

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 123**

51 Int. Cl.:

C07H 13/04 (2006.01)

C07H 17/075 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2010 E 10729677 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2385950**

54 Título: **Procedimiento para la 2-sulfatación de glucósidos**

30 Prioridad:

12.01.2009 US 144024 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.05.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON (100.0%)
4311 11th Avenue NE, Suite 500
Seattle, WA 98105-4608, US**

72 Inventor/es:

**GELB, MICHAEL H. y
BLANCHARD, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 464 123 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la 2-sulfatación de glucósidos

5 Antecedentes de la invención

[0001] El desarrollo de la nueva tecnología para el cribado neonatal del síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis II) está garantizado debido al desarrollo de tratamientos que son muy eficaces cuando se inician en etapas tempranas de la vida. Esta enfermedad de almacenamiento lisosómico está causada por la
10 deficiencia de la enzima iduronato-2-sulfatasa, que es necesaria para la degradación de sulfato de dermatano y sulfato de heparano, dos componentes de los glucosaminoglucanos celulares. El ensayo de esta sulfatasa requiere el uso de glucósidos de α -L-iduronato que contienen un sulfato en posición 2.

[0002] Los sustratos sintéticos usados para ensayar iduronato-2-sulfatasa *in vitro* son habitualmente
15 disacáridos sulfatados derivados de la degradación con ácido nitroso de heparina. Dichos sustratos han sido útiles para el desarrollo de un ensayo de espectrometría de masas en tándem para el cribado neonatal del síndrome de Hunter. Sin embargo, más recientemente se ha puesto en evidencia que la síntesis a gran escala usando la degradación por ácido nitroso de heparina es impracticable para obtener la cantidad de material necesaria para soportar el cribado neonatal mundial del síndrome de Hunter.

[0003] Abad-Romero, Beatriz, *et al.*, 2009 describe xilobiósido de metilo y xilotriósido de metilo preparados a
20 partir de tricloroacetamidatos de xilosilo anoméricos peracetilados mediante reacción con metanol seguida de desacetilación de Zemplén.

[0004] El documento US 5.874.548 A describe un procedimiento directo para la sulfatación regioselectiva de
25 una molécula orgánica que tiene grupos hidroxilo opcionalmente derivatizados en al menos dos átomos de carbono adyacentes.

[0005] El documento US 5.783.693 A da a conocer disacáridos sulfatados caracterizados por la capacidad de
30 inhibir la unión de selectina a su ligando fisiológicamente relevante

[0006] El documento US 6.184.196 B1 describe la síntesis de compuestos de sacarosa sulfonados, tensoactivos y sulfatos cíclicos intermedios.

[0007] Davis, B. G., *et al.*, 1999 revisa la síntesis y aplicación de glucoconjugados y Gridley, J. J., *et al.*, 2000 describe la construcción de ligamientos de β -D-manosa y β -D-manosamina.

[0008] Existe la necesidad de un nuevo procedimiento para la síntesis total de sustratos apropiados que
40 puedan usarse a escala de decenas de gramos al año.

SUMARIO DE LA INVENCION

[0009] La presente invención proporciona un procedimiento para sulfatar un glucósido en la posición 2. En una realización, el procedimiento incluye tratar un glucósido que tiene grupos hidroxilo en posiciones 2 y 4 en
45 relación cis con un reactivo de estaño, proporcionando un glucósido de acetal de 2,4-estannileno, y tratar el acetal de 2,4-estannileno con un agente de sulfatación, proporcionando un glucósido 2-sulfatado. El procedimiento de la invención sulfata selectivamente la posición 2 del glucósido preferentemente a la posición 4. En una realización, se sulfata el glucósido 2-sulfatado en la posición 2 con una selectividad mayor de aproximadamente un 90 % (respecto a la sulfatación en posición 4). En una realización, se sulfata el glucósido 2-sulfatado en la posición 2 con una
50 selectividad que es mayor de aproximadamente un 95 % (respecto a la sulfatación en posición 4).

[0010] En una realización, el glucósido es glucósido de iduronato. En una realización, el glucósido es un glucósido de α -L-iduronato.

[0011] Los reactivos de estaño útiles en el procedimiento de la invención incluyen reactivos de estaño capaces de formar acetales de estannileno. Los reactivos de estaño representativos incluyen óxidos de dialquilestaño (IV) tales como óxido de dibutylestaño (IV).

[0012] Los agentes de sulfatación útiles en el procedimiento de la invención incluyen reactivos de trióxido de azufre tales como complejos de trióxido de azufre con trimetilamina, complejos de piridina y trióxido de azufre con
60 *N,N*-dimetilformamida.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013] Los aspectos anteriores y muchas de las ventajas acompañantes de esta invención se apreciarán más fácilmente y la misma resultará mejor entendida por referencia a la siguiente descripción detallada, cuando se tome

junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la FIGURA 1 es una ilustración esquemática de la 2-sulfatación selectiva de un glucósido de iduronato representativo de acuerdo con el procedimiento de la invención;

5

la FIGURA 2 es una ilustración esquemática de la síntesis de un material de partida de glucósido de iduronato (éster metílico de glucósido de α -L-iduronato) útil en la 2-sulfatación de un glucósido de iduronato representativo de acuerdo con el procedimiento de la invención; y

10 la FIGURA 3 es una ilustración esquemática de la 2-sulfatación selectiva de un glucósido de iduronato generalizado de acuerdo con el procedimiento de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 **[0014]** La presente invención proporciona un procedimiento para sulfatar un glucósido de α -L-iduronato en la posición 2. En una realización, el procedimiento incluye tratar dicho glucósido con un reactivo de estaño, proporcionando un acetal de 2,4-estannileno de glucósido, y tratar el acetal de 2,4-estannileno con un agente de sulfatación, proporcionando un glucósido 2-sulfatado.

20 **[0015]** La naturaleza de la aglicona de glucósido no es crítica en el procedimiento de la invención. Las gliconas adecuadas no interfieren con la sulfatación del procedimiento. Las gliconas representativas incluyen compuestos aromáticos (por ejemplo, compuestos que contienen fenilo o bencilo ligados a través del grupo aromático, por ejemplo, cumarinas), otros carbohidratos y compuestos policíclicos (por ejemplo, esteroides).

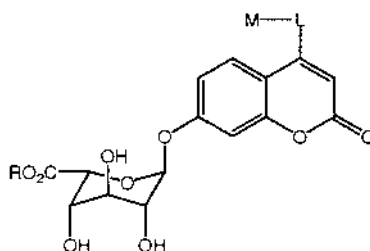
25 **[0016]** El procedimiento de la invención sulfata selectivamente la posición 2 del glucósido preferentemente a la posición 4. En una realización, se sulfata el glucósido 2-sulfatado en la posición 2 con una selectividad mayor de aproximadamente un 90 % (respecto a la sulfatación en la posición 4). En una realización, se sulfata el glucósido 2-sulfatado en la posición 2 con una selectividad mayor de aproximadamente un 95 % (respecto a la sulfatación en la posición 4).

30

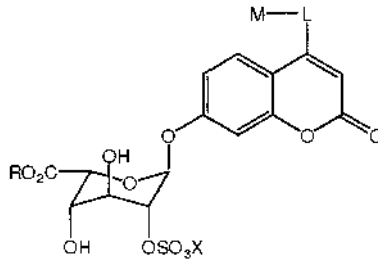
[0017] Como se observa anteriormente, la naturaleza de la aglicona del glucósido puede variar ampliamente. En una realización, el glucósido es un glucósido de iduronato. Los sulfatos de glucósido de α -L-iduronato formados mediante el procedimiento de la invención son útiles en ensayos de la enzima iduronato-2-sulfatasa en el cribado neonatal de síndrome de Hunter (mucopolisacaridosis II).

35

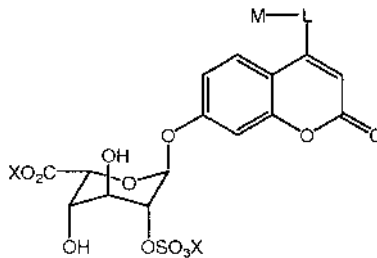
[0018] En una realización, el glucósido es un glucósido de iduronato que tiene la fórmula:



40 en la que el glucósido forma un ión original cuando se somete a espectrometría de masas en tándem con ionización por electropulverización, M es un resto que se escinde del ión original, proporcionando un ión fragmentado por disociación inducida por colisión, L liga covalentemente M con el resto glucósido y R es un grupo alquilo C_1 - C_6 . Los grupos M representativos incluyen butiloxycarbonilo (M es $C_4H_9OC(=O)-$). Los grupos L representativos incluyen ligamientos tales como $-NH-(CH_2)_n-NHC(=O)CH_2-$, en que n es 1-8. La sulfatación de este glucósido de iduronato
45 proporciona un glucósido 2-sulfatado que tiene la fórmula:

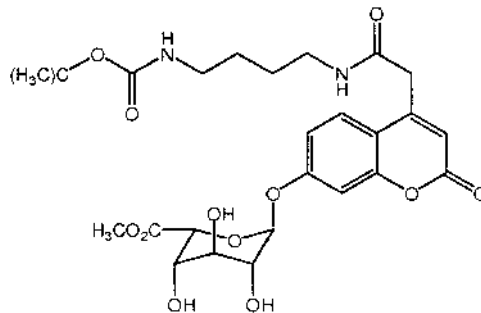


en la que M, L y R son como anteriormente y X es un hidrógeno o un contraión. Los grupos X representativos incluyen iones de amonio tales como ion de trimetilamonio e iones metálicos tales como ión de sodio. La saponificación de este glucósido de iduronato 2-sulfatado proporciona un glucósido de iduronato que tiene la fórmula:



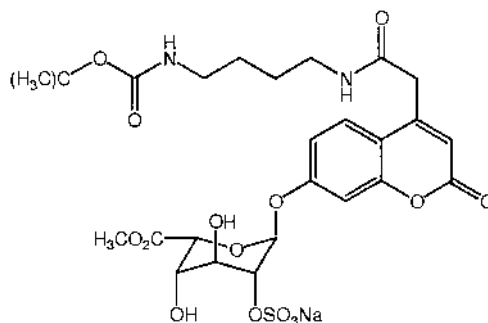
10 en la que M, L y X son como anteriormente.

[0019] En otra realización, el glucósido es un glucósido de α -L-iduronato que tiene la fórmula:

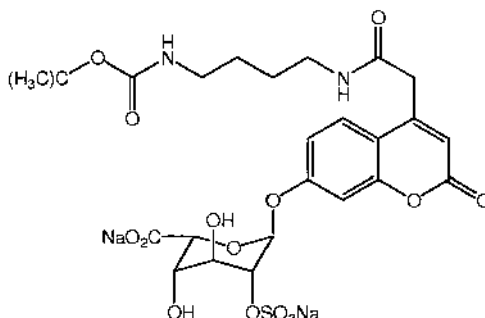


15

La sulfatación de este glucósido de iduronato proporciona un glucósido 2-sulfatado que tiene la fórmula:



La saponificación de este glucósido de iduronato 2-sulfatado proporciona un glucósido de iduronato que tiene la fórmula:



5

El glucósido de iduronato 2-sulfatado saponificado es útil en ensayos de enzima iduronato-2-sulfatasa como se describe a continuación.

[0020] Los reactivos de estaño útiles en el procedimiento de la invención incluyen reactivos de estaño capaces de formar acetales de estannileno. Los reactivos de estaño representativos incluyen óxidos de dialquilestaño (VI) tales como óxido de dibutilestaño (IV).

[0021] Los agentes de sulfatación útiles en el procedimiento de la invención incluyen reactivos de trióxido de azufre tales como complejos de trióxido de azufre con trimetilamina, complejo de piridina y trióxido de azufre con *N,N*-dimetilformamida.

[0022] Como se observa anteriormente, en una realización la presente invención proporciona un procedimiento para la 2-sulfatación selectiva de glucósidos de iduronato. Aunque existen una serie de informes de la síntesis de bloques de construcción de sacárido sulfatado que se han usado para preparar fragmentos de heparina y sulfato de heparano, no existen informes sobre la incorporación fácil del sulfato a la posición 2 de glucósidos de α -L-iduronato. En el procedimiento de la invención, los glucósidos de iduronato se sulfatan en la posición 2 con una selectividad mayor de un 90 % en comparación con la sulfatación en la posición 4.

[0023] El compuesto 2-sulfatado puede usarse para ensayar iduronato-2-sulfatasa usando un ensayo fluorimétrico o mediante espectrometría de masas en tándem con ionización por electropulverización. El ensayo fluorimétrico se posibilita por la presencia del resto umbeliferilo. En este caso, la mezcla de ensayo se suplementa con la enzima α -L-iduronidasa, que escinde el ligamiento glucosídico liberando la umbeliferona fluorescente solo después de que la iduronato-2-sulfatasa retire el grupo 2-sulfato. Para el ensayo de espectrometría de masas en tándem, no es necesaria la enzima de acoplamiento α -L-iduronidasa. En este caso, se detecta el glucósido de α -L-iduronato desulfatado directamente por espectrometría de masas en tándem. La presencia del grupo butiloxicarbonilo (BOC) dirige la estabilidad del ión original de modo que la fragmentación proceda exclusivamente mediante la escisión del carbamato (pérdida de 100 Da).

[0024] En una realización, la invención proporciona un proceso en tres etapas para la introducción de sulfato en la posición 2 partiendo de un éter de glucósidos de iduronato (por ejemplo, un glucósido de α -L-iduronato). El procedimiento implica la protección de los grupos 2- y 4-hidroxilo del resto iduronato como acetal de dibutilestannileno, la sulfatación selectiva con trióxido de azufre-trimetilamina y la desprotección del éster, proporcionando el 2-sulfato deseado.

[0025] Se describe en el ejemplo 2 una ilustración esquemática de la 2-sulfatación selectiva de un glucósido de iduronato representativo (concretamente, glucósido de α -L-iduronato) de acuerdo con el procedimiento de la invención, y se ilustra en la FIGURA 1. Con respecto a la FIGURA 1, la preparación empieza con el éster metílico de glucósido de α -L-iduronato 9b, preparado como se describe en el ejemplo 1 e ilustrado esquemáticamente en la FIGURA 2. El tratamiento del éster metílico 9b con 1,5 equivalentes de óxido de dibutilestaño en metanol anhidro a reflujo protege los grupos 2- y 4-hidroxilo como acetal de estannileno. Se usó el acetal sin purificación adicional. Se disolvió el acetal en *N,N*-dimetilformamida anhidra y se trató con 1,5 equivalentes de complejo de trióxido de azufre-trimetilamina durante 24 h a 55 °C. Se sometió el producto bruto a cromatografía de intercambio catiónico para convertir la sal de trimetilamonio del sulfato en la sal de sodio, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, proporcionando el éster metílico 2-sulfatado 10. Se solubilizó el éster metílico 2-sulfatado 10 en metanol/agua y se trató con cantidades incrementales de hidróxido de sodio acuoso para saponificar el éster metílico. Se purificó el producto bruto por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, dando el glucósido 2-sulfatado 11 con 96 % de pureza (61 % de rendimiento global del compuesto 9b). Se confirmó la estructura por RMN-¹H y espectrometría de masas con ionización por electropulverización. Se mostró la selectividad de la sulfatación por análisis de RMN-¹H, que indicó que un 96 % del producto está sulfatado en posición 2 y un 4 % en

posición 4.

[0026] Debido a que no hay ninguna enzima conocida capaz de hidrolizar el sulfato en posición 4, la retirada de las cantidades traza de 4-sulfato no es necesaria antes del ensayo enzimático del síndrome de Hunter. El procedimiento de la invención proporciona el sustrato de iduronato-2-sulfato 11 útil en el ensayo de cribado neonatal del síndrome de Hunter.

[0027] Se proporcionan los siguientes ejemplos con el fin de ilustrar, y no limitar, la invención.

10 Ejemplos

Procedimientos generales

[0028] Se llevaron a cabo las reacciones en disolventes secos en recipientes de vidrio secados en estufa en atmósfera de N₂. Se llevó a cabo la cromatografía en capa fina en placas de sílice (gel de sílice 60, F-254 (0,25 mm)). Se reseñan los desplazamientos químicos de RMN-¹H en partes por millón (δ) usando el pico de metanol como patrón interno (3,31 ppm). Se adquirieron los espectros de masas con ionización por electropulverización en un espectrómetro de trampa iónica Bruker Esquire LC00066. Se llevó a cabo la cromatografía ultrarrápida con gel de sílice (40-63 μ m).

Ejemplo 1

Preparación de éster metílico de glucósido de α -L-iduronato

[0029] Se describe a continuación la preparación del éster metílico de glucósido de α -L-iduronato **9b** y se ilustra en la FIGURA 2.

[0030] (2,3,4-Tri-O-acetil- β -D-glucopiranosilfluoruro)uronato de metilo (**2**). Se suspendió 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α , β -D-glucopiranosiluronato de metilo **1** (4,98 g, 13,25 mmol, 1 eq) a 0 °C en 67 ml de ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético en atmósfera de nitrógeno. Después de agitar durante 15 min a 0 °C, se dejó calentar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 h. Se diluyó entonces la mezcla de reacción con tolueno y se concentró a vacío. Se diluyó el residuo con 250 ml de acetato de etilo y se lavó con 150 ml de bicarbonato de sodio saturado frío y 150 ml de salmuera fría. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío, proporcionando el derivado de bromuro bruto usado directamente en la siguiente etapa. Se disolvió el intermedio bromuro en 167 ml de acetonitrilo anhidro en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió entonces fluoruro de plata (3,36 g, 26,49 mmol, 2 eq). Se agitó la mezcla de reacción durante un total de 21 h en la oscuridad. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el filtrado a vacío. La cromatografía en columna en sobre gel de sílice (hexano:AcOEt 4:1 a 2:1) proporcionó el producto **2** (3,3 g, 74 %).

[0031] (5-Bromo-2,3,4-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosilfluoruro)uronato de metilo (**3**). Se agitó una suspensión de **2** (3,3 g, 9,8 mmol, 1 eq) y *N*-bromosuccinimida (3,32 g, 18,65 mmol, 1,9 eq) en tetracloruro de carbono anhidro en atmósfera de nitrógeno y a reflujo con irradiación durante un total de 6 h. Se añadió *N*-bromosuccinimida (3,32 g, 18,65 mmol, 1,9 eq) después de 2 y 4 h de reacción. Se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se filtró a través de lana de vidrio. Se retiró el disolvente a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (hexano:AcOEt 3:1) proporcionó el producto **3** (3,12 g, 77 %).

[0032] (2,3,4-Tri-O-acetil- α -L-idopiranosilfluoruro)uronato de metilo (**4**). Se disolvió el bromuro **3** (3,16 g, 7,61 mmol, 1 eq) en 50 ml de benceno anhidro y se agitó en atmósfera de nitrógeno. Se añadió hidruro de tributilestano (3,1 ml, 11,4 mmol, 1,5 eq) y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 40 min. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se retiró el disolvente a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno:AcOEt 8:1 a 6:1) proporcionó el producto **4** (1,67 g, 65 %).

[0033] 7-Acetoxicumarin-4-acetato de (2',2',2'-tricloroetilo) (**6a**). Se añadió 2,2,2-tricloroetanol (431 μ l, 4,5 mmol, 1,25 eq) a una suspensión de ácido 7-acetoxicumarin-4-acético **5** (945 mg, 3,6 mmol, 1 eq) en 47 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Se añadió una disolución de *N,N*-dodiclohexilcarbodiimida (818 mg, 4 mmol, 1,1 eq) en 10 ml de diclorometano anhidro. Se agitó la mezcla de reacción durante 15 min, después de lo cual se diluyó con diclorometano y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ y después CH₂Cl₂:AcOEt, 10:1) proporcionó el producto **6a** (1,37 g, 96 %): R_f 0,78 (CH₂Cl₂:AcOEt, 5:1); RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,61 (d, 1H, J_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 7,15 (d, 1H, J_{6,8} 2,1 Hz, H-8), 7,07 (dd, 1H, J_{6,8} 2,3, J_{5,6} 8,7 Hz, H-6), 6,42 (s, 1H, H-3), 4,77 (s, 2H, CH₂CCl₃), 3,91 (2s, 2H, CH₂CO₂), 2,33 (s, 3H, OAc); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 168,6, 167,0, 154,5, 153,5, 146,5, 125,5, 118,5, 117,0, 116,5, 110,9, 74,6, 37,7, 21,2; ESI-EM: *m/z* 393 [M+H]⁺.

[0034] 7-Hidroxycumarin-4-acetato de (2',2',2'-tricloroetilo) (**6b**). Se preparó una disolución de **6a** (1,08 g, 2,74 mmol, 1 eq) en 108 ml de tetrahidrofurano anhidro en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió gota a gota una disolución de amoniaco 2 M en 2-propanol (6,8 ml, 13,7 mmol, 5 eq). Se agitó la mezcla de reacción

a temperatura ambiente en un matraz sellado fuertemente durante 18 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ y después CH₂Cl₂:AcOEt 10:1 a 5:1) proporcionó el producto **6b** (753 mg, 78 %): R_f 0,6 (CH₂Cl₂:AcOEt, 5:1); RMN-¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,55 (d, 1H, J_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 6,79 (dd, 1H, J_{6,8} 2,3, J_{5,6} 8,7 Hz, H-6), 6,74 (d, 1H, J_{6,8} 2,3 Hz, H-8), 6,31 (s, 1H, H-3), 4,94 (s, 2H, CH₂CCl₃), 4,14 (2s, 2H, CH₂CO₂); RMN-¹³C (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168,4, 161,8, 160,5, 155,5, 149,2, 127,3, 113,5, 112,9, 111,5, 102,8, 95,5, 74,0, 36,9; ESI-EM: *m/z* 351 [M+H]⁺.

[0035] 7-O-(Metil-2',3',4'-tri-O-acetil-α-L-idopiranosiluronato)cumarin-4-acetato de (2",2",2"-triclouroetilo) (**7**). Se agitó una suspensión de **6b** (703 mg, 2 mmol, 1,26 eq) y LiClO₄ / SiO₂ (200 mg) en 2 ml de diclorometano anhidro a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota 1,1,1,3,3,3-hexametildisilazano (835 μl, 4 mmol, 2,52 eq). Se agitó la mezcla de reacción durante 35 min. Se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano y se filtró. Se concentró el filtrado por rotavapor, proporcionando 7-O-trimetilsilicumarin-4-acetato de (2',2',2'-triclouroetilo) **6c**, que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Se enfrió a 0 °C una disolución del donante de glucosilo **4** (534 mg, 1,6 mmol, 1 eq) y el aceptor de glucosilo previamente preparado **6c** en 10 ml de diclorometano anhidro en atmósfera de nitrógeno. Se añadió gota a gota trifluoruro de boro-eterato de dietilo (196 μl, 1,6 mmol, 1 eq), después de lo cual se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Se selló fuertemente el matraz de reacción, se agitó la mezcla de reacción durante 1,5 h y se añadió trifluoruro de boro-eterato de dietilo (88 μl). Después de agitar durante 20 min, se diluyó la reacción con 200 ml de diclorometano y se lavó con 100 ml de agua, 100 ml de bicarbonato de sodio saturado y 100 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío con coevaporaciones adicionales con tolueno. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ y después CH₂Cl₂:AcOEt 10:1 a 5:1) proporcionó el producto **7** (934 mg, 88 %): [α]_D -80° (c1, CHCl₃); R_f 0,5 (CH₂Cl₂:AcOEt 5:1); RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,53 (d, 1H, J_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 7,06 (d, 1H, J_{6,8} 2,5 Hz, H-8), 7,01 (dd, 1H, J_{6,8} 2,5, J_{5,6} 8,9 Hz, H-6), 6,33 (s, 1H, H-3), 5,84 (d, 1H, J_{1',2'} 2,5 Hz, H-1'), 5,20 (m, 2H, H-3', H-4'), 5,05 (m, 1H, H-2'), 4,89 (m, 1H, H-5'), 4,77 (2s, 2H, CH₂CCl₃), 3,87 (s, 2H, CH₂CO₂), 3,77 (s, 3H, CO₂Me), 2,16-2,09 (3s, 9H, 3 OAc); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169,5, 169,4, 169,0, 167,9, 167,2, 160,2, 158,9, 155,3, 146,7, 126,0, 115,7, 114,1, 113,2, 104,9, 95,7, 94,5, 74,6, 67,8, 67,0, 66,8, 52,9, 37,7, 20,9, 20,9, 20,7; ESI-EM: *m/z* 667 [M+H]⁺.

[0036] 7-O-(Metil-2',3',4'-tri-O-acetil-α-L-idopiranosiluronato)cumarin-4-acetamida de (N-[4"-(*terc*-butoxicarbonilamino)butilo]) (**9a**). Se disolvió el glucósido **7** (831 mg, 1,2 mmol, 1 eq) en 41 ml de tetrahidrofurano anhidro a temperatura ambiente. Se enfrió la disolución a 0 °C y se añadió ácido acético acuoso al 90 % (5,5 ml). Finalmente, se añadieron cloruro de cobre (167 mg, 1,2 mmol, 1 eq) y cinc en polvo (813 mg, 12,4 mmol, 10 eq). Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante un total de 39 h, durante las cuales se añadió cinc en polvo (813 mg, 12,4 mmol, 10 eq) después de 15 y 25 h de reacción. Se filtró la mezcla de reacción a través de Celite y se concentró el filtrado a vacío. Se solubilizó el residuo en 200 ml de diclorometano y se lavó con 150 ml de agua (dos veces) y 150 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ y después CH₂Cl₂:AcOEt 5:1 a 2:1; todos los disolventes con 1 % de ácido acético) proporcionó el producto **8** (634 mg, 95 %). Se enfrió a 0 °C una disolución del ácido **8** (627 mg, 1,2 mmol, 1 eq) en 20 ml de tetrahidrofurano anhidro. Se añadieron clorhidrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (245 mg, 1,28 mmol, 1,1 eq) y 1-hidroxibenzotriazol (196 mg, 1,28 mmol, 1,1 eq) y se agitó la suspensión durante 30 min a 0 °C. Se añadió lentamente a la suspensión una disolución de *N*-Boc-1,4-diaminobutano (223 μl, 1,2 mmol, 1 eq) en 2 ml de *N,N*-dimetilformamida anhidra. Se dejó calentar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío. Se recogió el residuo en 250 ml de acetato de etilo y se lavó con 150 ml de HCl 1 M, 150 ml de agua y 150 ml de salmuera. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄ y se concentró a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (tolueno:acetona 3:1 a 2:1) proporcionó el producto **9a** (528 mg, 65 %): [α]_D -70° (c 0,85, CHCl₃); R_f 0,38 (CH₂Cl₂:MeOH, 95:5); RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (d, 1H, J_{5,6} 8,7 Hz, H-5), 7,03 (d, 1H, J_{6,8} 2,3 Hz, H-8), 6,99 (dd, 1H, J_{6,8} 2,5, J_{5,6} 8,7 Hz, H-6), 6,29 (s, 1H, H-3), 5,84 (d, 1H, J_{1',2'} 2,1 Hz, H-1), 5,20 (m, 2H, H-3', H-4'), 5,04 (m, 1H, H-2'), 4,89 (d, 1H, J_{4',5'} 2,1 Hz, H-5'), 3,77 (s, 3H, CO₂Me), 3,65 (s, 2H, CH₂CONH), 3,26 (m, 2H, CH₂NHCO), 3,09 (m, 2H, CH₂NHCO), 2,17-2,09 (3s, 9H, 3 OAc), 1,49 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1,42 (s, 9H, CMe₃); RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 169,4, 169,4, 169,0, 167,8, 167,6, 160,7, 158,8, 156,4, 155,2, 149,7, 126,7, 114,5, 114,5, 113,2, 104,5, 95,6, 79,4, 67,7, 66,9, 66,6, 52,8, 39,8, 28,5, 20,8, 20,8, 20,6; ESI-EM: *m/z* 707 [M+H]⁺.

[0037] 7-O-(α-L-idopiranosiluronato)cumarin-4-acetamida de (N-[4"-(*terc*-butoxicarbonilamino)butilo]) (**9b**). Se enfrió a 0 °C una disolución de **9a** (98 mg, 0,165 mmol, 1 eq) en 16 ml de metanol. Se añadió gota a gota una disolución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol (140 μl, 0,07 mmol, 0,4 eq). Se agitó la mezcla de reacción a 0 °C durante 1,5 h. Se neutralizó la mezcla de reacción con Amberlite IR-120 (H⁺) y se filtró. Se concentró el filtrado a vacío. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (CH₂Cl₂ y después CH₂Cl₂:MeOH 9:1) proporcionó el producto **9b** (69 mg, 86 %): RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 7,69 (d, 1H, J_{5,6} 9,7 Hz, H-5), 7,14 (d, 1H, J_{6,8} 2,3 Hz, H-8), 7,13 (dd, 1H, H-6), 6,28 (s, 1H, H-3), 5,76 (d, 1H, J_{1',2'} 3,9 Hz, H-1'), 4,75 (d, 1H, J_{4',5'} 3,5 Hz, H-5'), 3,97-3,89 (m, 2H, H-2', H-3'), 3,77 (s, 3H, CO₂Me), 3,74 (s, 2H, CH₂CONH), 3,73 (m, 1H, H-4'), 3,21 (m, 2H, CH₂NHCO), 3,03 (m, 2H, CH₂NHCO), 1,49 (m, 4H, CH₂-CH₂), 1,42 (s, 9H, CMe₃); ESI-EM: *m/z* 581 [M+H]⁺.

Ejemplo 2

65

Preparación de glucósido de α -L-iduronato 2-sulfatado 11

[0038] Se describe a continuación la preparación del glucósido de α -L-iduronato 2-sulfatado **11** y se ilustra en la FIGURA 1.

5

[0039] Síntesis de éster metílico de glucósido de α -L-iduronato 10. Se solubilizó el material de partida **9b** (164,5 mg, 0,28 mmol, 1 eq), preparado como se describe en el ejemplo 1, en 16 ml de metanol anhidro y se añadió óxido de dibutilestaño (IV) (106 mg, 0,42 mmol, 1,5 eq, Aldrich). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 40 minutos, después de lo cual se disolvió completamente el óxido de dibutilestaño. Se dejó enfriar la mezcla de reacción y se concentró a vacío. Se coevaporó el residuo una vez para retirar las trazas de agua.

10

[0040] Se solubilizó el residuo en 16 ml de *N,N*-dimetilformamida anhidra. Se añadió complejo de trióxido de azufre-trimetilamina (59,1 mg, 0,42 mmol, 1,5 eq, Aldrich) y se calentó la mezcla de reacción a 55 ° C durante 24 horas. Se dejó enfriar la mezcla de reacción y se inactivó entonces con metanol, antes de concentrar a vacío. Para convertir el producto de sal de trimetilamonio en sal de sodio, se sometió el residuo a cromatografía de intercambio catiónico [Dowex 50WX8-400 (Na⁺), 1 x 4 cm] usando metanol como eluyente. Se purificó la sal de sodio por cromatografía en columna sobre sílice usando metanol/cloroformo/agua (5/8/1), dando el éster metílico de glucósido de α -L-iduronato **10**. TLC (sílice, metanol/cloroformo/agua 5/8/1): R_f = 0,6. RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD): 1,43 (s, 9H, *tert*-butilo); 1,50 (m, 4H, CH₂CH₂); 3,04 (m, 2H, CH₂N); 3,21 (t, 2H, CH₂N); 3,74 (s a, 2H, CH₂CO); 3,76 (s, 3H, CO₂Me); 3,99 (t a, 1H, H-4); 4,19 (t a, 1H, H-3); 4,50 (m, 1H, H-2); 4,81 (d, 1H, H-5); 6,00 (s a, 1H, H-1); 6,28 (s, 1H, CH de cumarinvinilo); 7,16-7,19 (m, 2H, CH de cumarina); 7,70 (d, 1H, CH de cumarina).

15

20

[0041] Síntesis de glucósido de α -L-iduronato 2-sulfatado 11. Se solubilizó el compuesto **10** en 15,4 ml de metanol/agua (1/1) a temperatura ambiente. Se añadió una disolución acuosa de hidróxido de sodio 0,1 M en incrementos de 0,1 eq de NaOH (283 μ l, 0,03 mmol) hasta que el pH de la disolución alcanzó aproximadamente 8 (papel pH). Se mantuvo el pH por adiciones incrementales de la disolución de NaOH 0,1 M a medida que procedía la reacción (cada 15-30 minutos). Se agitó la mezcla de reacción durante 5,5 h (1,3 eq. de NaOH añadidos), después de lo cual se concentró a vacío para retirar el metanol y finalmente se liofilizó durante una noche. Se purificó el residuo por cromatografía en columna sobre sílice usando metanol/cloroformo/agua (5/8/1), dando el glucósido de α -L-iduronato 2-sulfatado **11** (96 % de 2-sulfatado, 4 % de 4-sulfatado) con 61 % de rendimiento global a partir del compuesto **9b**. TLC (sílice, metanol/cloroformo/agua, 5/8/1): R_f = 0,2. RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD): 1,43. (s, 9H, *tert*-butilo); 1,50 (m, 4H, CH₂CH₂); 3,04 (t, 2H, CH₂N); 3,21 (t, 2H, CH₂N); 4,07 (s a, 1H, H-4); 4,17 (s a, 1H, H-3); 4,48 (s a, 1H, H-2); H-5 bajo el pico del agua; 6,14 (s a, 01H, H-1); 6,17 (s, 1H, CH de cumarinvinilo); 7,07-7,12 (m, 2H, CH de cumarina); 7,53 (d, 1H, CH de cumarina). Espectrometría de masas con ionización por electropulverización: (modo negativo) (M-H)⁻¹, calculado 645,2, observado 645,3.

25

30

35

[0042] Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones ilustrativas, se apreciará que pueden hacerse diversos cambios en las mismas sin apartarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sulfatar un glucósido de α -L-iduronato en posición 2, que comprende:

- 5 a) tratar un glucósido de α -L-iduronato que tiene grupos hidroxilo en posiciones 2 y 4 en relación cis con un reactivo de estaño, proporcionando un acetal de 2,4-estannileno de glucósido de α -L-iduronato; y
- b) tratar el acetal de 2,4-estannileno con un agente de sulfatación, proporcionando un glucósido de α -L-iduronato 2-sulfatado.

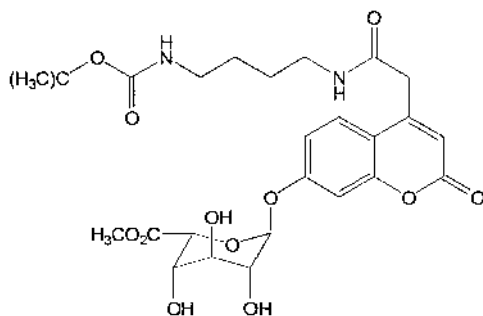
10

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el glucósido 2-sulfatado se sulfata en posición 2 con una selectividad mayor del 90 %, preferiblemente en el que el glucósido 2-sulfatado se sulfata en posición 2 con una selectividad mayor del 95 %.

15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el reactivo de estaño es un óxido de dialquilestaño (VI) o en el que el reactivo de estaño es óxido de dibutilestaño (IV).

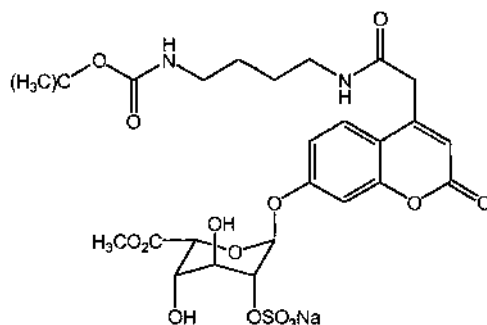
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente de sulfatación es trióxido de azufre; preferiblemente en el que el agente de sulfatación es un complejo de trióxido de azufre seleccionado del grupo consistente en complejo de trióxido de azufre y trimetilamina, complejo de trióxido de azufre y piridina y complejo de trióxido de azufre y *N,N*-dimetilformamida.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el glucósido de iduronato tiene la fórmula:



25

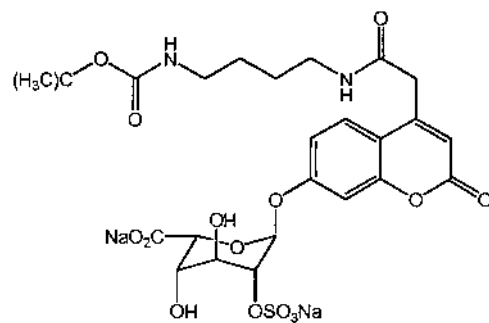
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el glucósido de iduronato 2-sulfatado tiene la fórmula:



30

7. El procedimiento de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente saponificar el éster metílico de glucósido de iduronato 2-sulfatado, proporcionando un glucósido de iduronato 2-sulfatado que tiene la fórmula:

ES 2 464 123 T3



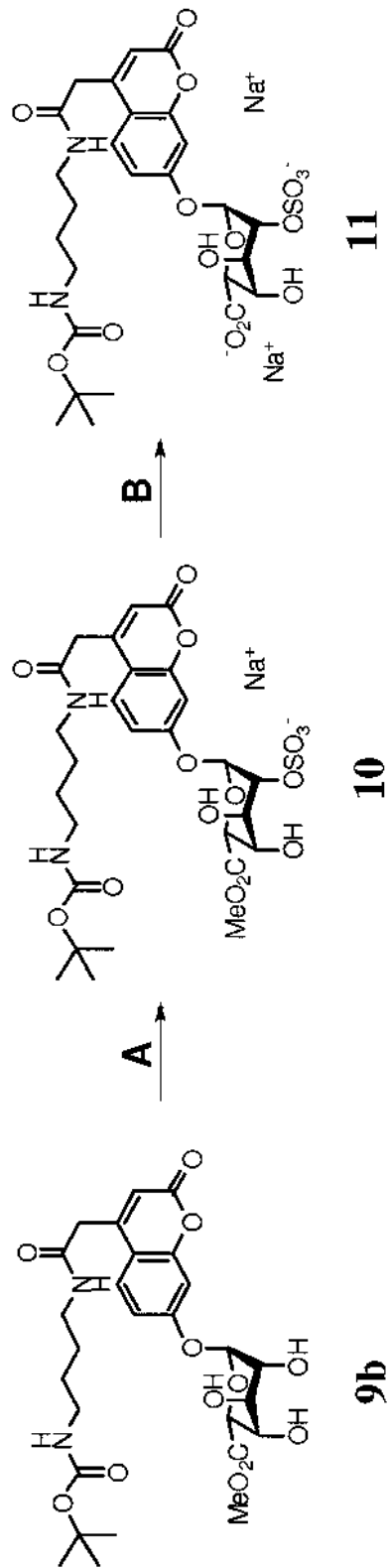


FIG. 1.

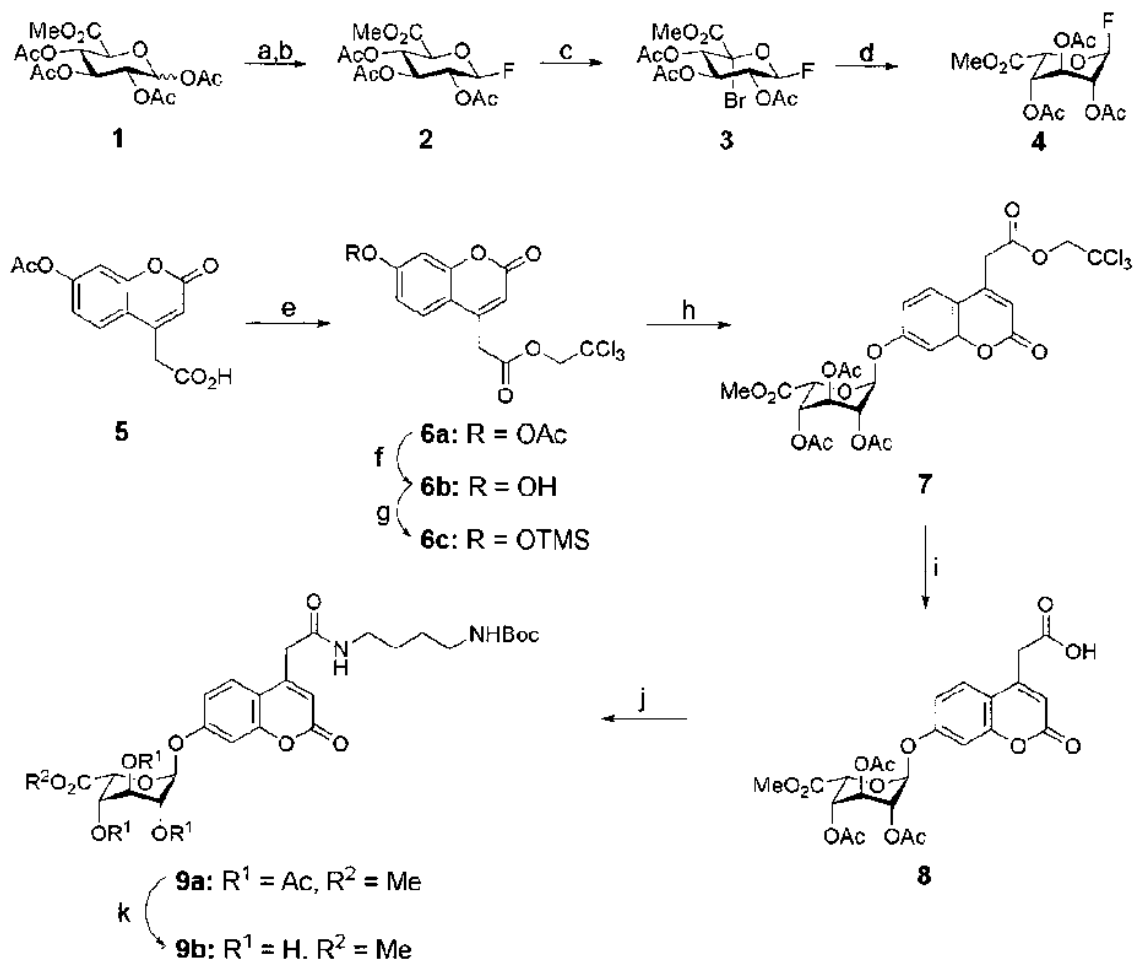


FIG. 2.

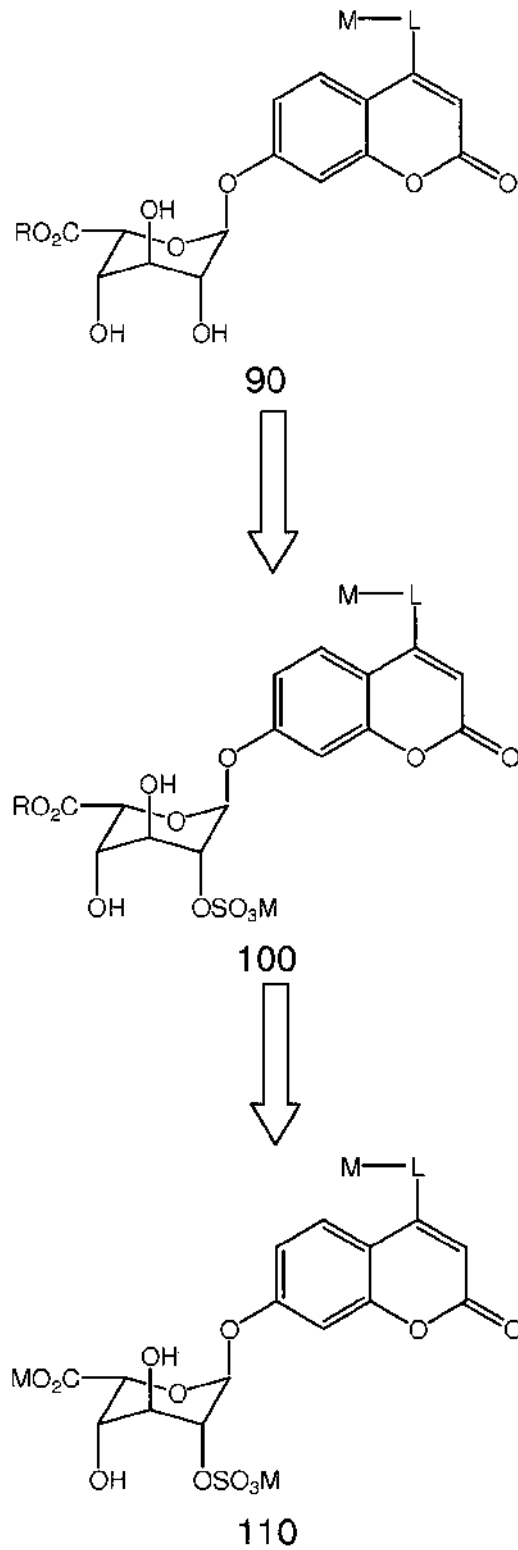


FIG. 3.