00969-8](https://doi.org/10.1007/s11657-021-00969-8).
- (46a) Van Der Rest, M.; Garrone, R. Collagen Family of Proteins. *The FASEB Journal* **1991**, *5* (13), 2814–2823.  
DOI : [10.1096/fasebj.5.13.1916105](https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916105).
- (46b) Guillerminet, F.; Beaupied, H.; Fabien-Soulé, V.; Tomé, D.; Benhamou, C.-L.; Roux, C.; Blais, A. Hydrolyzed Collagen Improves Bone Metabolism and Biomechanical Parameters in Ovariectomized Mice: An *in Vitro* and *in Vivo* Study. *Bone* **2010**, *46* (3), 827–834.  
DOI : [10.1016/j.bone.2009.10.035](https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.10.035).
- (46c) Takeda, S.; Park, J.-H.; Kawashima, E.; Ezawa, I.; Omi, N. Hydrolyzed Collagen Intake Increases Bone Mass of Growing Rats Trained with Running Exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **2013**, *10* (1), 35.  
DOI : [10.1186/1550-2783-10-35](https://doi.org/10.1186/1550-2783-10-35).
- (47) Desoutter, J.; Mentaverri, R.; Brazier, M.; Kamel, S. Le Remodelage Osseux Normal et Pathologique. *Revue Francophone des Laboratoires* **2012**, *2012* (446), 33–42.  
DOI : [10.1016/S1773-035X\(12\)71733-1](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(12)71733-1).
- (48) Dossier Ostéoporose, *INSERM*, **2023**. <https://www.inserm.fr/dossier/osteoporose/>
- (49a) Takeuchi, Y.; Nakayama, K.; Matsumoto, T. Differentiation and Cell Surface Expression of Transforming Growth Factor-Beta Receptors Are Regulated by Interaction with Matrix Collagen in Murine Osteoblastic Cells. *J Biol Chem* **1996**, *271* (7), 3938–3944.  
DOI : [10.1074/jbc.271.7.3938](https://doi.org/10.1074/jbc.271.7.3938).
- (49b) Takeuchi, Y.; Suzawa, M.; Kikuchi, T.; Nishida, E.; Fujita, T.; Matsumoto, T. Differentiation and Transforming Growth Factor-β Receptor Down-Regulation by Collagen-A2β1 Integrin Interaction Is Mediated by Focal Adhesion Kinase and Its Downstream Signals in Murine Osteoblastic Cells \*. *Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272* (46), 29309–29316.  
DOI : [10.1074/jbc.272.46.29309](https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29309).
- (50) Jing Lu, *PhD thesis*, **2011**, 978-3-8440-0230-0
- (51) Drake, F. H.; Dodds, R. A.; James, I. E.; Connor, J. R.; Debouck, C.; Richardson, S.; Lee-Rykaczewski, E.; Coleman, L.; Rieman, D.; Barthlow, R.; Hastings, G.; Gowen, M. Cathepsin K, but Not Cathepsins B, L, or S, Is Abundantly Expressed in Human Osteoclasts (\*). *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271* (21), 12511–12516.  
DOI : [10.1074/jbc.271.21.12511](https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12511).

- (52) Yoshioka, Y.; Yamachika, E.; Nakanishi, M.; Ninomiya, T.; Nakatsuji, K.; Kobayashi, Y.; Fujii, T.; Iida, S. Cathepsin K Inhibitor Causes Changes in Crystallinity and Crystal Structure of Newly-Formed Mandibular Bone in Rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **2018**, *56* (8), 732–738.  
DOI : [10.1016/j.bjoms.2018.08.003](https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2018.08.003).
- (53) Vidak, E.; Javoršek, U.; Vizovišek, M.; Turk, B. Cysteine Cathepsins and Their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells* **2019**, *8* (3), 264.  
DOI : [10.3390/cells8030264](https://doi.org/10.3390/cells8030264).
- (54) Aguda, A. H.; Panwar, P.; Du, X.; Nguyen, N. T.; Brayer, G. D.; Brömme, D. Structural Basis of Collagen Fiber Degradation by Cathepsin K. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (49), 17474–17479.  
DOI : [10.1073/pnas.1414126111](https://doi.org/10.1073/pnas.1414126111).
- (55) Lecaille, F.; Brömme, D.; Lalmanach, G. Biochemical Properties and Regulation of Cathepsin K Activity. *Biochimie* **2008**, *90* (2), 208–226.  
DOI : [10.1016/j.biochi.2007.08.011](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.08.011).
- (56) Li, Z.; Yasuda, Y.; Li, W.; Bogoy, M.; Katz, N.; Gordon, R. E.; Fields, G. B.; Brömme, D. Regulation of Collagenase Activities of Human Cathepsins by Glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **2004**, *279* (7), 5470–5479.  
DOI : [10.1074/jbc.M310349200](https://doi.org/10.1074/jbc.M310349200).
- (57) Li, Z.; Kienetz, M.; Cherney, M. M.; James, M. N. G.; Brömme, D. The Crystal and Molecular Structures of a Cathepsin K:Chondroitin Sulfate Complex. *Journal of Molecular Biology* **2008**, *383* (1), 78–91.  
DOI : [10.1016/j.jmb.2008.07.038](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.038).
- (58) Dejica, V. M.; Mort, J. S.; Laverty, S.; Percival, M. D.; Antoniou, J.; Zukor, D. J.; Poole, A. R. Cleavage of Type II Collagen by Cathepsin K in Human Osteoarthritic Cartilage. *The American Journal of Pathology* **2008**, *173* (1), 161–169.  
DOI : [10.2353/ajpath.2008.070494](https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070494).
- (59) Cherney, M. M.; Lecaille, F.; Kienetz, M.; Nallaseth, F. S.; Li, Z.; James, M. N. G.; Brömme, D. Structure-Activity Analysis of Cathepsin K/Chondroitin 4-Sulfate Interactions \*. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286* (11), 8988–8998.  
DOI : [10.1074/jbc.M110.126706](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.126706).
- (60) Adami, G.; Fassio, A.; Gatti, D.; Viapiana, O.; Benini, C.; Danila, M. I.; Saag, K. G.; Rossini, M. Osteoporosis in 10 Years Time: A Glimpse into the Future of Osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal* **2022**, *14*, 1–14.  
DOI : [10.1177/1759720X221083541](https://doi.org/10.1177/1759720X221083541).
- (61) Liang, B.; Burley, G.; Lin, S.; Shi, Y.-C. Osteoporosis Pathogenesis and Treatment: Existing and Emerging Avenues. *Cell Mol Biol Lett* **2022**, *27* (1), 72.  
DOI : [10.1186/s11658-022-00371-3](https://doi.org/10.1186/s11658-022-00371-3).
- (62) Langdahl, B. L. Overview of Treatment Approaches to Osteoporosis. *British Journal of Pharmacology* **2021**, *178* (9), 1891–1906.  
DOI : [10.1111/bph.15024](https://doi.org/10.1111/bph.15024).
- (63) Chen, Y.; Jia, L.; Han, T.; Zhao, Z.; Yang, J.; Junping, X.; Yang, H.-J.; Ke, Y. Osteoporosis Treatment: Current Drugs and Future Developments. *Front. Pharmacol.* **2024**, *15*.  
DOI : [10.3389/fphar.2024.1456796](https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1456796).
- (64a) <https://www.glycodiag.com>
- (64b) Prasch, H.; Hojnik, C.; Lindhorst, T. K.; Didak, B.; Landemarre, L.; Wrodnigg, T. M. *Carbohydr. Res.* **2019**, *475*, 65–68.
- (65) Lee, Y. C.; Lee, R. T. Carbohydrate-Protein Interactions: Basis of Glycobiology. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28* (8), 321–327.  
DOI : [10.1021/ar00056a001](https://doi.org/10.1021/ar00056a001).
- (66) Chabre, Y. M.; Roy, R. Chapter 6 - Design and Creativity in Synthesis of Multivalent Neoglycoconjugates. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. **2010**, *63*, 165–393.  
DOI : [10.1016/S0065-2318\(10\)63006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(10)63006-5).

- (67) Bernardi, A.; Jiménez-Barbero, J.; Casnati, A.; Castro, C. D.; Darbre, T.; Fieschi, F.; Finne, J.; Funken, H.; Jaeger, K.-E.; Lahmann, M.; Lindhorst, T. K.; Marradi, M.; Messner, P.; Molinaro, A.; Murphy, P. V.; Nativi, C.; Oscarson, S.; Penadés, S.; Peri, F.; Pieters, R. J.; Renaudet, O.; Raymond, J.-L.; Richichi, B.; Rojo, J.; Sansone, F.; Schäffer, C.; Turnbull, W. B.; Velasco-Torrijos, T.; Vidal, S.; Vincent, S.; Wennekes, T.; Zuilhof, H.; Imberty, A. Multivalent Glycoconjugates as Anti-Pathogenic Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4709–4727.  
DOI : [10.1039/C2CS35408J](https://doi.org/10.1039/C2CS35408J).
- (68) Artner, L. M.; Merkel, L.; Bohlke, N.; Beceren-Braun, F.; Weise, C.; Dervede, J.; Budisa, N.; Hackenberger, C. P. R. Site-Selective Modification of Proteins for the Synthesis of Structurally Defined Multivalent Scaffolds. *Chem. Commun.* **2011**, *48* (4), 522–524.  
DOI : [10.1039/C1CC16039G](https://doi.org/10.1039/C1CC16039G).
- (69) Pifferi, C.; Berthet, N.; Renaudet, O. Cyclopeptide Scaffolds in Carbohydrate-Based Synthetic Vaccines. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (5), 953–965.  
DOI : [10.1039/C7BM00072C](https://doi.org/10.1039/C7BM00072C).
- (70) Müller, C.; Despras, G.; Lindhorst, T. K. Organizing Multivalency in Carbohydrate Recognition. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (11), 3275–3302.  
DOI : [10.1039/C6CS00165C](https://doi.org/10.1039/C6CS00165C).
- (71) Martínez-Bailén, M.; Rojo, J.; Ramos-Soriano, J. Multivalent Glycosystems for Human Lectins. *Chemical Society Reviews* **2023**, *52* (2), 536–572.  
DOI : [10.1039/D2CS00736C](https://doi.org/10.1039/D2CS00736C).
- (72) Böcker, S.; Laaf, D.; Elling, L. Galectin Binding to Neo-Glycoproteins: LacDiNAc Conjugated BSA as Ligand for Human Galectin-3. *Biomolecules* **2015**, *5* (3), 1671–1696.  
DOI : [10.3390/biom5031671](https://doi.org/10.3390/biom5031671).
- (73a) Šimonová, A.; Kupper, C. E.; Böcker, S.; Müller, A.; Hofbauerová, K.; Pelantová, H.; Elling, L.; Křen, V.; Bojarová, P. Chemo-Enzymatic Synthesis of LacDiNAc Dimers of Varying Length as Novel Galectin Ligands. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *101*, 47–55.  
DOI : [10.1016/j.molcatb.2013.12.018](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.12.018).
- (73b) Kupper, C. E.; Böcker, S.; Liu, H.; Adamzyk, C.; Kamp, J. van de; Recker, T.; Lethaus, B.; Jahnke-Dechent, W.; Neuss, S.; Müller-Newen, G.; Elling, L. Fluorescent SNAP-Tag Galectin Fusion Proteins as Novel Tools in Glycobiology. *Current Pharmaceutical Design* **19** (30), 5457–5467.  
DOI : [10.2174/1381612811319300017](https://doi.org/10.2174/1381612811319300017).
- (74) Lohse, A.; Jensen, K. B.; Lundgren, K.; Bols, M. Synthesis and Deconvolution of the First Combinatorial Library of Glycosidase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7* (9), 1965–1971.  
DOI : [10.1016/S0968-0896\(99\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00116-9).
- (75) Compain, P. Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: The End of the Beginning. *The Chemical Record* **2020**, *20* (1), 10–22.  
DOI : [10.1002/tcr.201900004](https://doi.org/10.1002/tcr.201900004).
- (76) Rojo, J.; Nieto, P. M.; Paz, J. L. de. GAG Multivalent Systems to Interact with Langerin. *Current Medicinal Chemistry* **2022**, *29* (7), 1173–1192.  
DOI : [10.2174/0929867328666210705143102](https://doi.org/10.2174/0929867328666210705143102).
- (77) de Paz, J. L.; Noti, C.; Böhm, F.; Werner, S.; Seeberger, P. H. Potentiation of Fibroblast Growth Factor Activity by Synthetic Heparin Oligosaccharide Glycodendrimers. *Chemistry & Biology* **2007**, *14* (8), 879–887.  
DOI : [10.1016/j.chembiol.2007.07.007](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.07.007).
- (78) Oh, Y. I.; Sheng, G. J.; Chang, S.-K.; Hsieh-Wilson, L. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 11796–11799.
- (79) Loka, R. S.; Yu, F.; Sletten, E. T.; Nguyen, H. M. Design, Synthesis, and Evaluation of Heparan Sulfate Mimicking Glycopolymers for Inhibiting Heparanase Activity. *Chem. Commun.* **2017**, *53* (65), 9163–9166.  
DOI : [10.1039/C7CC04156J](https://doi.org/10.1039/C7CC04156J).
- (80) Li, J.; Cai, C.; Wang, L.; Yang, C.; Jiang, H.; Li, M.; Xu, D.; Li, G.; Li, C.; Yu, G. Chemoenzymatic Synthesis of Heparan Sulfate Mimetic Glycopolymers and Their Interactions with the Receptor for Advanced Glycation End-Product. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8* (12), 1570–1574.



DOI : [10.1021/acsmacrolett.9b00780](https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00780).

**(81)** Tyler, P. C.; Guimond, S. E.; Turnbull, J. E.; Zubkova, O. V. Single-Entity Heparan Sulfate Glycomimetic Clusters for Therapeutic Applications. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (9), 2718–2723.

DOI : [10.1002/anie.201410251](https://doi.org/10.1002/anie.201410251).

**(82)** Zubkova, O. V.; Ahmed, Y. A.; Guimond, S. E.; Noble, S.-L.; Miller, J. H.; Alfred Smith, R. A.; Nurcombe, V.; Tyler, P. C.; Weissmann, M.; Vlodavsky, I.; Turnbull, J. E. Dendrimer Heparan Sulfate Glycomimetics: Potent Heparanase Inhibitors for Anticancer Therapy. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (12), 3236–3242.

DOI : [10.1021/acschembio.8b00909](https://doi.org/10.1021/acschembio.8b00909).

**(83)** Ota, F.; Hirayama, T.; Kizuka, Y.; Yamaguchi, Y.; Fujinawa, R.; Nagata, M.; Ismanto, H. S.; Lepenies, B.; Aretz, J.; Rademacher, C.; Seeberger, P. H.; Angata, T.; Kitazume, S.; Yoshida, K.; Betsuyaku, T.; Kida, K.; Yamasaki, S.; Taniguchi, N. High Affinity Sugar Ligands of C-Type Lectin Receptor Langerin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2018**, *1862* (7), 1592–1601.

DOI : [10.1016/j.bbagen.2018.04.004](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.004).

**(84)** Zhang, X.; Yao, W.; Xu, X.; Sun, H.; Zhao, J.; Meng, X.; Wu, M.; Li, Z. Synthesis of Fucosylated Chondroitin Sulfate Glycoclusters: A Robust Route to New Anticoagulant Agents. *Chemistry – A European Journal* **2018**, *24* (7), 1694–1700.

DOI : [10.1002/chem.201705177](https://doi.org/10.1002/chem.201705177).

**(85)** Liu, H.; Zhang, X.; Wu, M.; Li, Z. Synthesis and Anticoagulation Studies of “Short-Armed” Fucosylated Chondroitin Sulfate Glycoclusters. *Carbohydrate Research* **2018**, *467*, 45–51.

DOI : [10.1016/j.carres.2018.07.008](https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.07.008).

**(86)** Yang, S.; Liu, Q.; Zhang, G.; Zhang, X.; Zhao, Z.; Lei, P. An Approach to Synthesize Chondroitin Sulfate-E (CS-E) Oligosaccharide Precursors. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (11), 5897–5908.

DOI : [10.1021/acs.joc.8b00157](https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00157).

**(87)** Yang, S.; Zhang, H.; Liu, Q.; Sun, S.; Lei, P.; Zhao, Z.; Wu, L.; Wang, Y. The Synthesis and Biological Evaluation of Chondroitin Sulfate E Glycodendrimers. *Future Medicinal Chemistry* **2019**, *11* (12), 1403–1415.

DOI : [10.4155/fmc-2019-0011](https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0011).

**(88)** Tully, S. E.; Mabon, R.; Gama, C. I.; Tsai, S. M.; Liu, X.; Hsieh-Wilson, L. C. A Chondroitin Sulfate Small Molecule That Stimulates Neuronal Growth. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (25), 7736–7737.

DOI : [10.1021/ja0484045](https://doi.org/10.1021/ja0484045).

**(89)** Rawat, M.; Gama, C. I.; Matson, J. B.; Hsieh-Wilson, L. C. Neuroactive Chondroitin Sulfate Glycomimetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (10), 2959–2961.

DOI : [10.1021/ja709993p](https://doi.org/10.1021/ja709993p).

**(90)** Lee, S.-G.; M. Brown, J.; J. Rogers, C.; B. Matson, J.; Krishnamurthy, C.; Rawat, M.; C. Hsieh-Wilson, L. End-Functionalized Glycopolymers as Mimetics of Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Chemical Science* **2010**, *1* (3), 322–325.

DOI : [10.1039/C0SC00271B](https://doi.org/10.1039/C0SC00271B).

**(91)** Vibert, A.; Lopin-Bon, C.; Jacquinet, J.-C. From Polymer to Size-Defined Oligomers: A Step Economy Process for the Efficient and Stereocontrolled Construction of Chondroitin Oligosaccharides and Biotinylated Conjugates Thereof: Part 1. *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15* (37), 9561–9578.

DOI : [10.1002/chem.200900740](https://doi.org/10.1002/chem.200900740).

**(92)** Liu, P.; Chen, L.; Toh, J. K. C.; Ang, Y. L.; Jee, J.-E.; Lim, J.; Lee, S. S.; Lee, S.-G. Tailored Chondroitin Sulfate Glycomimetics via a Tunable Multivalent Scaffold for Potentiating NGF/TrkA-Induced Neurogenesis. *Chem. Sci.* **2014**, *6* (1), 450–456.

DOI : [10.1039/C4SC02553A](https://doi.org/10.1039/C4SC02553A).

**(93)** Domínguez-Rodríguez, P.; Reina, J. J.; Gil-Caballero, S.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. Glycodendrimers as Chondroitin Sulfate Mimetics: Synthesis and Binding to Growth Factor Midkine. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23* (47), 11338–11345.

DOI : [10.1002/chem.201701890](https://doi.org/10.1002/chem.201701890).

- (94) Domínguez-Rodríguez, P.; Vivès, C.; Thepaut, M.; Fieschi, F.; Nieto, P. M.; de Paz, J. L.; Rojo, J. Second-Generation Dendrimers with Chondroitin Sulfate Type-E Disaccharides as Multivalent Ligands for Langerin. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (7), 2726–2734.  
DOI : [10.1021/acs.biomac.0c00476](https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00476).
- (95) Lopin, C.; Jacquinet, J.-C. From Polymer to Size-Defined Oligomers: An Expeditious Route for the Preparation of Chondroitin Oligosaccharides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (16), 2574–2578.  
DOI : [10.1002/anie.200503551](https://doi.org/10.1002/anie.200503551)
- (96) Blatter, G.; Beau, J.-M.; Jacquinet, J.-C. The Use of 2-Deoxy-2-Trichloroacetamido-d-Glucopyranose Derivatives in Syntheses of Oligosaccharides. *Carbohydrate Research* **1994**, *260* (2), 189–202.  
DOI : [10.1016/0008-6215\(94\)84038-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(94)84038-5).
- (97a) Kobayashi, D.; Ueki, A.; Yamaji, T.; Nagao, K.; Imamura, A.; Ando, H.; Kiso, M.; Ishida, H. Efficient Synthesis of the Lewis A Tandem Repeat. *Molecules* **2016**, *21* (5), 614.  
DOI : [10.3390/molecules21050614](https://doi.org/10.3390/molecules21050614).
- (97b) Vermote, A.; Brackman, G.; Risseuw, M. D. P.; Coenye, T.; Van Calenbergh, S. Novel Hamamelitannin Analogues for the Treatment of Biofilm Related MRSA Infections-A Scaffold Hopping Approach. *Eur J Med Chem* **2017**, *127*, 757–770.  
DOI : [10.1016/j.ejmech.2016.10.056](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.056).
- (98) Thèse de Pierre Buisson, Université d'Orléans, **2022**.
- (99) Buisson, P.; Treuillet, E.; Schuler, M.; Lopin-Bon, C. Multigram Scale Preparation of a Semi-Synthetic *N*-Trifluoroacetyl Protected Chondroitin Disaccharide Building Block: Towards the Stereoselective Synthesis of Chondroitin Sulfates Disaccharides. *Carbohydrate Research* **2022**, *512*, 108514.  
DOI : [10.1016/j.carres.2022.108514](https://doi.org/10.1016/j.carres.2022.108514).
- (100) Schmidt, R. R. New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides—Are There Alternatives to the Koenigs-Knorr Method? [New Synthetic Methods (56)]. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1986**, *25* (3), 212–235.  
DOI : [10.1002/anie.198602121](https://doi.org/10.1002/anie.198602121).
- (101) Excoffier, G.; Gagnaire, D.; Uille, J.-P. Coupure Sélective Par l'hydrazine Des Groupements Acétyles Anomères de Résidus Glycosyles Acétylés. *Carbohydrate Research* **1975**, *39* (2), 368–373.  
DOI : [10.1016/S0008-6215\(00\)86150-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)86150-9).
- (102a) Thèse d'Hélène Ledru, Université d'Orléans, **2017**.
- (102b) Li, T.; Li, T.; Sun, Y.; Yang, Y.; Lv, P.; Wang, F.; Lou, H.; Schmidt, R. R.; Peng, P. Regioselective Benzoylation of Unprotected  $\beta$ -Glycopyranosides with Benzoyl Cyanide and an Amine Catalyst – Application to Saponin Synthesis. *Org. Chem. Front.* **2021**, *8* (2), 260–265.  
DOI : [10.1039/D0QO01243B](https://doi.org/10.1039/D0QO01243B).
- (103) Li, Z.; Li, Z.; Sun, X.; Wang, Y.; Meng, X.; Yu, Y.; Sun, A. Bacterial Capsular Oligosaccharide Derivative as Well as Preparation Method, Pharmaceutical Composition and Application Thereof. CN115381844A, **2022**.
- (104) Ramadan, S.; Li, T.; Yang, W.; Zhang, J.; Rashidijahanabad, Z.; Tan, Z.; Parameswaran, N.; Huang, X. Chemical Synthesis and Anti-Inflammatory Activity of Bikunin Associated Chondroitin Sulfate 24-Mer. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6* (6), 913–920.  
DOI : [10.1021/acscentsci.9b01199](https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b01199).
- (105a) Jacquinet, J.-C. An Expeditious Preparation of Various Sulfoforms of the Disaccharide  $\beta$ -d-Galp-(1 $\rightarrow$ 3)-d-Galp, a Partial Structure of the Linkage Region of Proteoglycans, as Their 4-Methoxyphenyl  $\beta$ -d-Glycosides. *Carbohydrate Research* **2004**, *339* (2), 349–359.  
DOI : [10.1016/j.carres.2003.10.012](https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.10.012).
- (105b) Jacquinet, J.-C. Synthesis of a Set of Sulfated and/or Phosphorylated Oligosaccharide Derivatives from the Carbohydrate-Protein Linkage Region of Proteoglycans. *Carbohydrate Research* **2006**, *341* (10), 1630–1644.  
DOI : [10.1016/j.carres.2006.02.011](https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.02.011).
- (106) Tran, A. T.; Deydier, S.; Bonnaffé, D.; Le Narvor, C. Regioselective Green Anomeric Deacetylation Catalyzed by Lanthanide Triflates. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (13), 2163–2165.



DOI : [10.1016/j.tetlet.2008.01.106](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.01.106).

**(107)** Andersen, S. M.; Heuckendorff, M.; Jensen, H. H. 3-(Dimethylamino)-1-Propylamine: A Cheap and Versatile Reagent for Removal of Byproducts in Carbohydrate Chemistry. *Org. Lett.* **2015**, *17* (4), 944–947.

DOI : [10.1021/acs.orglett.5b00041](https://doi.org/10.1021/acs.orglett.5b00041).

**(108a)** Makino, A.; Kurosaki, K.; Ohmae, M.; Kobayashi, S. Chitinase-Catalyzed Synthesis of Alternatingly N-Deacetylated Chitin: A Chitin–Chitosan Hybrid Polysaccharide. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (3), 950–957.

DOI : [10.1021/bm050895d](https://doi.org/10.1021/bm050895d).

**(108b)** Huang, Y.; Shaw, M. A.; Mullins, E. S.; Kirley, T. L.; Ayres, N. Synthesis and Anticoagulant Activity of Polyureas Containing Sulfated Carbohydrates. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (12), 4455–4466.

DOI : [10.1021/bm501245v](https://doi.org/10.1021/bm501245v).

**(109)** Tran, A. T.; Deydier, S.; Bonnafe, D.; Le Narvor, C. Regioselective Green Anomeric Deacetylation Catalyzed by Lanthanide Triflates. *Tetrahedron Letters* **2008**, *49* (13), 2163–2165.

DOI : [10.1016/j.tetlet.2008.01.106](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.01.106).

**(110)** Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004–2021.

DOI : [10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).

**(111)** Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1963**, *2* (11), 633–645.

DOI : [10.1002/anie.196306331](https://doi.org/10.1002/anie.196306331).

**(112)** 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. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41* (14), 2596–2599.

DOI : [10.1002/1521-3773\(20020715\)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020715)41:14<2596::AID-ANIE2596>3.0.CO;2-4).

**(113a)** Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Alkynes and Organic Azides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (46), 15998–15999.

DOI : [10.1021/ja054114s](https://doi.org/10.1021/ja054114s).

**(113b)** Rasmussen, L. K.; Boren, B. C.; Fokin, V. V. Ruthenium-Catalyzed Cycloaddition of Aryl Azides and Alkynes. *Org. Lett.* **2007**, *9* (26), 5337–5339.

DOI : [10.1021/ol701912s](https://doi.org/10.1021/ol701912s).

**(114)** 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.

DOI : [10.1021/jo011148j](https://doi.org/10.1021/jo011148j).

**(115)** 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.

DOI : [10.1021/ja044996f](https://doi.org/10.1021/ja044996f).

**(116)** Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. Isolation of Bis(Copper) Key Intermediates in Cu-Catalyzed Azide–Alkyne “Click Reaction.” *Sci Adv* **2015**, *1* (5), e1500304.

DOI : [10.1126/sciadv.1500304](https://doi.org/10.1126/sciadv.1500304).

**(117)** Tiwari, V. K.; Mishra, B. B.; Mishra, K. B.; Mishra, N.; Singh, A. S.; Chen, X. Cu-Catalyzed Click Reaction in Carbohydrate Chemistry. *Chem Rev* **2016**, *116* (5), 3086–3240.

DOI : [10.1021/acs.chemrev.5b00408](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00408).

**(118)** 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.

DOI : [10.1021/ol0493094](https://doi.org/10.1021/ol0493094).

**(119)** Li, L.; Zhang, Z. Development and Applications of the Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition (CuAAC) as a Bioorthogonal Reaction. *Molecules* **2016**, *21* (10), 1393.

DOI : [10.3390/molecules21101393](https://doi.org/10.3390/molecules21101393).

- (120)** Xie, J.; Deng, X.; Cao, Z.; Shen, Q.; Zhang, W.; Shi, W. Synthesis and Second-Order Nonlinear Optical Properties of Hyperbranched Polymers Containing Pendant Azobenzene Chromophores. *Polymer* **2007**, *48* (20), 5988–5993. DOI : [10.1016/j.polymer.2007.08.024](https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.08.024).
- (121)** Ladd, E.; Sheikhi, A.; Li, N.; van de Ven, T. G. M.; Kakkar, A. Design and Synthesis of Dendrimers with Facile Surface Group Functionalization, and an Evaluation of Their Bactericidal Efficacy. *Molecules* **2017**, *22* (6), 868. DOI : [10.3390/molecules22060868](https://doi.org/10.3390/molecules22060868).
- (122)** Prasch, H.; Hojnik, C.; Lindhorst, T. K.; Didak, B.; Landemarre, L.; Wrodnigg, T. M. New Lectin Ligands: Testing of Amadori Rearrangement Products with a Series of Mannoside-Specific Lectins. *Carbohydrate Research* **2019**, *475*, 65–68. DOI : [10.1016/j.carres.2019.01.010](https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.01.010).



## **Synthèse d'oligosaccharides de sulfates de chondroïtine multivalents (CS) comme nouveaux outils pour l'étude des interactions protéines-CS**

Les sulfates de chondroïtine (CS) sont des macromolécules polysaccharidiques complexes appartenant à la famille des glycosaminoglycanes (GAGs). Les CS sont constitués d'une unité disaccharidique répétitive composée d'un acide D-glucuronique (D-GlcA) et d'une 2-acétamido-2-désoxy-D-galactosamine (D-GalN) et contiennent en moyenne un ou deux groupements sulfates par disaccharide. Les CS les plus courants sont les CS-A (monosulfaté en position 4 de la D-GalN), CS-C (monosulfaté en position 6 de la D-GalN) et les CS-E (disulfatés en position 4 et 6 de la D-GalN). Ils interviennent dans de nombreux processus biologiques tels que l'homéostasie tissulaire du cartilage mais également l'adhésion cellulaire ou la croissance neuronale. Une déficience dans la biosynthèse des CS ou dans leur mécanisme de reconnaissance avec certaines protéines est à l'origine de différentes pathologies comme l'ostéoporose, certains cancers ou encore la maladie d'Alzheimer.

L'objectif de ce projet est de développer et de synthétiser des oligosaccharides de sulfates de chondroïtines multivalents basés sur différentes plateformes afin d'étudier les interactions protéines-CS. Notre stratégie repose sur le greffage d'oligosaccharides (du di- à l'hexasaccharide) de CS-A, CS-C ou CS-E portant un groupement azido sur l'aglycone avec différentes plateformes (aromatique ou aliphatique, protéines, cyclodextrines) fonctionnalisées par un alcynes terminal par chimie click (CuAAC) afin d'obtenir de nouveaux oligosaccharides de CS multivalents.

Plusieurs oligosaccharides de CS diversement sulfatés ainsi qu'une grande librairie de CS multivalents ont été synthétisés. Les objets multivalents ainsi obtenus sont en cours de tests sur différentes protéines (lectines, cathepsines) au travers de collaborations déjà effectives.

Mots clés : sulfates de chondroïtine, multivalence, oligosaccharides, chimie click

## **Synthesis of multivalent chondroitin sulfates (CS) oligosaccharides as new tools for CS-proteins interactions**

Chondroitin sulfates (CS) are structurally complex polysaccharides which belongs to the family of glycosaminoglycans (GAGs). CS are copolymers of dimeric units composed of D-glucuronic acid (D-GlcA) and 2-acetamido-2-deoxy-D-galactose (D-GalN) and contain on average one or two sulfate groups per disaccharide unit. The most common CS are CS-A (monosulfated at position 4 of the D-GalN), CS-C (monosulfated at position 6 of the D-GalN) and CS-E (disulfated at position 4 and 6 of the D-GalN). These structures are ubiquitously present on the cell surface as well as in the extracellular matrix. Due to their rich structural diversity, CS play an important role in a large number of biological processes, such as cell adhesion, cartilage homeostasis and neuronal development. Defect in their biosynthesis or in the mechanism of recognition with various proteins contribute to several diseases including osteoporosis, Alzheimer disease or cancer.

The objective of this project is to develop and synthesize multivalent CS oligosaccharides composed of CS-A, CS-C or CS-E oligosaccharides (from di- to hexasaccharide) anchored on various cores in order to study CS-proteins interactions. Our strategy relies on the ligation of new CS oligosaccharides fragments bearing an azido group on the aglycone and various platforms (aromatic or aliphatic, proteins, cyclodextrins) bearing a terminal alkyne, via click chemistry (CuAAC) to build new multivalent CS oligosaccharides.

Five new variously sulfated CS oligosaccharides and twelve new multivalent oligosaccharides were synthesized. The multivalent compounds will be assessed for their binding with different proteins (lectins, cathepsins) thanks to various ongoing collaborations.

Keywords: chondroitin sulfates, multivalency, oligosaccharides, click chemistry



**Institut de Chimie Organique et Analytique  
Université d'Orléans, Pôle Chimie,  
BP 6759, Rue de Chartres,  
45067 Orléans**

