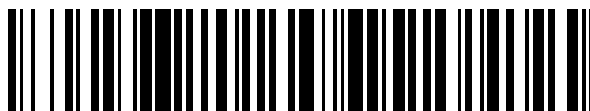


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 880**

51 Int. Cl.:

|                     |                             |           |
|---------------------|-----------------------------|-----------|
| <b>C07H 3/04</b>    | (2006.01) <b>A61P 31/00</b> | (2006.01) |
| <b>C07H 3/06</b>    | (2006.01) <b>A61P 7/02</b>  | (2006.01) |
| <b>C07H 5/04</b>    | (2006.01)                   |           |
| <b>C07H 11/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/7016</b> | (2006.01)                   |           |
| <b>A61K 31/702</b>  | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 9/00</b>    | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 35/00</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 35/04</b>   | (2006.01)                   |           |
| <b>A61P 29/00</b>   | (2006.01)                   |           |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2005 E 05706346 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.11.2014 EP 1720889**

54 Título: **Derivados de oligosacáridos sulfatados**

30 Prioridad:

**04.03.2004 AU 2004901103**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.03.2015**

73 Titular/es:

**PROGEN PHARMACEUTICALS LIMITED (100.0%)  
2806 Ipswich Road  
Darra QLD 4076, AU**

72 Inventor/es:

**FERRO, VITO;  
FAIRWEATHER, JON KRUEGER;  
KAROLI, TOMISLAV y  
LIU, LIGONG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 531 880 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

Derivados de oligosacáridos sulfatados

5 **Campo técnico**

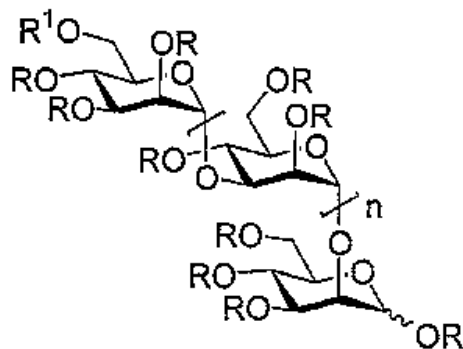
La invención descrita aquí se refiere a compuestos que tienen actividad como inhibidores de proteínas fijadoras de heparan sulfato y como inhibidores de la enzima heparanasa. En particular, la invención está dirigida a derivados de oligosacáridos sulfatados. Específicamente, la invención se refiere a derivados de oligosacáridos polisulfatados, la derivación preferiblemente es en C-1 del extremo reductor y/o en C-6 de la unidad monosacárida del extremo no reductor. La invención también se refiere a composiciones que contienen los compuestos y uso de los compuestos y composiciones de ellos para el tratamiento antiangiogénico, antimetastático, anti-inflamatorio, antimicrobiano, anticoagulante y/o antitrombótico de un sujeto mamífero. Los compuestos y composiciones de ellos también tienen utilidad para disminuir los niveles de triglicéridos en la sangre, y para inhibir la enfermedad cardiovascular en un sujeto mamífero. Las composiciones adicionalmente tienen utilidad en la prevención de los trastornos anteriores, cuando se administran a un sujeto mamífero.

El agente oligosacárido sulfatado conocido como PI-88 [1,2] (véase el compuesto 1 más adelante), ha demostrado ser un inhibidor promisorio del crecimiento tumoral y de la metástasis [1,3] y está siendo objeto de pruebas clínicas de fase II en pacientes con cáncer [4]. El PI-88 ejerce efectos antiangiogénicos inhibiendo las interacciones de los factores de crecimiento angiogénico (principalmente, FGF-1, FGF-2 y VEGF) y sus receptores con heparan sulfato [1,5]. Además, el PI-88 es un inhibidor potente de la enzima heparanasa, una glicosidasa que divide las cadenas laterales de heparan sulfato de los proteoglicanos, que son un constituyente principal de la matriz extracelular (ECM) y las membranas de basamento que rodean las células tumorales [1,2]. La heparanasa ha sido implicada fuertemente en la angiogénesis: es capaz de liberar factores de crecimiento angiogénico activos unidos a heparan sulfato de la ECM y está involucrada en la degradación de la ECM y en la remodelación subsiguiente del tejido asociada con el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos [6]. La degradación de la ECM mediante la heparanasa también es crucial para la diseminación de las células tumorales (metástasis), permitiéndoles pasar a la corriente sanguínea y alojarse en sitios remotos en donde pueden formar tumores secundarios [6,7].

Además de sus efectos angiogénicos, el PI-88 inhibe la cascada de coagulación sanguínea: (i) inhibiendo las proteasas en la ruta intrínseca, (ii) estimulando la liberación del inhibidor de ruta del factor del tejido (TFPI), y (iii) activando la inhibición de trombina mediada por el cofactor II de heparina. Sin embargo, el PI-88 no interactúa con la AT III y por lo tanto no muestra actividad anti-Xa o actividad anti-IIa mediada por AT III [8,9]. Estudios in vivo en monos han demostrado que la dosis bajas de PI-88 estimulan la liberación de todo el TFPI unido a heparan sulfato desde la pared celular vascular [9]. Aparte de su efecto en la coagulación, se mostró recientemente que el TFPI es un agente antiangiogénico [10] y un inhibidor de metástasis [11]. El PI-88 también ha demostrado que bloquea la proliferación de células de músculos lisos vasculares y el engrosamiento intimal [12], para inhibir la infección de células por el virus del herpes simplex (HSV) y la diseminación de célula en célula del HSV-1 y HSV-2 [13], y para inhibir la proteinuria en la nefritis pasiva de Heymann [14].

El PI-88 es una mezcla de oligosacáridos de mannosu monofosforilados altamente sulfatados que abarcan en tamaño desde di- hasta hexasacáridos [15,16]. El PI-88 se prepara mediante sulfonación exhaustiva [2,16] de la fracción fosfato del oligosacárido (2) (véase la fórmula I después de este párrafo) obtenida por hidrólisis suave, catalizada con ácido, del fosfomannano extracelular de la levadura *Pichia* (Hansenula) *holstii* NRRL Y-2448 [17,18]. Los componentes principales son los fosfatos de penta- y tetrasacáridos 3 (~60%) y 4 (~30%), respectivamente, mientras que el restante 10% está constituido por fosfatos de di-, tri- y hexasacáridos (5-7) y una tetrasacarilamina (no se muestra) [15,16].

**Fórmula I**



5

10

15

20

25

30

35

|    | n   | R                  | R¹                                  |
|----|-----|--------------------|-------------------------------------|
| 1  | 0-4 | SO <sub>3</sub> Na | o H PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> |
| 2  | 0-4 | H                  | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>     |
| 3  | 3   | H                  | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>     |
| 4  | 2   | H                  | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>     |
| 5  | 0   | H                  | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>     |
| 6  | 1   | H                  | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>     |
| 7  | 4   | H                  | PO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>     |
| 8  | 0   | H                  | H                                   |
| 9  | 1   | H                  | H                                   |
| 10 | 2   | H                  | H                                   |
| 11 | 3   | H                  | H                                   |

En este contexto, Cochran *et al.* (Cochran, S. *et al.*, *Probing the Interactions of Phosphosulfomannans with Angiogenic Growth Factors by Surface Plasmon Resonance*, J. Med. Chem. 46, 2003, págs. 4601-4608) describen las interacciones de unión de PI-88 con los factores de crecimiento angiogénico FGF-1, FGF-2 y VEGF.

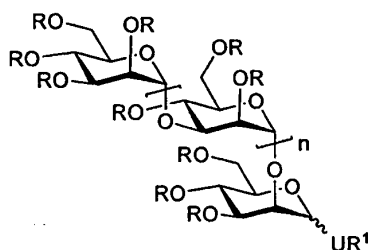
40

Se conoce bien que otros diversos oligo- y polisacáridos polisulfatados y sus derivados muestran tipos similares de actividades biológicas para PI-88 [19-25]. Estas actividades biológicas se atribuyen a la inhibición de diversas proteínas fijadoras de heparan sulfato (HS). El objeto de la presente invención es crear derivados de PI-88 que tengan actividades

biológicas similares, pero con propiedades mejoradas, por ejemplo, en sus perfiles farmacocinético y/o de ADME (absorción, distribución, metabolismo, excreción). Un objeto adicional de la invención es proporcionar compuestos que contienen un solo esqueleto de carbono para facilitar su síntesis y caracterización.

De acuerdo con una primera modalidad de la invención, se proporciona un compuesto de la fórmula general:

5



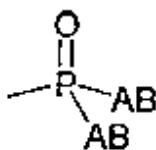
en donde;

n es un entero que tiene un valor de 0 a 6;

U es C, N, S o es O, o sus estados de oxidación superior, incluyendo CO, COO, NO, NO<sub>2</sub>, S(O), S(O)O;

10 cada R independientemente es SO<sub>3</sub>M, en donde M es cualquier catión aceptable para uso farmacéutico o es cualquiera de alquilo, arilo, acilo, aroilo, alquil sulfonilo, aril-sulfonilo, PEG, un derivado de PEG, H o el grupo

15



20 en donde independientemente en cada grupo AB, A es O o NH, y B es H, o M, en donde M es como se definió anteriormente, o un grupo alquilo, arilo o cualquier otro grupo apropiado;

R<sup>1</sup> es alquilo, arilo, acilo, aroilo, alquil sulfonilo, aril sulfonilo, PEG o un derivado de PEG, o R<sup>1</sup> junto con U es N<sub>3</sub> o un triazol sustituido, o un tetrazol sustituido, o un arilo sustituido, o un heteroarilo sustituido;

con la condición de que al menos 50% de los grupos R sean SO<sub>3</sub>M.

25 De acuerdo con una segunda modalidad de la invención, se proporciona una composición farmacéutica o veterinaria para la prevención o para el tratamiento en un sujeto mamífero de un trastorno resultante de angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos elevados en la sangre, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular, cuya composición contiene al menos un compuesto de acuerdo con la primera modalidad junto con un portador o diluyente aceptable para uso farmacéutico o veterinario para dicho al menos un compuesto.

30 Una tercera modalidad de la invención comprende el compuesto de acuerdo con la primera modalidad, para su uso en la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de un trastorno resultante de angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos elevados en la sangre, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.

35 Con el fin de que la invención pueda ser comprendida y puesta en práctica más fácilmente, se describirá ahora una o más modalidades preferidas de ella, a manera de ejemplo solamente, con referencia a la figura anexa.

### **Breve descripción de la figura**

La figura 1 muestra el efecto de los compuestos similares a PI-88 sobre la infectividad con HSV-1 (A) y la diseminación

de célula a célula del HSV-1 (B). En el panel A, los resultados se expresan como un porcentaje de la cantidad de unidades formadoras de placa viral (PFU) formadas en células infectadas con los viriones tratados con el compuesto con relación a las células de control tratadas con placebo. En el panel B, los resultados se expresan como un porcentaje del área promedio de 20 placas virales formadas en presencia continua del compuesto con relación a las células de control tratadas con placebo.

Los actuales inventores han encontrado que una gran cantidad de derivados de oligosacáridos sulfatados puede ser sintetizada usando una cantidad de estrategias diferentes, tal como se describe más ampliamente más adelante, y como se ilustra en los ejemplos. Estos compuestos tienen utilidad en la prevención o en el tratamiento en sujetos mamíferos de un trastorno resultante de la angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación, trombosis, niveles de triglicéridos elevados en la sangre, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular. Esta utilidad es el resultado de la capacidad de los compuestos de bloquear la fijación de proteínas fijadoras de heparan sulfato a sus receptores, o de inhibir la actividad de la enzima heparanasa.

El catión M aceptable para uso farmacéutico preferiblemente es sodio.

Con respecto al entero n, un valor preferido es 3, de tal forma que proporcione un compuesto que es un pentasacárido.

Un grupo R1 apropiado preferido es n-octilo.

La configuración anomérica, en donde sea aplicable, en UR1 de los compuestos de la presente invención, puede ser  $\alpha$  o  $\beta$  o una mezcla anomérica  $\alpha/\beta$ .

Con respecto a los sustituyentes proporcionados anteriormente en la definición de los compuestos, el término "alquilo" cuando se usa solo o en palabras compuestas tales como "arilalquilo", se refiere a un grupo hidrocarburo ramificado, cíclico o de cadena recta, preferiblemente de 1 a 20 átomos de carbono, tal como de 1 a 10 átomos de carbono. Por ejemplo, el término "alquilo de 1 a 6 átomos de carbono" se refiere a un grupo alquilo ramificado, cíclico o de cadena recta de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de "alquilo de 1 a 6 átomos de carbono" incluyen metilo, etilo, isopropilo, n-propilo, n-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, isopentilo, 2,2-dimetilpropilo, n-hexilo, 2-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 3-metilpentilo y 2,3-dimetilpropilo, n-hexilo, 2-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, 3-metilpentilo y 2,3-dimetilbutilo. Los ejemplos de alquilo cíclico de 1 a 6 átomos de carbono incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo y ciclohexilo. Otros ejemplos de alquilo incluyen: heptilo, 5-metilhexilo, 1-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 3,3-dimetilpentilo, 4,4-dimetilpentilo, 1,2-dimetilpentilo, 1,3-dimetilpentilo, 1,4-dimetilpentilo, 1,2,3-trimetilbutilo, 1,1,2-trimetilbutilo, 1,1,3-trimetilbutilo, octilo, 6-metilheptilo, 1-metilheptilo, 1,1,3,3-tetrametilbutilo, nonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-metil-octilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-etilheptilo, 1-, 2- o 3-propilhexilo, decilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- y 8-metilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-etil-octilo, 1-, 2-, 3- o 4-propilheptilo, undecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8- o 9-metildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6- o 7-etilnonilo, 1-, 2-, 3-, 4- o 5-propil-octilo, 1-, 2- o 3-butilheptilo, 1-pentilhexilo, dodecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9- o 10-metilundecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- u 8-etildecilo, 1-, 2-, 3-, 4-, 5- o 6-propilnonilo, 1-, 2-, 3- o 4-butil-octilo, 1-2-pentilheptilo y similares. Un grupo alquilo puede estar sustituido opcionalmente por uno o más sustituyentes opcionales tal como se definen aquí. Opcionalmente, el grupo hidrocarburo recto, ramificado o cíclico (que tiene al menos 2 átomos de carbono), puede contener uno, dos o más grados de insaturación, de manera que forme un grupo alqueno o alquino, preferiblemente un alqueno de 2 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente un alqueno de 2 a 6 átomos de carbono, o un alquino de 2 a 20 átomos de carbono, más preferible un alquino de 2 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de ellos incluyen un residuo hidrocarburo que contiene uno o dos o más enlaces dobles, o uno o dos o más enlaces triples. Así, "alquilo" se toma para incluir alqueno y alquino.

El término "arilo", cuando se usa solo o en palabras compuestas, tales como "arilalquilo", se refiere a residuos simples, polinucleares, conjugados o fusionados de hidrocarburos aromáticos o a sistemas con anillo heterocíclico aromático (heteroarilo), en donde uno o más átomos de carbono de un residuo hidrocarburo cíclico está sustituido con un heteroátomo para proporcionar un residuo aromático. En donde dos o más átomos de carbono están reemplazados, esto puede ser por dos o más del mismo heteroátomo o por diferentes heteroátomos. Los heteroátomos apropiados incluyen O, N, S y Se.

Los ejemplos de "arilo" incluyen fenilo, bifenilo, terfenilo, cuaterfenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, antraceno, dihidroantraceno, benzantraceno, dibenzantraceno, fenantreno, fluoreno, idenilo, azuleno, criseno, piridilo, 4-fenilpiridilo, 3-fenilpiridilo, tienilo, furilo, pirrolilo, indolilo, piridazinilo, pirazolilo, pirazinilo, tiazolilo, pirimidinilo,

quinolinilo, isoquinolinilo, benzofuranilo, benzotienilo, purinilo, quinazolinilo, fenazinilo, acridinilo, benoxazolilo, benzotiazolilo y similares. Los grupos hidrocarburo arilo preferidos incluyen fenilo y naftilo. Los grupos arilo heterocíclicos preferidos incluyen piridilo, tienilo, furilo, pirrolilo. Un grupo arilo puede estar sustituido opcionalmente por uno o más sustituyentes opcionales tal como se define aquí.

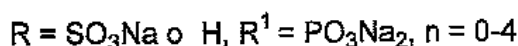
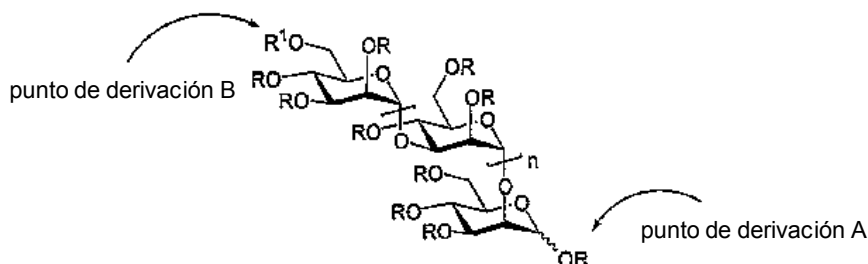
5 El término "acilo" se refiere a un grupo  $-C(O)-R$  en donde R es un grupo alquilo o arilo. Los ejemplos de acilo incluyen alcanilo de cadena recta o ramificada, tales como acetilo, propanoilo, butanoilo, 2-metilpropanoilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, heptadecanoilo, octadecanoilo, nonadecanoilo e icosanoilo; cicloalquilcarbonilo, tales como ciclopropilcarbonilo, ciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo y ciclohexilcarbonilo; aroilo, tales como benzoilo, toluoilo y naftoilo; aralcanoilo, tales como fenilalcanoilo (por ejemplo, fenilacetilo, fenilpropanoilo, fenilbutanoilo, fenilisobutililo, fenilpentanoilo y fenilhexanoilo) y naftilalcanoilo (por ejemplo, naftilacetilo, naftilpropanoilo y naftilbutanoilo). Dado que el grupo R puede estar sustituido opcionalmente como se describió anteriormente, "acilo" se toma para referirse a acilo sustituido opcionalmente.

15 Los sustituyentes opcionales para alquilo, arilo o acilo incluyen halo (bromo, fluoro-, cloro, yodo), hidroxi, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, metilo, etilo, propilo (isómeros *n*- e *i*-)), alcoxi de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi (isómeros *n*- e *i*-)), butoxi ((isómeros *n*-, *sec* y *t*-)), nitro, amino, alquilamino de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo metil amino, etil amino, propil(isómeros *n*- e *i*-)amino), dialquilamino de 1 a 6 átomos de carbono (por ejemplo dimetilamino, dietilamino, diisopropilamino), halometilo (por ejemplo trifluorometilo, tribromometilo, triclorometilo), halometoxi (por ejemplo trifluorometoxi, tribromometoxi, triclorometoxi) y acetilo.

20 Un grupo heterocíclico de 5 a 6 miembros incluye grupos heterocíclicos aromáticos de 5 a 6 miembros (heteroarilo), tal como se describió anteriormente, y grupos heterocíclicos no aromáticos de 5 a 6 miembros que contienen uno o más heteroátomos (preferiblemente 1 o 2), seleccionados independientemente de O, N, S y Se. Los ejemplos de ellos incluyen dioxanilo, piranilo, tetrahidrofurano, piperidilo, morfolino, piperazinilo, tiomorfolino y sacáridos.

25 El grado de sulfación de los compuestos de acuerdo con la invención típicamente es de al menos 50%. Esto es, al menos 50% de los grupos R de un derivado oligosacárido contiene  $SO_3M$ . El grado de sulfación típicamente es desde 70 hasta 100%, y preferiblemente es al menos tan alto como de 90%.

Los derivados de PI-88 de la presente invención pueden ser elaborados por medio de una ruta sintética paso por paso o comenzando con la estructura principal del PI-88 ya en su sitio (usando los compuestos 8 a 11, fácilmente disponibles; véase la fórmula I anterior) y haciéndole las modificaciones deseadas. Los inventores determinaron a partir de una consideración de la estructura de PI-88 (1) y su precursor (2), que hay dos puntos de derivación preferidos: en el extremo reductor (A) y en la posición 6 del terminal en el extremo no reductor (B), tal como se ilustra en la siguiente fórmula estructural.



Debe notarse que los derivados de di-, tri-, tetra- y pentasacáridos (y más grandes) pueden elaborarse mediante el mismo procedimiento químico. Sin embargo, los derivados de pentasacáridos se prefieren, dado que son los más activos biológicamente [1, 2, 5, 8, 13]. Todos los derivados elaborados están sujetos a desprotección (típicamente, a desacetilación con NaOMe), y el poliol resultante se sulfona con un reactivo sulfonante tal como complejo trióxido de azufre-piridina o un complejo trióxido de azufre-trimetilamina.

Tal como se indicó anteriormente, los compuestos de acuerdo con la invención tienen utilidad en la prevención o en el tratamiento en sujetos mamíferos, de un trastorno resultante de angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos elevados en la sangre, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular. Los compuestos tienen utilidad particular en el tratamiento de los siguientes trastornos en seres humanos. Los compuestos se administran típicamente como un componente de una composición farmacéutica como la que se describe en los siguientes párrafos. Tal como se ilustrará más adelante, los compuestos muestran actividades similares o superiores a la del PI-88 por sí solo.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de tableta, cápsula, polvo o líquido. Una tableta puede incluir un portador sólido, tal como gelatina, o un adyuvante o un diluyente inerte. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, un aceite mineral o un aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Estas composiciones y preparaciones contendrán generalmente al menos 0.1% por peso del compuesto.

La administración parenteral incluye administración por las siguientes rutas: intravenosa, cutánea o subcutánea, nasal, intramuscular, intraocular, transepitelial, intraperitoneal y tópica. La administración tópica incluye administración dérmica, ocular, rectal, nasal, así como también administración por inhalación o por medio de aerosol. Para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o inyección en un sitio en donde se desea el tratamiento, el ingrediente activo estará en la forma de una solución acuosa aceptable parenteralmente, que es libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad apropiadas. Los conocedores de la materia serán capaces de preparar soluciones apropiadas usando, por ejemplo, soluciones de los compuestos en cuestión o sus derivados.

Además del al menos un compuesto y un portador o diluyente, las composiciones de acuerdo con la invención pueden incluir además un excipiente, regulador, estabilizador, agente isotonzante, conservador o anti-oxidante aceptable para uso farmacéutico o veterinario, o cualquier otro material familiar para los conocedores de la materia. El conocedor de la materia se dará cuenta de que estos materiales no deberán ser tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del compuesto o de los compuestos. La naturaleza precisa de cualquier aditivo puede depender de la vía de administración de la composición: esto es, si la composición va a ser administrada oral o parenteralmente. Con respecto a los reguladores, las composiciones acuosas incluyen típicamente sustancias tales que mantengan la composición cercana al pH fisiológico o al menos dentro de un rango de pH de aproximadamente 5.0 hasta 8.0.

Las composiciones de acuerdo con la invención también pueden incluir ingredientes activos además del al menos un compuesto. Estos ingredientes serán escogidos principalmente por su eficacia como agentes anti-angiogénicos, anti-metastásicos, anti-inflamatorios, anti-coagulantes, antimicrobianos y anti-trombóticos, y agentes efectivos contra niveles de triglicéridos elevados en la sangre, y enfermedad cardiovascular, pero pueden ser escogidos por su eficacia contra cualquier condición asociada.

Una composición farmacéutica o veterinaria de acuerdo con la invención, será administrada a un sujeto ya sea en una cantidad efectiva profilácticamente o en una cantidad efectiva terapéuticamente, según sea necesario, para la situación particular bajo consideración. La cantidad real del al menos un compuesto administrado a manera de una composición, y la proporción y el curso de tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y de la gravedad de la condición que está siendo tratada o de la profilaxis requerida. La prescripción del tratamiento, tal como las decisiones de dosificación y similares, estarán dentro de las habilidades del practicante médico o veterinario responsable del cuidado del sujeto. Típicamente, sin embargo, las composiciones para ser administradas a un sujeto humano incluirán entre aproximadamente 0.01 y 100 mg del compuesto por kg de peso corporal, y más preferiblemente entre aproximadamente 0.1 y 10 mg/kg de peso corporal.

Los compuestos pueden ser incluidos en composiciones como derivados de ellos aceptables para uso farmacéutico o veterinario. Como se usa aquí, los "derivados" de los compuestos incluyen sales, complejos de coordinación con iones

metálicos tales como  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , ésteres tales como ésteres hidrolizables in vivo, ácidos o bases libres o hidratos. Los compuestos que tienen grupos ácidos tales como fosfatos o sulfatos pueden formar sales con metales alcalinos o alcalino-térreos tales como Na, K, Mg y Ca, y con otras aminas orgánicas tales como trietilamina y Tris(2-hidroxietil)amina. También se pueden formar sales entre compuestos con grupos básicos, tales como aminas, con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido fumárico, o ácido tartárico. Los compuestos que tienen tanto grupos ácidos como básicos pueden formar sales internas.

Se pueden formar ésteres entre los grupos ácidos hidroxílicos o carboxílicos presentes en el compuesto y un compañero de reacción apropiado ácido carboxílico o alcohol, usando técnicas que serán familiares para los conocedores de la materia.

Tal como se indicó también anteriormente, los compuestos de acuerdo con la invención tienen utilidad en la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de un trastorno resultante de angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos elevados en la sangre, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.

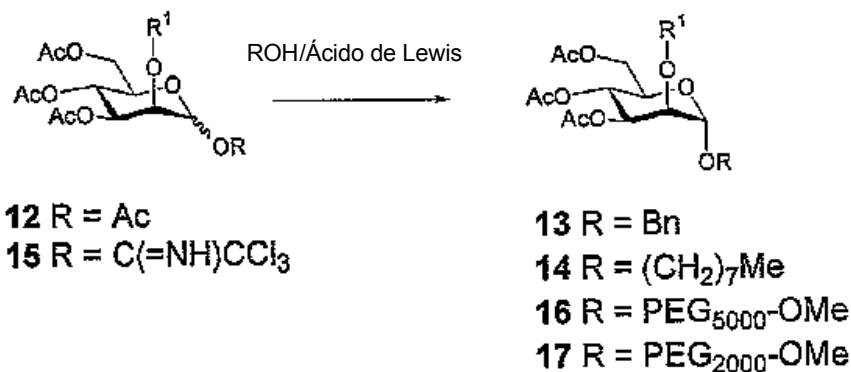
Ahora se proporcionará una descripción general de las vías de síntesis de los compuestos de acuerdo con la presente invención. Por simplicidad, en todos los esquemas, figuras y tablas que siguen,  $R^1$  representará una porción tetrasacárida  $Man_4$  enlazada a  $\alpha(1\rightarrow3)$  (con o sin un grupo 6-O-fosfo terminal), a menos que se indique otra cosa.

### Procedimientos generales

#### *Derivados glicósidos de pi-88 (o-, s- y c-glicósidos)*

Los derivados glicósidos pueden prepararse fácilmente activando el oligosacárido (con o sin un grupo 6-O-fosfo terminal) para la glicosilación, y condensándolo con un alcohol apropiado. Un método apropiado es la reacción catalizada o promovida por ácido de Lewis de un azúcar peracetilado, por ejemplo 12, con un aceptor alcohólico, por ejemplo, para dar 13 y 14. Cuando se requiere un aceptor menos reactivo, se tiene que preparar un donante de glicosilo más reactivo, por ejemplo, se usa tricloroacetimidato 15 para preparar los derivados PEGilados 16 y 17 (Esquema 1).

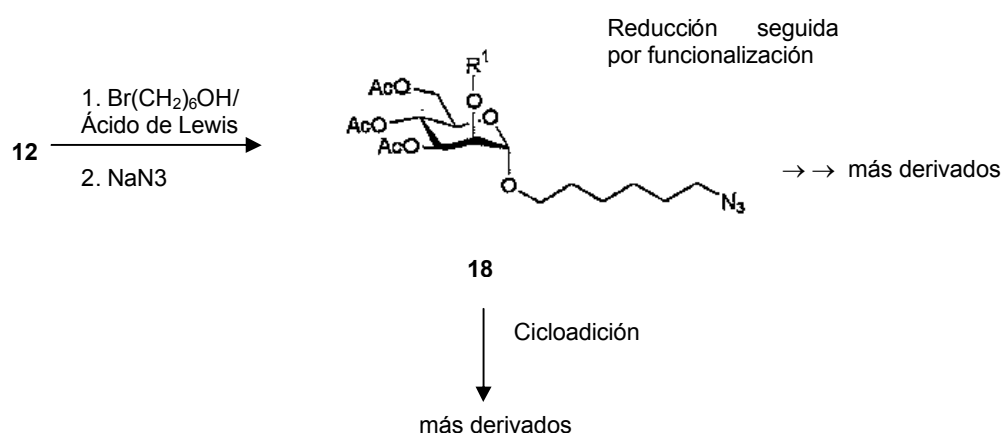
Esquema 1





Diversos otros tipos de donantes son conocidos en la materia, y son apropiados como donantes, por ejemplo, tioglicósidos, haluros, n-pentenil glicósidos, selenoglicósidos, etc. Los conocedores de la materia reconocerán que los S- y los C-glicósidos se pueden preparar mediante métodos similares o relacionados conocidos en la literatura, por ejemplo usando un tiol apropiado (o derivado de tiol), o un nucleófilo de carbono conocido (por ejemplo, aliltrimetilsilano o un fenol apropiado) con un donante activado apropiadamente. El producto puede ser desacetilado y sulfonado luego fácilmente. El producto de la glicosilación puede ser un anómero solo ( $\alpha$  o  $\beta$ ) o una mezcla de ambos anómeros. Tanto los anómeros puros  $\alpha$  como  $\beta$  y la mezcla anomérica, son apropiados para las transformaciones subsiguientes. Esto también se aplica a otros derivados obtenidos mediante manipulación del centro anomérico descrito en las secciones siguientes. Por lo tanto, en donde se denota un solo anómero, esto implica que el anómero opuesto o una mezcla de los dos anómeros también se reivindica. También estará claro para los conocedores de la materia que el glicósido formado inicialmente, dependiendo de la naturaleza de la aglicona, puede ser derivado adicionalmente. Como ejemplo, si uno usa 2-bromohexanol como alcohol, el producto puede ser convertido en una azida (18). Este es un compuesto extremadamente versátil (Esquema 2) y puede ser funcionalizado además, por ejemplo, mediante cicloadición con un compuesto que contiene un dipolarófilo apropiado. Alternativamente, la azida se puede reducir a una amina y luego funcionalizarse adicionalmente, por ejemplo, mediante alquilación, acilación, una condensación Ugi de 4 componentes, etc.

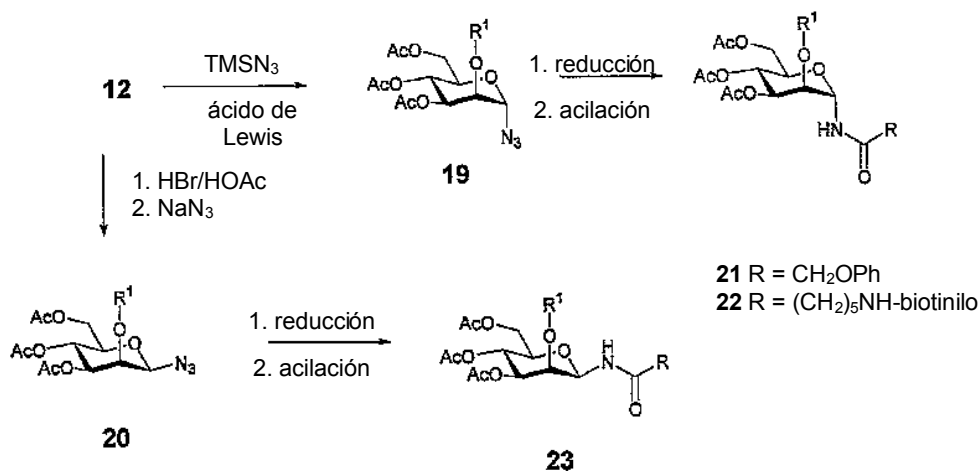
Esquema 2



#### Derivados n-enlazados

A partir de 12, la reacción catalizada con ácido de Lewis con TMSN<sub>3</sub>, conduce a la azida 19 (predominantemente  $\alpha$ ). Alternativamente, la  $\beta$ -azida 20 se puede formar exclusivamente mediante formación inicial del  $\alpha$ -bromuro seguido por desplazamiento con NaN<sub>3</sub> (Esquema 3). El bromuro también puede usarse como un producto intermedio para la preparación de tioglicósidos o isotiocianatos, por ejemplo. Las azidas se pueden desproteger y sulfonar como están o pueden ser reducidas y aciladas con diversos cloruros ácidos para proporcionar una serie de glicosil amidas (Esquema 3).

Esquema 3



### Derivados del extremo no reductor

La derivación también puede lograrse en el extremo no reductor, por ejemplo, mediante el uso de oligosacáridos fosforilados (ya sea individualmente o como una mezcla) y derivados a través del grupo fosfato, por ejemplo, preparación de ésteres fosfatados o fosforamidas. Sin duda, se pueden preparar compuestos apropiados mediante los cuales el extremo reductor también se deriva, ya sea con un grupo funcional similar o diferente.

Habiendo descrito ampliamente la invención, ahora se darán ejemplos no limitativos de los compuestos, su síntesis y sus actividades biológicas.

### Ejemplos

#### Manno-oligosacáridos neutros

(A) Los Manno-oligosacáridos (8)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man, (9)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man, (10)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man, y (11)  $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Man, fueron aislados de la fracción neutra de la hidrólisis suave catalizada con ácido del fosfomannano extracelular de *P. holstii* NRRL Y-2448 por cromatografía de exclusión por tamaño de acuerdo con el procedimiento descrito en la literatura [17]. Alternativamente, los oligosacáridos 8-11 fueron sintetizados en una forma paso a paso de bloques constructores de monosacárido tal como se describe en el ejemplo 1 (véase más adelante).

(b) Alternativamente, la fracción neutra fue acetilada directamente (exceso de Ac<sub>2</sub>O/piridina) y los oligosacáridos peracetilados individuales fueron aislados mediante cromatografía instantánea (gel de sílice) y usados de esta forma directamente en el siguiente paso.

(c) En otro enfoque, la mezcla peracetilada de (b) se usó directamente en el siguiente paso y luego se aislaron los productos individuales mediante cromatografía instantánea.

#### Procedimiento general para la desacetilación

Una solución del peracetato en metanol anhidro (0.1 M) se trató con una solución de metóxido de sodio en metanol (1.35 M, 0.2-0.6 eq). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 a 3 horas (vigilada mediante TLC). Se le añadió resina ácida AG®-50W-X8 (forma H<sup>+</sup>) para ajustar el pH = 6-7, se filtró la mezcla y se enjuagó la resina con metanol. Se concentraron el filtrado combinado y los lavados in vacuo y se secaron completamente para dar el producto poliol.

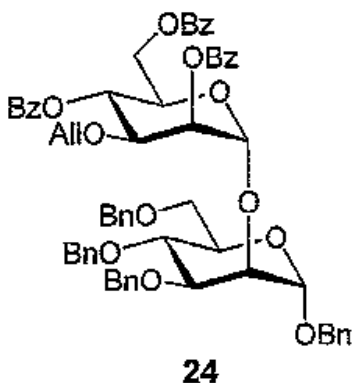
#### **Procedimiento general para la sulfonación**

Se calentó una mezcla del poliol y complejo SO<sub>3</sub>·trimetilamina o SO<sub>3</sub>·piridina (2 eq. por alcohol) en DMF (60 °C, durante la noche). La mezcla de la reacción enfriada (temperatura ambiente) se trató con MeOH y luego se hizo básica (hasta un pH>10) mediante la adición de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10% peso/peso). Se filtró la mezcla y se evaporó y se co-evaporó (H<sub>2</sub>O) el filtrado. Se disolvió el material polisulfatado crudo en H<sub>2</sub>O y se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño (véase más adelante) para dar el producto sulfatado. Cuando se requirió, después de la liofilización se hizo pasar el producto a través de una columna de resina para intercambio iónico (AG®-50W-X8, forma Na<sup>+</sup>, 1 x 4 cm, H<sub>2</sub>O des-ionizada, 15 mL) con el fin de transferir el producto uniformemente en la forma de sal de sodio. Se evaporó la solución recolectada y se liofilizó para dar el producto final como un cristal incoloro o polvo blanco.

#### **Cromatografía de exclusión por tamaño**

Se realizó cromatografía de exclusión por tamaño sobre Bio-Gel P.2 en una columna de 5 x 100 Cm y una tasa de flujo de 2.8 mL/min de 0.1 M de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>·HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, recolectando las fracciones en 2.8 min (7.8 mL). Se analizaron las fracciones para determinar su contenido de carbohidratos colocándolas en placas con gel de sílice y mediante su visualización por carbonización, y/o se analizaron para determinar especies poli-cargadas mediante la prueba con azul de dimetil metileno. Finalmente, se verificó la pureza de las fracciones mediante CE<sup>15</sup> y las que resultaron estar libres de sal fueron agrupadas y liofilizadas. En los casos de la presencia de sub-productos infrasulfatados o de otras sales orgánicas contaminantes (normalmente sólo pequeñas cantidades, pero que se detectaron con frecuencia), se aplicó una cromatografía de columna LH20 (2 x 95 cm, agua des-ionizada, 1.2 mL/min, 3.5 min por frasco), para eliminarlos completamente.

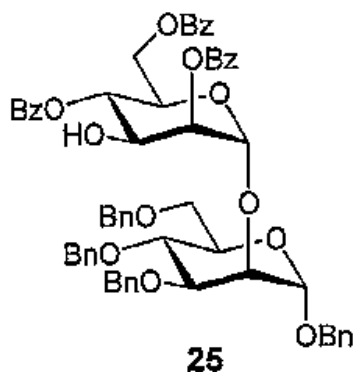
#### **Ejemplo 1: síntesis total de manno-oligosacáridos neutros (8-11) de *pichia***



#### **Bencil-2-o-(3-o-alil-2,4,6-tri-o-benzoil-α-D-manno-piranosil)-3,4,6-tri-o-bencil-α-D-mannopiranosida (24)**

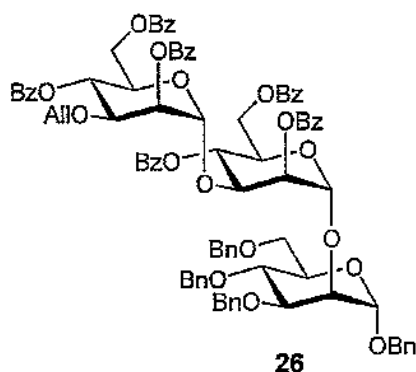
Se agitó una mezcla de tricloroacetimidato de 3-O-alil-2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-mannopiranosil [26] (902 mg, 1.21 mmol) y bencil-3,4,6-tri-O-bencil-α-D-mannopiranosida [27] (723 mg, 1.34 mmol) en 1,2-DCE (10 mL), en la presencia de tamices moleculares (1.0 g de polvo de 3Å) bajo una atmósfera de argón (30 min). Se enfrió la mezcla (0° C) con agitación continua (10 min) antes de añadirle TMSOTf (219 μL, 1.21 mmol). Después de algún tiempo (10 min), se introdujo Et<sub>3</sub>N (100 μL) y se filtró la mezcla. Se evaporó el solvente y el residuo se sometió a FC (10-50% EtOAc/hexano) para producir

el tribenzoato (24) como un aceite incoloro (1.14 g, 84%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.67-3.81, 3.88-3.95, 4.06-4.15, 4.30-4.35 (4 m, 12 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>,  $\text{OCH}_2$ ), 4.94-4.70 (m, 7H;  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.84 (d, 1H,  $J_{\text{AB}}$  10.8 Hz; A del cuarteto AB), 4.93-4.96, 5.04-5.09 (2 m, 2 H;  $=\text{CH}_2$ ), 5.02 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>I</sup>), 5.24 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>II</sup>), 5.59-5.69 (m, 1H;  $=\text{CH}$ ), 5.72 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H-2<sup>II</sup>), 5.75 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.8,  $J_{4,5}$  9.9 Hz; H-4<sup>II</sup>), 7.09-7.58, 7.97-8.06 (2 m, 35 H; Ar). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  61.50, 63.49 (2 C; C-6<sup>I</sup>, -6<sup>II</sup>), 68.63, 69.17, 69.31, 69.46, 69.64, 71.08, 72.04, 72.64, 73.60, 74.73, 75.30, 75.38 (13 C; C-3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -2<sup>II</sup>, -3<sup>II</sup>, -4<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>,  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 79.97 (C-2<sup>I</sup>), 98.52, 99.60 (C-1<sup>I</sup>, -1<sup>II</sup>), 117.67 ( $=\text{CH}_2$ ), 127.70-138.43 (43 C;  $=\text{CH}$ , Ar), 165.61, 165.69, 166.42 (3 C; C=O).



**Bencil 2-o-(2,4,6-tri-o-benzoyl- $\alpha$ -d-mannopiranosil)-3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -d-mannopiranosida (25)**

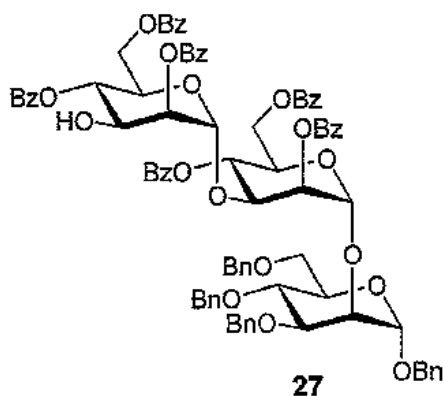
Se le añadió  $\text{PdCl}_2$  (40 mg) a una solución del éter alílico (24) (1.09 g, 0.97 mmol) en MeOH (10 mL) y 1,2-DCE (10 mL) y se calentó la mezcla combinada (70 °C, 40 min). Después de ese tiempo, los solventes fueron evaporados y se sometió el residuo a FC (20-30% EtOAc/hexanos) para producir el alcohol (25) como un aceite incoloro (0.96 g, 91%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.68-3.81, 3.97-4.06, 4.32-4.71 (3 m, 18 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 4.84 (d, 1H,  $J_{\text{AB}}$  12 Hz; A del cuarteto AB), 5.05 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>I</sup>), 5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H-1<sup>II</sup>), 5.61 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.3 Hz; H-2<sup>II</sup>), 5.67 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.8,  $J_{4,5}$  9.9 Hz; H-4<sup>II</sup>), 7.13-7.40, 7.48-7.59, 7.98-8.06 (3 m, 35 H; Ar). RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  60.61, 63.32 (2 C; C-6<sup>I</sup>, -6<sup>II</sup>), 69.06, 69.12, 69.25, 69.44, 70.45, 72.14, 72.65, 72.77, 73.48, 74.79, 75.48, 75.47, 76.23 (13 C; C-3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -2<sup>II</sup>, -3<sup>II</sup>, -4<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>,  $\text{OCH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 79.66 (C-2<sup>I</sup>), 98.34, 99.40 (C-1<sup>I</sup>, -1<sup>II</sup>), 127.70-138.47 (42 C; Ar), 165.97, 166.36, 166.97 (3 C; C=O).



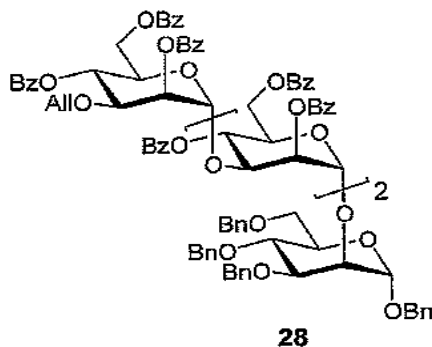
**Bencil-2-o-[(3-o-alil-2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-manno-piranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -D-mannopiranosida (26)**

Una mezcla de 3-O-alil-2,4,6-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil tricloroacetimidato (742 mg, 1.01 mmol) y el alcohol (25) (908 mg, 0.84 mmol) en 1,2-DCE (10 mL), se agitó en la presencia de tamices moleculares (1.0 g de polvo de 3Å) bajo una atmósfera de argón (30 min). Se enfrió la mezcla (0° C) con agitación continua (10 min) antes de añadirle TMSOTf (181  $\mu$ L, 1.01 mmol). Después de algún tiempo (10 min), se le introdujo Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) y se filtró la mezcla. Se evaporó el solvente y el residuo se sometió a FC (10- 50% EtOAc/hexano) para producir el hexabenzoato (26) como un aceite incoloro (1.26 g, 90%).

RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.51-3.56, 3.66-4.06, 4.23-4.27, 4.30-4.2, 4.47-4.72, 4.78-4.86 (6 m, 26 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, -3<sup>III</sup>, -5<sup>III</sup>, -6a<sup>III</sup>, -6b<sup>III</sup>, OCH<sub>2</sub>, =CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 5.04 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.7 Hz; H-1<sup>I</sup>), 5.15 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.8, J<sub>2,3</sub> 2.7 Hz; H-2<sup>I</sup>), 5.26 (d, 1H; H-1<sup>II</sup>), 5.28 (d, 1 H, J<sub>1,2</sub> 1.7 Hz; H-1<sup>III</sup>), 5.33-5.43 (m, 1H; =CH), 5.77-5.82 (m, 2 H; H-4<sup>II</sup>, -2<sup>III</sup>), 5.92 (dd, 1 H, J<sub>3,4</sub> 9.5, J<sub>4,5</sub> 9.8 Hz; H-4<sup>III</sup>), 7.00-7.61, 7.80-8.19 (2m, 50 H; Ar).

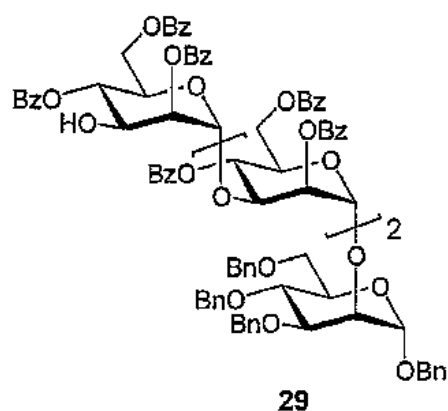
**Bencil-2-o-[(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -D-mannopiranosida (27)**

Se le añadió PdCl<sub>2</sub> (40 mg) a una solución del éter alílico (26) (394 mg, 241  $\mu$ mol) en MeOH (10 mL) y 1,2-DCE (10 mL) y se calentó la mezcla combinada (70° C, 60 min). Después de ese tiempo, los solventes fueron evaporados y se sometió el residuo a FC (20-30% EtOAc/hexanos) para producir el alcohol (27) como un aceite incoloro (317 mg, 84%).  
RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.67-3.82, 3.91-3.99, 4.01-4.21, 4.29-4.71 (4 m, 21 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, -3<sup>III</sup>, -5<sup>III</sup>, -6a<sup>III</sup>, -6b<sup>III</sup>, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 (d, 1H, J<sub>AB</sub> 10.9 Hz; A del cuarteto AB), 5.03-5.05 (m, 2 H; H-1<sup>I</sup>, -2<sup>II</sup>), 5.25-5.28 (m, 2 H; H-1<sup>II</sup>, -1<sup>III</sup>), 5.63 (dd, 1 H, J<sub>3,4</sub> = J<sub>4,5</sub> 9.9 Hz; H-4<sup>II</sup>), 5.77 (dd, 1 H, J<sub>1,2</sub> 2.0, J<sub>2,3</sub> 3.1 Hz; H-2<sup>III</sup>), 5.92 (dd, 1 H, J<sub>3,4</sub> 9.7, J<sub>4,5</sub> 9.9 Hz; H-4<sup>III</sup>), 6.99-7.62, 7.80-8.16 (2 m, 50 H; Ar).



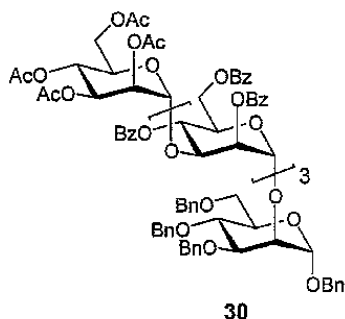
**Bencil-2-o-[(3-o-alil-2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -D-mannopiranosida (28)**

Una mezcla de tricloroacetimidato de 3-O-alil-2,4,6-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil (102 mg, 138  $\mu$ mol) y el alcohol (27) (135 mg, 86.5  $\mu$ mol) en 1,2-DCE (6 mL), se agitó en la presencia de tamices moleculares (100 mg de polvo de 3Å) bajo una atmósfera de argón (30 min). Se enfrió la mezcla (0° C) con agitación continua (10 min) antes de añadirle TMSOTf (25  $\mu$ L, 138  $\mu$ mol). Después de algún tiempo (10 min), se le introdujo Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) y se filtró la mezcla. Se evaporó el solvente y el residuo y se sometió a FC (10-50% EtOAc/hexano) para producir el nonabenzoato (28) como un aceite incoloro (173 mg, 94%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.44-3.49, 3.60-3.99, 4.05-4.16, 4.42-4.44, 4.48-4.68, 4.73-4.77 (6 m, 30 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, -3<sup>III</sup>, -5<sup>III</sup>, -6a<sup>III</sup>, -6b<sup>III</sup>, -3<sup>IV</sup>, -5<sup>IV</sup>, -6a<sup>IV</sup>, -6b<sup>IV</sup>, OCH<sub>2</sub>, =CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph), 4.83 (d, 1H, J<sub>AB</sub> 10.9 Hz; A del cuarteto AB), 5.01-5.04 (m, 2 H; H-1<sup>I</sup>, -2<sup>III</sup>), 5.19-5.23 (m, 1H; H-2<sup>II</sup>), 5.27-5.40 (m, 4 H; H-1<sup>I</sup>, -1<sup>II</sup>, -1<sup>III</sup>, =CH<sub>2</sub>), 5.61(dd, 1H, J<sub>3,4</sub> = 4.5 9.9 Hz; H-4<sup>IV</sup>), 5.77 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> 2.0, J<sub>2,3</sub> 3.1 Hz; H-2<sup>IV</sup>), 5.90-5.96 (m, 2H; H-4<sup>II</sup>, -4<sup>III</sup>), 7.01-7.56, 7.70-8.16 (2 m, 65 H; Ar).



**Bencil-2-o-[(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -D-mannopiranosida (29)**

Se le añadió PdCl<sub>2</sub> (30 mg) a una solución del éter alílico (28) (155 mg, 70.4  $\mu$ mol) en MeOH (5 mL) y 1,2-DCE (5 mL) y se calentó la mezcla combinada (70 °C, 40 min). Después de este tiempo, los solventes fueron evaporados y se sometió el residuo a FC (20-40% EtOAc/hexanos) para producir el alcohol (29) como un aceite incoloro (97 mg, 64%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.67-3.82, 3.90-4.10, 4.24-4.68 (3 m, 26 H; H-2<sup>I</sup>, -3<sup>I</sup>, -4<sup>I</sup>, -5<sup>I</sup>, -6a<sup>I</sup>, -6b<sup>I</sup>, -3<sup>II</sup>, -5<sup>II</sup>, -6a<sup>II</sup>, -6b<sup>II</sup>, -3<sup>III</sup>, -5<sup>III</sup>, -6a<sup>III</sup>, -6b<sup>III</sup>, -3<sup>IV</sup>, -5<sup>IV</sup>, -6a<sup>IV</sup>, -6b<sup>IV</sup>, CH<sub>2</sub>Ph), 4.84 (d, 1H, J<sub>AB</sub> 11.2 Hz; A del cuarteto AB), 4.86 (d, J<sub>1,2</sub> 1.8 Hz; H-1<sup>I</sup>), 4.90 (dd, 1H; J<sub>1,2</sub> 1.8, J<sub>2,3</sub> 3.1 Hz; H-2<sup>III</sup>), 5.03 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.5 Hz; H-1<sup>IV</sup>), 5.22 (dd, 1H, J<sub>1,2</sub> 2.1, J<sub>2,3</sub> 2.6 Hz; H-2<sup>I</sup>), 5.27-5.29 (m, 2 H; H-1<sup>III</sup>, -1<sup>IV</sup>), 5.46 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub> 9.7, J<sub>4,5</sub> 9.9 Hz; H-4<sup>IV</sup>), 5.79 (dd, 1H, J<sub>2,3</sub> 2.9 Hz; H-2<sup>IV</sup>), 5.90-5.96 (m, 2 H; H-4<sup>II</sup>, -4<sup>III</sup>), 7.01-7.56, 7.68-8.16 (2 m, 65 H; Ar).



**Bencil 2-o-[(2, 3,4,6-tetra-o-acetil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2, 4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)]-3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -D-mannopiranosida (30)**

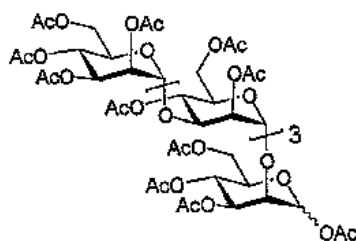
Una mezcla de tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-mannopiranosil [28] (39 mg, 78  $\mu$ mol) y el alcohol (29) (85 mg, 39;  $\mu$ mol) en 1,2-DCE (3 mL), se agitó en la presencia de tamices moleculares (100 mg de polvo de 3Å) bajo una atmósfera de argón (30 min). Se enfrió la mezcla (0 °C) con agitación continua (10 min) antes de añadirle TMSOTf (14.2 L, 78  $\mu$ mol). Después de algún tiempo (30 min), se introdujo Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L) y se filtró la mezcla. Se evaporó el solvente y el residuo y se sometió a FC (30-60% EtOAc/hexano) para producir el tetraacetato (30) como un aceite incoloro (85 mg, 87%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.82-2.04 (4 s, 3 H cada uno; CH<sub>3</sub>CO), 3.67-3.95, 4.05-4.72, 4.82-5.03, 5.21-5.28, 5.69-5.50 (m, 43H; H-1<sup>I-IV</sup>, -2<sup>I-IV</sup>, -3<sup>I-IV</sup>, 4<sup>I-IV</sup>, -5<sup>I-IV</sup>, -6ab<sup>I-IV</sup>, CH<sub>2</sub>Ph) 7.01-7.56, 7.68-8.16 (2 m, 65 H; Ar).

**Procedimiento general para la desprotección de los manooligosacáridos (25,27, 29,30)**

(A) Se le añadió un pedazo pequeño de sodio a una solución del éter tetrabencílico (25, 27, 29, 30) en MeOH y THF y se agitó la mezcla combinada (temperatura ambiente, durante la noche). Después de este tiempo, se neutralizó la mezcla con resina Dowex 50X8 forma (H<sup>+</sup>) y se filtró. Se evaporó el solvente y se co-evaporó (MeOH) y se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

(B) Se le añadió Pd(OH)<sub>2</sub> (10% sobre C) a una solución del producto crudo de (A) en THF y H<sub>2</sub>O con un poco de AcOH (50  $\mu$ L) y la mezcla combinada se agitó vigorosamente bajo hidrógeno (6.89 kPa (100 p.s.i.), 3 h). Después de este tiempo, se filtró la mezcla y se evaporó el solvente. El residuo se sometió a cromatografía de filtración en gel (Biogel P2; H<sub>2</sub>O ; 60 ml/hr) para producir, después de la liofilización, el manooligosacárido (8-11) como un polvo incoloro. Los compuestos 8-11 fueron idénticos en todos los aspectos a los aislados con hidrólisis de *Pichia* tal como se describe anteriormente.

**Ejemplo 2: polisulfato de bencil glicosida (pg500)**



**12**

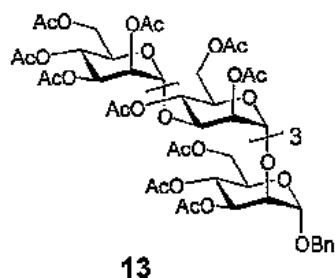
**Peracetato 12**

Se calentó el pentasacárido 11 (1.03 g, 95% M5), acetato de sodio (1.2 g) y anhídrido acético (50 mL), con agitación, a 140° C durante la noche bajo un tubo de secado. Se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente, se evaporó hasta secar, se tomó en EtOAc, se lavó con salmuera (x3) y se sometió a cromatografía instantánea (40 g gel de sílice, 80:20 EtOAc:Hx) para producir 810 mg de peracetato 12 como un cristal junto con material menos puro. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  6.14 (d, 0.84H, J= 2.0,  $\alpha$ H1<sup>I</sup>), 5.71 (d, 0.16H, J= 0.9,  $\beta$ H1<sup>I</sup>), 5.30-5.10 (m, 8H), 5.00-4.85 (m, 7H), 4.25-3.70 (m, 19H), 2.20-1.90 (m, 51H). HRMS calculado para C<sub>64</sub>H<sub>87</sub>O<sub>43</sub> [M + H]<sup>+</sup> 1543.4623, encontrado 1543.4599.

**Procedimiento general para la glicosilación directa de oligosacáridos peracetilados:**

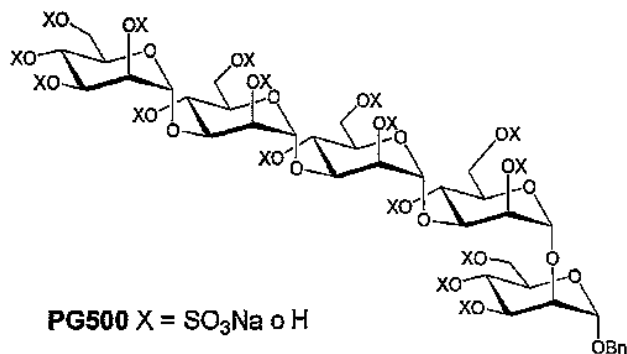
A una solución del peracetato (por ejemplo, 12) (1 eq) en DCM seco con MS de 3Å (0.03 M) se le añadió el alcohol (6 eq). En algunos casos, se le añadió una pequeña cantidad de MS pulverizado a 3Å. Se le añadió éterato de trifluoruro de boro (4 eq) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de argón a 60° C o 75 °C durante 2 a 26 h. Se enfrió la mezcla y se

le añadió trietilamina. La mezcla se diluyó con diclorometano, se lavó con carbonato de sodio acuoso saturado y se secó (MgSO<sub>4</sub> anhidro). Se filtró la solución seca y se lavó la torta con diclorometano. Se concentró el filtrado combinado y los lavados, se cargaron sobre gel de sílice y se purificaron mediante cromatografía instantánea (sílice, gradiente de elución con hexano-EtOAc 6:1 hasta 1:4) para dar el glicósido deseado después de evaporación y secado bajo alto vacío.



**Bencil glicosida 13**

La glicosilación se realizó usando 12 y alcohol bencilico para dar el producto (13) como una goma incolora, 108 mg, 46% (R<sub>f</sub> = 0.32, hexano-EtOAc = 1:3). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.35-7.27 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.30-5.12 (m, 8H), 5.00-4.85 (m, 8H), 4.68 (cuarteto AB, 1H, J=11.8) y 4.50 (cuarteto AB, 1H, J= 11.8, PhCH<sub>2</sub>O), 4.27-3.74 (m, 19H), 2.14 (4), 2.13 (5), 2.13, 2.10, 2.08 (4), 2.07 (9), 2.07 (6), 2.06 (9), 2.06 (6), 2.06 (2x), 2.02, 2.00, 1.99, 1.97, 1.94 (15s, 48H, 16x Ac); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 171.0, 170.5(3), 170.5(1), 170.5(0), 170.4, 170.3, 170.2, 170.0(4), 170.0(2), 169.8(9), 169.8(8), 169.7, 169.6, 169.5(6), 169.4(6) y 169.3 (total 16 x CO), 136.1 (ipso-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 128.5, 128.2 y 127.9 (o, m, p-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 99.2 (2C), 98.9, 98.8, 97.3 (5 x azúcar-C1), 76.7, 75.1, 74.9(9), 74.9(7), 71.1, 70.9, 70.8, 70.2, 69.7, 69.5(9), 69.5(6), 69.4(2), 69.3(7), 69.2, 68.6, 68.3, 67.1, 66.7(3), 66.6(7), 66.1, 65.5, 62.4, 62.1, 61.9, 61.6 y 60.2 (26C, 25 x carbonos de azúcar excluyendo 5 x azúcar-C1 y bencil CH<sub>2</sub>), 20.9, 20.8(2), 20.8(0), 20.7(8), 20.7, 20.6, 20.5(4), 20.5(1), 20.4(9) y 20.4(6) (10C, 16 x Ac).



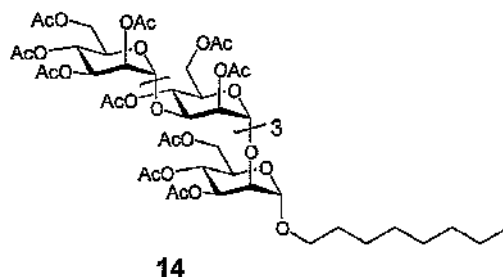
#### **Polisulfato de bencil glicosida (pg500)**

El compuesto 13 se desacetiló (HRMS calculado para poliol C<sub>37</sub>H<sub>59</sub>O<sub>26</sub> [M + H]<sup>+</sup> 919.3296, encontrado 919.3279) y se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para dar el producto (PG500) como un polvo blanco, 76.1 mg, 44%. RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ 7.35-7.26 (m, 5H, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.32 (s, 1H), 5.30 (d, 1H, J= 1.2), 5.26 (d, 1H, J= 2.0), 5.24 (d, 1H, J= 1.6), 5.05 (dd, 1H, J= 2.8, 2.0), 5.00 (d, 1H, J= 2.0), 4.87-4.85 (m, 2H), 4.68-4.34 (m, 12H), 4.32-3.86 (m, 17H); RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O, 100 MHz) δ 137.0, 129.5, 129.4, 129.1, 100.5 (9), 100.5 (6), 100.2, 97.9, 93.8, 76.9, 76.8, 75.6,



75.5 (3), 75.4 (8), 74.4, 73.8, 73.1, 73.0, 72.8, 72.7, 71.8, 71.3, 70.7, 70.6, 70.4, 69.9, 69.8, 69.7, 68.0, 67.8, 67.5, 66.6, 66.3 (7), 66.3 (5).

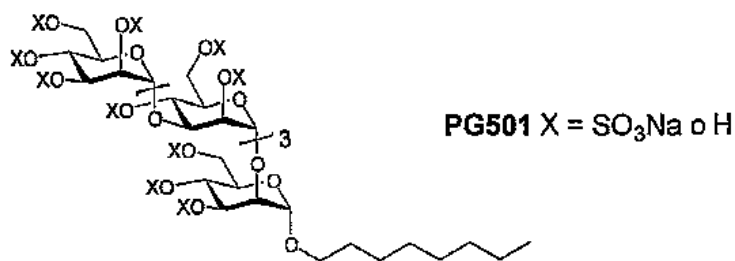
### Ejemplo 3: polisulfato de octil glicosida (pg501)



**14**

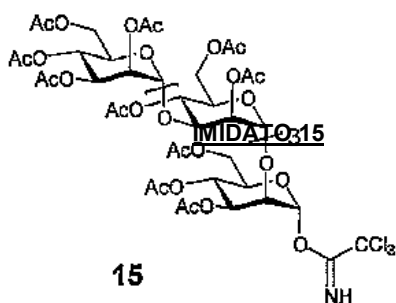
#### Octil glicosida 14

La glicosilación se realizó usando 12 y octanol para dar el producto (14) como una goma incolora, 207 mg, 66% ( $R_f$  = 0.41, hexano-EtOAc = 1:3). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.23-5.09 (m, 8H), 4.96-4.82 (m, 8H), 4.23-3.71 (m, 19H), 3.59 (dt, 1H,  $J$  = 9.4, 6.8,  $\text{OCH}_2\text{R}$ ), 3.35 (dt, 1H,  $J$  = 9.4, 6.8,  $\text{OCH}_2\text{R}$ ), 2.11, 2.10 (2), 2.09 (8), 2.06, 2.05, 2.04 (4), 2.04(1), 2.03 (8), 2.03, 2.02, 2.01, 1.99 (3), 1.98 (8), 1.96, 1.94 y 1.90 (16s, 48H, 16 x Ac), 1.52 (quinteto, 2H,  $J$  = 7.2,  $\text{CH}_2$ ), 1.27-1.18 (m, 10H,  $(\text{CH}_2)_5$ ), 0.80 (t, 3H,  $J$  = 7.2,  $\text{CH}_3$ ); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  170.4 (0) (2C), 170.3 (8) (2C), 170.3, 170.2, 170.1, 169.9 (2C), 169.8 (2), 169.7 (5), 169.6, 169.5, 169.4 (4), 169.3 (5), 169.3 (16 x CO, 3 solapado), 99.1 (2C), 98.8, 98.7, 98.0 (5 x azúcar-C1), 77.0, 75.0, 74.8 (3), 74.7 (5), 71.0, 70.8, 70.7, 70.1, 69.4 (9), 69.4 (7), 69.3 (0), 69.2 (7), 69.2, 68.3, 68.2 (0), 68.1 (6), 67.2, 66.6 (4), 66.6 (0), 66.1, 65.4, 62.4, 62.3, 61.8 y 61.5 (25C, carbonos de azúcar, excluyendo azúcar-C1 y octil- $\text{CH}_2\text{O}$ ), 31.5, 29.1, 29.0, 28.9, 25.9, 22.4 (6 x octil- $\text{CH}_2$ ), 20.7 (3), 20.7 (0), 20.6 (7), 20.6, 20.5, 20.4 (3), 20.4 (0), 20.3 (9), 20.3 (7) (9C, 16 x Ac), 13.85 (octil- $\text{CH}_3$ ).



**PG501 X =  $\text{SO}_3\text{Na}$  o H**

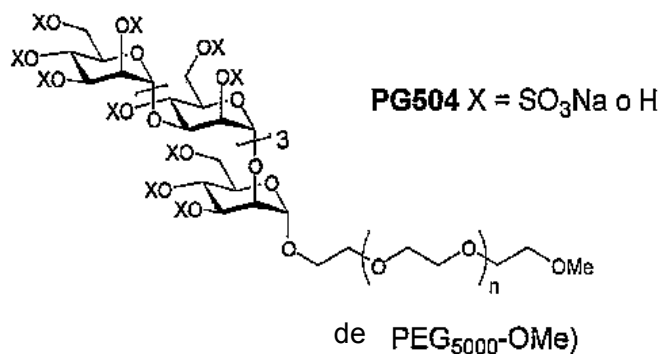
El compuesto 14 se desacetiló (HRMS calculado para poliol  $\text{C}_{38}\text{H}_{69}\text{O}_{26}$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  941.40784, encontrado 941.4060.) y se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para dar el producto (PG501) como un polvo blanco, 195 mg, 72%. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz)  $\delta$  5.33 (s, 1H), 5.29 (d, 1H,  $J$  = 1.6), 5.24 (d, 1H,  $J$  = 1.6), 5.21 (d, 1H,  $J$  = 1.6), 5.03 (dd, 1H,  $J$  = 2.8, 2.0), 4.87 (d, 1H,  $J$  = 1.6), 4.86-4.83 (m, 2H), 4.70-3.92 (m, 27H), 3.59 (dt, 1H,  $J$  = 9.6, 7.0), 3.44 (dt, 1H,  $J$  = 9.6, 7.0), 1.48-1.40 (m, 2H), 1.21-1.08 (m, 10H), 0.678 (t, 3H,  $J$  = 7.2); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 100 MHz)  $\delta$  100.5, 100.4, 100.1, 100.0, 99.0, 98.4(1), 98.3 (8), 98.3 (6), 98.3 (5), 76.8 (5), 76.7 (9), 76.7, 76.6, 76.5 (2), 76.4 (7), 76.0, 75.4 (0), 75.3 (5), 75.3, 75.2, 74.3, 73.0 (5), 72.9 (9), 72.7, 72.6, 71.7, 70.4, 70.2, 69.8 (4), 69.7 (5), 69.6, 69.1, 67.8 (5), 67.7 (7), 66.5, 66.2, 31.5, 30.0, 28.8, 25.8, 22.5, 14.0.

**Ejemplo 4: polisulfato peg5000 (pg504)****Imidato 15**

(A) Una mezcla del acetato (12)(68 mg, 51  $\mu$ mol) y  $\text{BnNH}_2$  (17  $\mu$ L, 152  $\mu$ mol) en THF (2 mL), se agitó (temperatura ambiente) durante algún tiempo (2 días). La mezcla se diluyó con  $\text{CHCl}_3$  (20 mL) y se sometió a preparación. Se evaporó la fase orgánica y se co-evaporó (2 x 10 mL de MeCN) y se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

(B) Se le añadió DBU (10  $\mu$ L, 6.7  $\mu$ mol) a una solución del producto crudo (de A) y tricloroacetoniitrilo (1.0 mL, 10 mmol) en 1,2-DCE (4 mL) y la mezcla combinada se agitó (0° C  $\rightarrow$  12° C, durante la noche). La mezcla se concentró y se sometió el residuo a FC (50- 90% EtOAc/hexanos) para producir 15 como un aceite de color amarillo claro (35 mg, 48%, 2 pasos).

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.70 (s, 1 H, NH), 6.32 (d, 1H,  $J = 2.0$ ,  $\text{H}^1$ ), 5.36-5.13 (m, 8H), 5.00-4.90 (m, 6H), 4.26-3.75 (m, 20H), 2.15-1.94 (m, 48H).

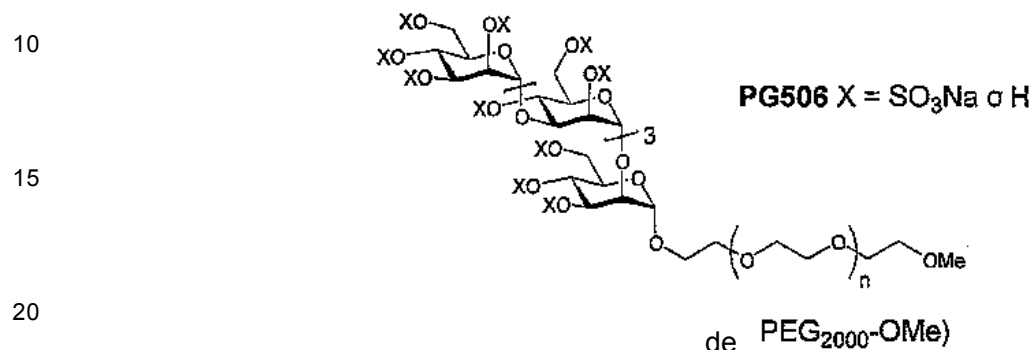
**Polisulfato peg5000 (pg504)**

(A) Una mezcla del imidato 15 (33 mg, 20.2  $\mu$ mol) y éter monometílico de  $\text{PEG}_{5000}$  (151 mg, 30.3  $\mu$ mol) en 1,2-DCE (3 mL), se agitó en la presencia de tamices moleculares (50 mg de polvo de 3Å) bajo una atmósfera de argón (10 min). Se enfrió la mezcla (-20 °C) con agitación continua (10 min) antes de añadirle TMSOTf (5  $\mu$ L, 2.8  $\mu$ mol). Después de algún tiempo (20 min), se introdujo  $\text{Et}_3\text{N}$  (10  $\mu$ L) y se filtró la mezcla. Se evaporó el solvente y se sometió el residuo a FC (0-7.5% MeOH/ $\text{CHCl}_3$ ) para producir 16 como un cristal incoloro (104 mg, 80%, basado en una  $M_r$  promedio de 6483). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.28-4.87(m, 14H), 4.43-3.42 (m, 829 H), 3.34 (s, 3H, OMe), 2.15-1.94 (m, 48H).

(B) Se desacetiló el Compuesto 16 (104 mg, 16  $\mu$ mol) de acuerdo con el procedimiento general para producir Man- $\text{PEG}_{5000}$ -OMe como una cera incolora (82 mg, 89%, basado en un  $M_r$  promedio de 5769).

(C) El M<sub>5</sub>-PEG<sub>5000</sub>-OMe (82 mg, 14 μmol) se sulfonó de acuerdo con el procedimiento general para producir PG504 como una espuma incolora (45 mg, 42%, basado en un Mr promedio de 7401). RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ 5.34-4.87 (m, 7H), 4.71-3.97 (m, 20H), 3.76-3.35 (m, 432H), 3.23 (s, 3H, OMe).

#### 5 **Ejemplo 5: polisulfato peg2000 (pg506)**

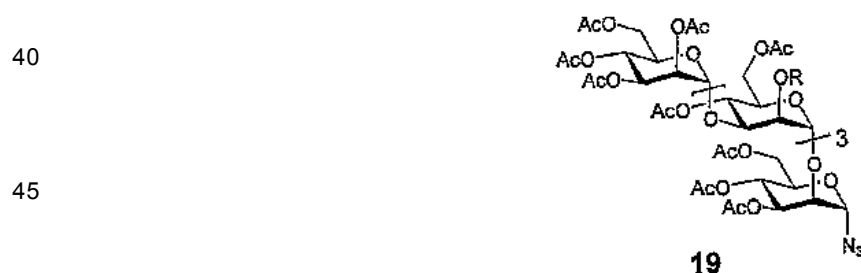


25 (A) Una mezcla del imidato (15) (60 mg, 36.5 μmol) Y PEG<sub>2000</sub>-OMe (110 mg, 55.0 μmol) se trató con TMSOTf tal como se describió para el PEG<sub>5000</sub>-OMe para producir el compuesto 17 como un cristal incoloro (96 mg, 74%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 5.28-5.13, 5.00-4.87, 4.27-3.40 (3m, muchos H, H1<sup>I-V</sup>, 2<sup>I-V</sup>, 3<sup>I-V</sup>, 4<sup>I-V</sup>, 5<sup>I-V</sup>, 6a<sup>I-V</sup>, 6b<sup>I-V</sup>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.34 (s, 3H, OMe), 2.15-1.94 (16s, 3H cada uno, COMe).

30 (B) Se desacetiló el Compuesto 17 de acuerdo con el procedimiento general para producir el poliol PEG<sub>2000</sub>-OMe como una cera incolora (63 mg, 81%). Se usó el residuo en la siguiente reacción sin purificación o caracterización adicional.

35 (C) El producto de (B) anterior se sulfonó de acuerdo con el procedimiento general para producir el compuesto base (PG506) como un polvo incoloro (47 mg, 68%). RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ 5.34-3.97(m, 498H), 3.80-3.35 (m, 81H), 3.23 (s, 3H, OMe).

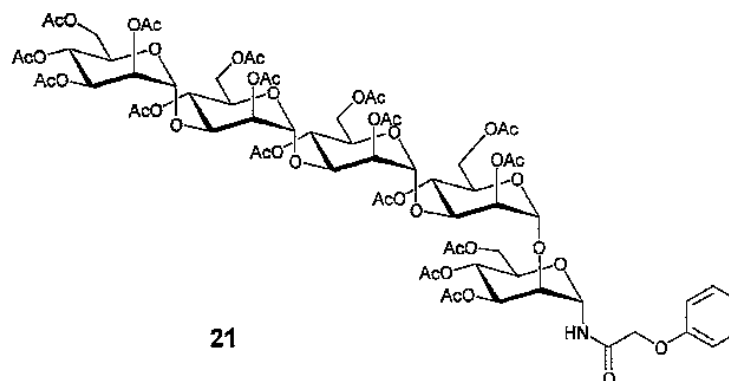
#### **Ejemplo 6: pg502**



#### **azida 19**

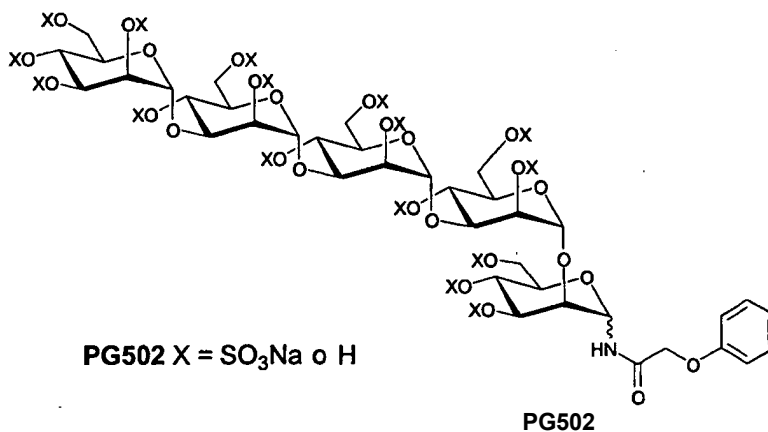
55 Una solución de peracetato 12 (270 mg, 175 μmol), TMSN<sub>3</sub> (60 mg, 525 μmol) y SnCl<sub>4</sub> (200 μL de 1M en DCM) en DCM anhidro (20 mL), se agitó durante la noche en la oscuridad. Se añadieron cantidades adicionales (3 eq.) de TMSN<sub>3</sub> y se añadió SnCl<sub>4</sub> y se continuó la agitación en la oscuridad durante la noche de nuevo. Se añadió hielo y NaHCO<sub>3</sub> (acuoso saturado) y se extrajo la mezcla con EtOAc, se lavó con salmuera, se evaporó y se sometió a cromatografía instantánea (10 g gel de sílice, gradiente de elución, 50:50 hasta 75:25 EtOAc:Hx) para producir 218 mg (82%) de azida 19. RMN de

$^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  5.52 (d, 1H,  $J = 2.0, \text{H}^1$ ), 5.29-5.12 (m, 8H), 5.02-4.87 (m, 7H), 4.29-3.76 (m, 19H), 2.18-1.95 (m, 48H); RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.5(9), 180.5(7), 170.5(6), 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.9(9), 169.9(8), 169.9(5), 169.7(3), 169.6(9), 169.6(6), 169.6, 169.5, 169.3, 99.3(0), 99.2(7), 99.1, 99.0, 88.1, 75.2, 75.1, 74.8, 71.1, 70.9, 70.8, 70.6, 69.7, 69.5, 69.4, 69.2, 68.3, 67.3, 66.8, 66.7, 65.5(9), 65.5(8), 62.6, 62.2, 62.0, 61.7, 20.8(8), 20.8(6), 20.8, 20.7, 20.6(2), 20.5(8), 20.5(7), 20.5. HRMS calculado para  $\text{C}_{62}\text{H}_{84}\text{N}_3\text{O}_{41}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1526.4583, encontrado 1526.4557.

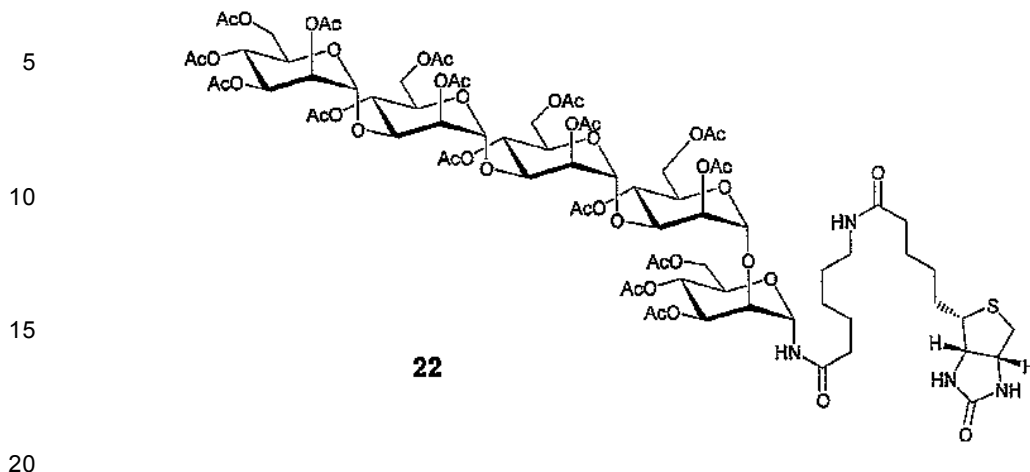


#### 1-desoxi-1- $\alpha$ -fenoxiacetamido peracetato 21

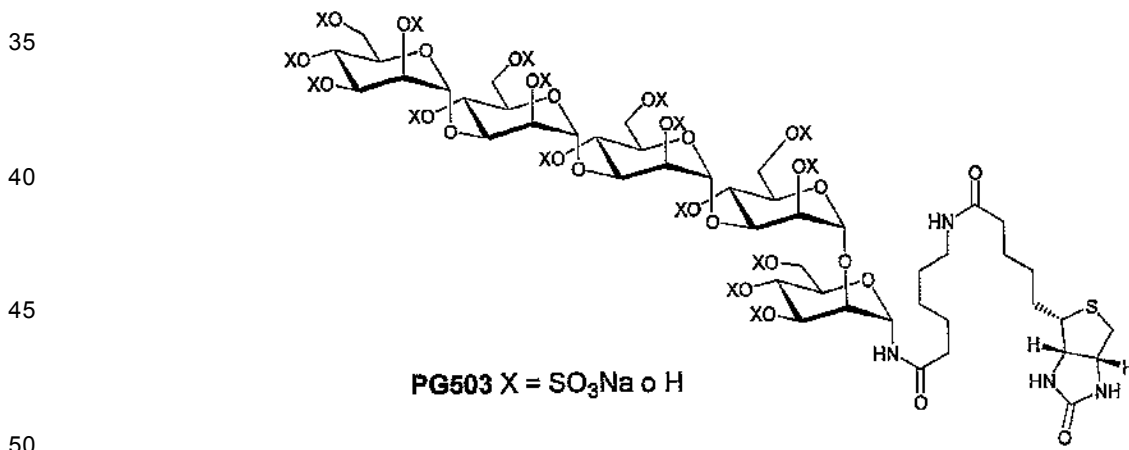
Una solución de 19 (32 mg, 21  $\mu\text{mol}$ )  $\text{PPh}_3$  (11 mg, 42.6  $\mu\text{mol}$ ) y cloruro de fenoxiacetilo (7.3 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) en acetonitrilo anhidro (5 mL), se agitó a 0  $^\circ\text{C}$  durante 4 horas, luego a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió  $\text{EtOAc}$  y  $\text{NaHCO}_3$  (saturado acuoso) y se lavó la capa orgánica con salmuera, luego se secó ( $\text{MgSO}_4$ ) y se sometió a cromatografía instantánea (gradiente de elución 60:40 hasta 90:10  $\text{EtOAc}:\text{Hx}$ ) para producir 11.4 mg (33%) de amida 21 con algo de  $\text{PPh}_3/\text{PPh}_3\text{O}$  remanente. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  7.36-7.32 (m, 2H), 7.18 (br d, 1H,  $J = 8.1$ , NH), 7.00-6.90 (m, 3H), 5.79 (dd, 1H,  $J = 3.8, 8.2, \text{H}^1$ ), 5.32-4.97 (m, 15H), 4.60-3.76 (m, 21H), 2.20-1.95 (m, 48H), AcO). HRMS calculado para  $\text{C}_{70}\text{H}_{92}\text{NO}_{43}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  1634.5045, encontrado 1634.5002.



El peracetato 21 (11 mg, 6.7  $\mu\text{mol}$ ) se desacetiló y se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir 6 mg (34 % para 2 pasos) de PG502 después de la liofilización. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , solvente suprimido)  $\delta$ : 7.30-7.21 (m, 2H,  $\text{ArH}^m$ ), 6.96-6.84 (m, 3H,  $\text{ArH}^{o,p}$ ), 5.56-3.59 (m, 30H afectado por supresión).

**Ejemplo 7: pg503****Peracetato de 1-desoxi-1-α-biotinamidocaproamido 22**

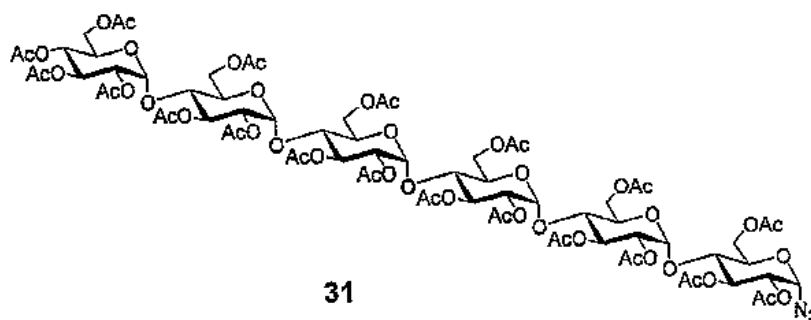
Una mezcla de 19 (70 mg, 46 μmol) y catalizador de Adam (2 mg) en EtOAc:EtOH 2:1 (3 mL) se agitó bajo H<sub>2</sub> (689 kPa (100 psi)) durante la noche, luego se filtró, se evaporó y se co-evaporó con piridina anhidra. Se añadió éster N-hidroxisuccinimídico de biotinamidocaproato (31 mg, 68 μmol) y se le añadió 1 mL de piridina anhidra y la mezcla se calentó hasta 60° C durante 3 días con agitación. Se evaporó la solución y se sometió a cromatografía instantánea (9.4 g de gel de sílice lavado con Et<sub>3</sub>N, gradiente de elución 75:25 EtOAc:Hx hasta 30:70 MeOH:EtOAc) para dar 30.8 mg (36 % en dos pasos) de amida 22. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.41 (br d, 1H, J= 9.4, NH), 6.47, 6.17 (2 x br s, 2 x 1H, imida NHs), 5.40 (br d, 1H, J = 9.4, H1'), 5.40-4.90(m, 16H), 4.52 (dd, 1H, J= 4.9, 7.5, biotina-H4), 4.36-3.72 (m, 20H), 3.25-3.12 (m, 3H), 2.91 (dd, 1H, J= 5.0, 13.0, biotina-H5A), 2.75 (d, 1H, J= 12.9, biotina-H5B), 2.27-1.96 (m, 52H), 1.82-1.29 (m, 12H, cadenas alquilo).

**PG503**

El peracetato 22 (30 mg, 16.3 μmol) se desacetiló y se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir 28 mg (61 % para 2 pasos) de PG503 después de la liofilización. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, solvente suprimido, afectado por rotámeros amida) δ 5.60-4.75 (m, 7H, azúcar Hs), 4.68 (dd, 1H, J= 4.7, 7.2, biotina-H4), 4.60-3.60 (m, 26H, azúcar Hs), 4.21 (dd, 1H, J= 4.4, 7.2, biotina-H3), 3.33-3.16 (m, 1H, biotina-H2), 3.07-2.97 (m, 3H, biotina-H5A+CH<sub>2</sub>N), 2.92 (dd, 1H, J= 4.9, 13.5, biotina-H5B), 2.33-2.14 (m, 2H, COCH<sub>2</sub>B), 2.09 (t, 2H, J= 7.4, COCH<sub>2</sub>A), 1.63-

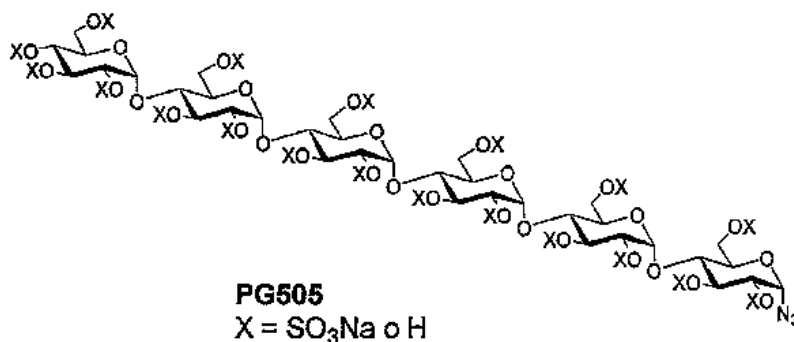
1.15 (m, 12H, cadenas alquilo).

**Ejemplo 8: pg505 (Ejemplo de referencia)**



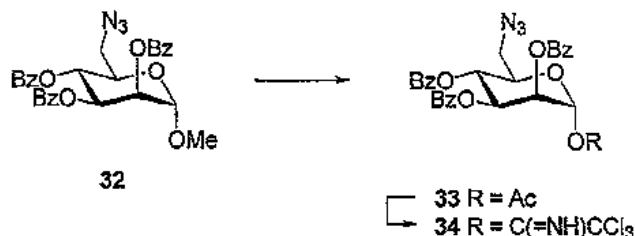
**Azida 31.**

Una solución de peracetato de maltohexosa (500 mg, 273  $\mu$ mol), TMSN<sub>3</sub> (83 mg, 726  $\mu$ mol) y SnCl<sub>4</sub> (145  $\mu$ L de 1M en DCM) en DCM anhidro (20 mL) se agitó durante la noche en la oscuridad. Se añadió cantidades de adición de TMSN<sub>3</sub> (50  $\mu$ L) y SnCl<sub>4</sub> (100  $\mu$ L de 1M en DCM) y se continuó la agitación en la oscuridad durante la noche de nuevo. Se le añadió hielo y NaHCO<sub>3</sub> (acuoso saturado) y se extrajo la mezcla con EtOAc, se lavó con salmuera, se evaporó y se sometió a cromatografía instantánea (10 g gel de sílice, gradiente de elución, 75:20 hasta 80:20 EtOAc:Hx) para producir 488 mg (98%) de azida 31. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$ : 5.30-5.11 (m, 11H), 4.93 (t, 1H, *J* = 9.9), 4.72 (dd, 1H, *J* = 4.0, 10.5), 4.68-4.57 (m, 6H), 4.44-3.67 (m, 23H), 2.09-1.85 (m, 57H). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 170.3 (4), 170.3(1), 170.2 (7), 170.2, 170.1 (4), 170.1 (0), 170.0 (7), 170.0, 169.6, 169.4, 169.3, 169.2 (3), 169.2 (2), 169.1 (7), 169.1 (4), 169.1 (1), 95.5 (0), 95.4 (5), 95.4, 95.3, 87.1, 74.7, 73.9, 73.3, 73.2, 72.2, 71.4, 71.3, 71.2 (4), 71.2(1), 70.2, 70.1, 69.8, 69.0, 68.8, 68.7, 68.2, 67.7, 62.4, 62.3, 62.1 (8), 62.1 (6), 62.0, 61.1, 30.0, 20.5 (5), 20.5 (3), 20.5 (0), 20.4 (6), 20.3 (3), 20.2 (8), 20.2 (4), 20.2 (2).



**PG505**

La azida 31 (97 mg, 54  $\mu$ mol) se desacetiló y se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir 66 mg (41 % para 2 pasos) de PG505 después de la liofilización. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O, solvente suprimido)  $\delta$ : 3.69-5.78 (m, 42H afectado por la supresión del solvente).

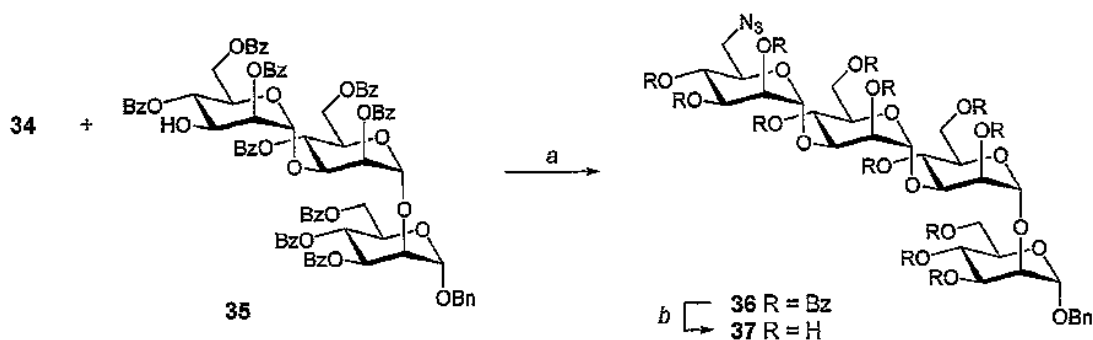
**Ejemplo 9: pg515 (Ejemplo de referencia)****Tricloroacetimidato de 6-azido-6-desoxi-2,3,4-tri-*o*-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil (34)**

(A) Se le añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mL) a una solución enfriada (0 °C) de la metil glicosida (32) [29] (1.52 g, 2.9 mmol) y Ac<sub>2</sub>O (10 mL) en AcOH (5 mL) y la mezcla combinada se agitó (0 °C→temperatura ambiente, durante la noche). Se le añadió NaOAc (1.0 g) por porciones hasta obtener un pH > 5.0 y luego la mezcla se trató con MeOH (3 mL). Se filtró la mezcla y se evaporó el solvente y se co-evaporó (tolueno) antes de tratarlo (EtOAc) y RSF (10-20% EtOAc/hexano) para producir presumiblemente el acetato (33) como una espuma incolora (1.12 g, 70%).

(B) Se le añadió acetato de hidrazina (196 mg, 2.13 mmol) a una solución agitada del acetato (33) (1.08 g, 1.94 mmol) en DMF (10 mL) y la mezcla combinada se calentó (55 °C, 15 min). La mezcla se vació sobre NaCl saturado y se extrajo (EtOAc). Se evaporó la capa orgánica y se sometió a RSF (10-30% EtOAc/hexano) para producir un aceite incoloro (888 mg). Este residuo se co-evaporó (2 x 100 mL CH<sub>3</sub>CN) y se usó en la siguiente reacción sin purificación o caracterización adicional.

(C) Se le añadió DBU (3 gotas) a una solución del producto crudo de (B) (anterior) (888 mg) y Cl<sub>3</sub>CN (2.0 mL, 20 mmol) en 1,2-DCE (8 mL) y la mezcla combinada se agitó (0 °C→temperatura ambiente, 1 h). Se filtró la mezcla, se evaporó el solvente y se sometió el residuo a FC (10-30% EtOAc/hexano) para producir el imidato (34) como un aceite incoloro (777 mg, 61%, 2 pasos).

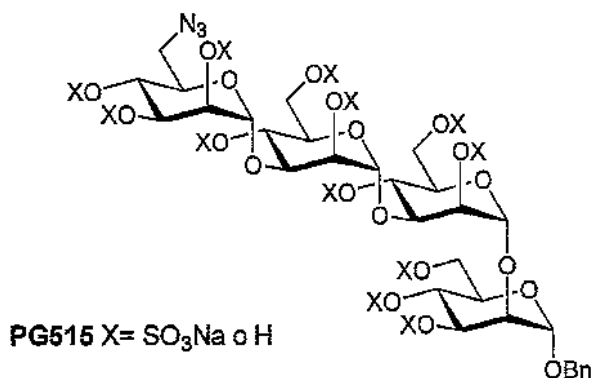
RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.88 (br s, 1H, NH), 8.10-7.22 (m, 15H, ArH), 6.56 (d, 1H, J<sub>1</sub>, 2 2.0 Hz, H<sub>1</sub>), 5.99 (dd, 1H, J<sub>3,4</sub>~4, 5 9.6 Hz, H<sub>4</sub>), 5.94-5.88 (m, 2H, H<sub>2,3</sub>), 4.44 (ddd, 1H, J<sub>5</sub>, 6 2.8, 5.6 Hz, H<sub>5</sub>), 3.54 (dd, 1H, J<sub>6</sub>, 6 13.6 Hz, H<sub>6</sub>), 3.47 (dd, 1H, H<sub>6</sub>). RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  165.61, 165.37, 159.95, 134.00, 133.92, 133.58, 130.25, 130.05, 129.12, 129.04, 128.97, 128.91, 128.76, 128.74, 128.57, 94.62, 73.03, 69.69, 68.90, 67.05, 51.06.



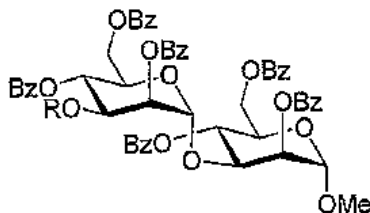
**Bencil(6-azido-6-desoxi- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(  $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(  $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-(  $\alpha$ -D-mannopiranosida) (37)**

(A) Una mezcla del imidato (34) (93 mg, 141  $\mu$ mol), el alcohol (35) (90 mg, 94.1  $\mu$ mol) y tamices moleculares (50 mg de polvo de 3 Å) en 1,2-DCE (3 mL) se trató con TMSOTf (10  $\mu$ L, 55.1  $\mu$ mol) y la mezcla combinada se agitó (0°C $\rightarrow$ temperatura ambiente, 20 min). Se introdujo Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L), se filtró la mezcla y se evaporó el residuo. Se sometió el residuo a FC (10-40% EtOAc/hexano) para producir la azida (36) como un aceite incoloro (68 mg, 57%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.80-7.12 (m, 65H, ArH), 6.01 (dd, 1H,  $J_{3,4,5}$  9.9 Hz, H4<sup>III</sup>), 5.96 (dd, 1H,  $J_{3,4,5}$  9.9 Hz, H4<sup>I</sup>), 5.92 (dd, 1H,  $J_{3,4,5}$  9.6 Hz, H4<sup>II</sup>), 5.83 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.3 Hz, H3<sup>I</sup>), 5.79 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  2.0,  $J_{2,3}$  3.3 Hz, H2<sup>II</sup>), 5.70 (dd, 1H,  $J_{3,4,5}$  9.9 Hz, H4<sup>IV</sup>), 5.50 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.3 Hz, H3<sup>IV</sup>), 5.36 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz, H1<sup>III</sup>), 5.29 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz, H2<sup>III</sup>), 5.23 (d, 1H, H1<sup>II</sup>), 5.18 (dd, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz, H2<sup>IV</sup>), 5.16 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz, H1<sup>I</sup>), 4.87 (d, 1H, H1<sup>IV</sup>), 4.72-4.24 (m, 14H, H2<sup>I</sup>, H3<sup>I,II,III</sup>, H5<sup>I-III</sup>, H6<sup>I-III</sup>), 3.99 (ddd, 1H,  $J_{5,6}$  2.9, 3.4 Hz, H5<sup>IV</sup>), 3.02 (dd, 1H,  $J_{6,6}$  13.5 Hz, H6<sup>IV</sup>), 2.83 (dd, 1H, H6<sup>IV</sup>).

(B) El benzoato (36) (63 mg, 31  $\mu$ mol) se transesterificó de acuerdo con el procedimiento general y cromatografía (C18, 0-10% MeOH/H<sub>2</sub>O) del residuo para producir el tetrasacárido (37) como un cristal incoloro (15 mg, 62%). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7.34-7.22 (m, 5H, ArH), 5.12 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.5 Hz, H1a), 5.09 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.7 Hz, H1b), 5.07 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz, H1c), 4.92 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz, H1d), 4.71, 4.48 (AB de cuarteto AB,  $J$  11.7 Hz, CH<sub>2</sub>Ph), 4.14 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz, H2a), 4.19 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.2 Hz, H2b), 3.96 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.4 Hz, H2c), 3.94 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.4 Hz, H3b), 3.88-3.52 (m, 19H, H2d, H3a,c,d, H4a-d, H5a-d, H6a-d), 3.44 (dd, 1H,  $J_{5,6}$  6.3,  $J_{6,6}$  10.1 Hz, H6<sup>IV</sup>).

**PG515**

El tetrasacárido 37 (12 mg, 15.3  $\mu$ mol) se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir 14 mg (38 % para 2 pasos) de PG515 después de la liofilización. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.47-7.37 (m, 1H, ArH), 5.45-4.02 (m, 29H, C1<sup>I-IV</sup>, 2<sup>I-IV</sup>, 3<sup>I-IV</sup>, 4<sup>I-IV</sup>, 5<sup>I-IV</sup>, 6a<sup>I-IV</sup>, 6b<sup>I-III</sup>, CH<sub>2</sub>Ph), 3.69-3.67 (m, 1H, H6b<sup>IV</sup>).

**EJEMPLO 10: PG509 (Ejemplo de referencia)**

38 R= alilo

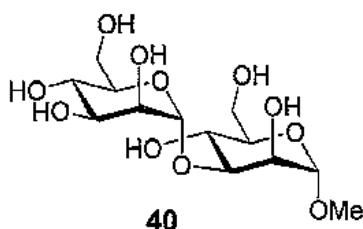
39 R=H



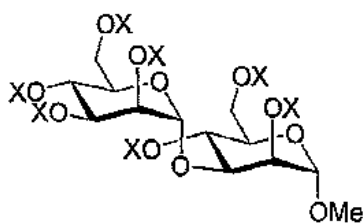
**Metil3-o-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -d-mannopiranosil)-2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -d-mannopiranosida (39)**

(A) Una mezcla de tricloro-acetimidato de 3-O-alil-2,4,6-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil [26] (410 mg, 0.57 mmol) y metil 2,4,6-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosida [26] (300 mg, 0.51 mmol) en 1,2-DCE (6 mL) en la presencia de tamices moleculares (700 mg de polvo de 3Å) se trató con TMSOTf (30  $\mu$ L, 0.17 mmol) y la mezcla combinada se agitó (0° C  $\rightarrow$  temperatura ambiente, 30 min). Se le introdujo Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L), se filtró la mezcla y se evaporó el solvente. Se sometió el residuo a FC (10-50% EtOAc/hexano) para producir, presumiblemente, disacárido 38 como un aceite incoloro.

(B) Se le añadió PdCl<sub>2</sub> (40 mg) a una solución del producto de (A) en MeOH (10 mL) y 1,2-DCE (10 mL) y se calentó la mezcla combinada (70°, 40 min). Los solventes fueron evaporados y se sometió el residuo a FC (10-50% EtOAc/hexanos) para producir el alcohol (39) como un aceite incoloro (316 mg, 68%, 2 pasos). Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y con <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) fueron similares a los ya reportados en la literatura [26].

**Metil([ $\alpha$ ]-d-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-([ $\alpha$ ]-d-mannopiranosida) (40)**

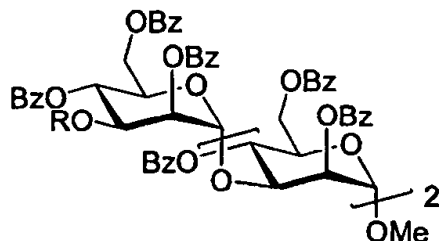
El alcohol (39) (10 mg, 0.10 mmol) se transesterificó de acuerdo con el procedimiento general para producir el disacárido (40) como un aceite incoloro (3 mg, 85%), idéntico por RMN al reportado en la literatura [30, 31].



**PG509**    X = SO<sub>3</sub>Na

**PG509.**

El disacárido 40 (25 mg, 70  $\mu$ mol) se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir 27 mg (36%) de PG509 después de la liofilización. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz; H<sup>1</sup>), 4.98 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.4 Hz; H<sup>2</sup>), 4.87 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H<sup>1</sup>), 4.60-4.55 (m, 1H; H<sup>3</sup>), 4.53 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.3 Hz; H<sup>2</sup>), 4.41-4.19 (m, 5H; H<sup>4</sup>, 4<sup>''</sup>, 6a<sup>''</sup>, 6b<sup>''</sup>), 4.15 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.3 Hz; H<sup>3</sup>), 4.06-3.91 (m, 3H; H<sup>5</sup>, 5<sup>''</sup>, 6b<sup>''</sup>), 3.29 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>).

**Ejemplo 11: pg508 (Ejemplo de referencia)**

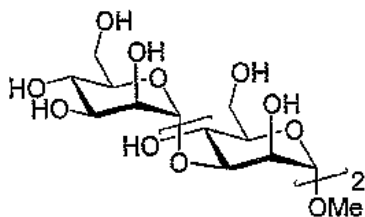
41 R= alilo

42 R= H

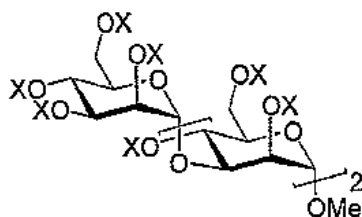
**Metil3-o-[3-o-(2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-2,4,6-tri-o-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosida] (42)**

(A) Una mezcla de tricloro-acetimidato de 3-O-alil-2,4,6-tri-O-benzoil- $\alpha$ -D-mannopiranosil (269 mg, 0.37 mmol) y el alcohol (39) (306 mg, 0.31 mmol) en 1,2-DCE (5 mL) en la presencia de tamices moleculares (100 mg de polvo de 3A) se trató con TMSOTf (20  $\mu$ L, 0.11 mmol) y la mezcla combinada se agitó (0  $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  temperatura ambiente, 30 min). Se introdujo Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ L), se filtró la mezcla y se evaporó el solvente. Se sometió el residuo a FC (10-50% EtOAc/hexano) para producir, presumiblemente, el trisacárido 41 como un aceite incoloro.

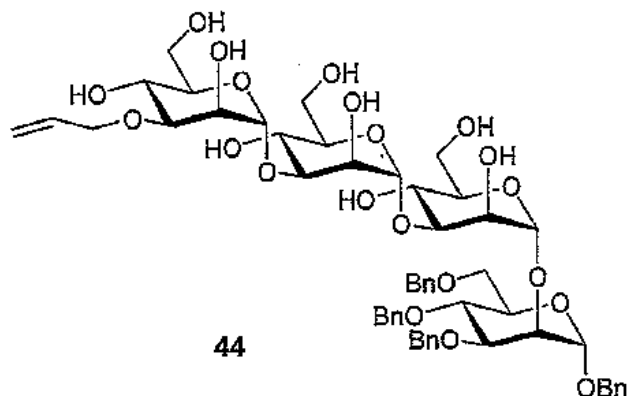
(B) Se le añadió PdCl<sub>2</sub> (40 mg) a una solución del producto de (A) en MeOH (10 mL) y 1,2-DCE (10 mL) y se calentó la mezcla combinada (70 $^{\circ}$ , 40 min). Los solventes fueron evaporados y se sometió el residuo a FC (10-50% EtOAc/hexanos) para producir el alcohol (42) como un aceite incoloro (316 g, 70%, 2 pasos). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.14-7.22 (m, 45H, ArH), 6.63 (dd, 1H, J<sub>1III, 2III</sub> 1.8, J<sub>2III, 3III</sub> 3.3 Hz, H2<sup>III</sup>), 5.94 (dd, 1H, J<sub>3III, 4III</sub> 10.0, J<sub>4III, 5III</sub> 10.0 Hz, H4<sup>III</sup>), 5.84 (dd, 1H, J<sub>3II, 4II</sub> 9.9, J<sub>4II, 5II</sub> 9.9 Hz, H4<sup>II</sup>), 5.48 (dd, 1H, J<sub>3I, 4I</sub> 9.8, J<sub>4I, 5I</sub> 9.8 Hz, H4<sup>I</sup>), 5.26 d, 1H, J<sub>1I, 2I</sub> 1.9 Hz, H1<sup>I</sup>), 5.22 (dd, 1H, J<sub>1II, 2II</sub> 2.1, J<sub>2II, 3II</sub> 3.0 Hz, H2<sup>II</sup>), 4.91 (d, 1H, H1<sup>II</sup>), 4.90 (dd, 1H, J<sub>2I, 3I</sub> 3.2 Hz, H2<sup>I</sup>), 4.86 (dd, 1H, J<sub>1II, 2II</sub> 1.7 Hz, H1<sup>II</sup>). 4.67-4.63 (12H, H3<sup>I</sup>, 3<sup>II</sup>, 3<sup>III</sup>, 5<sup>I</sup>, 5<sup>II</sup>, 5<sup>III</sup>, 6<sup>I</sup>, 6<sup>II</sup>, 6<sup>III</sup>). RMN de <sup>13</sup>C (100 mHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  166.49, 166.38, 166.25, 166.07, 165.94, 165.77, 165.63, 165.19, 165.15, 133.80, 133.60, 133.61, 133.58, 133.52, 133.06, 130.22, 130.16, 130.09, 130.05, 130.16, 129.97, 129.9, 129.88, 129.84, 129.51, 129.17, 129.01, 128.85, 128.63, 128.53, 128.5, 128.46, 99.35, 99.24, 98.73, 76.48, 76.12, 72.45, 71.77, 71.64, 69.93, 69.7, 69.01, 68.86, 68.6, 68.53, 67.82, 63.17, 62.79, 62.41, 55.66; ESMS: m/z 1373.4 [M - Bz + H + Na]<sup>+</sup>, 1269.4 [M - 2Bz + 2H + Na]<sup>+</sup>.

**43****Metil-( $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -D-mannopiranosida) (43)**

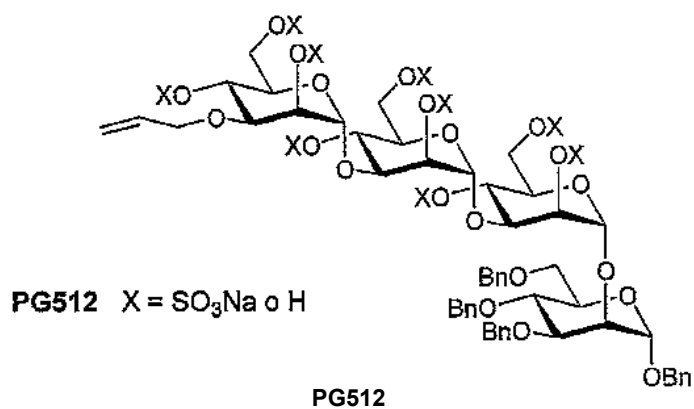
El alcohol (42) (115 mg, 0.79 mmol) se transesterificó de acuerdo con el procedimiento general para producir el trisacárido (43) como un aceite incoloro (35 mg, 86%), idéntico por RMN al reportado en la literatura [32]. HRMS: m/z 519.1862 [M + H]<sup>+</sup>, 541.1646 [M + Na]<sup>+</sup>.

PG508 X = SO<sub>3</sub>Na o H**PG508.**

El trisacárido 43 (25 mg, 49  $\mu$ mol) se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir 36 mg (49%) de PG508 después de la liofilización. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.9 Hz; H1<sup>III</sup>), 5.22 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz; H1<sup>I</sup>), 5.04 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  2.4 Hz; H2<sup>III</sup>), 4.89 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.6 Hz; H1<sup>I</sup>), 4.76-4.75 (m, 1H; H2<sup>I</sup>), 4.60-4.55 (m, 1H; H3<sup>III</sup>), 4.55 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H2<sup>I</sup>), 4.50 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.6,  $J_{4,5}$  9.7 Hz; H4<sup>III</sup>), 4.41-4.12, 4.04-3.91 (m, 12H; H3<sup>I</sup>, 4, 4<sup>I</sup>, 5<sup>I-III</sup>, 6a<sup>III</sup>, 6b<sup>I-III</sup>), 4.10 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.5 Hz; H3<sup>I</sup>), 3.29 (s, 3H; OCH<sub>3</sub>).

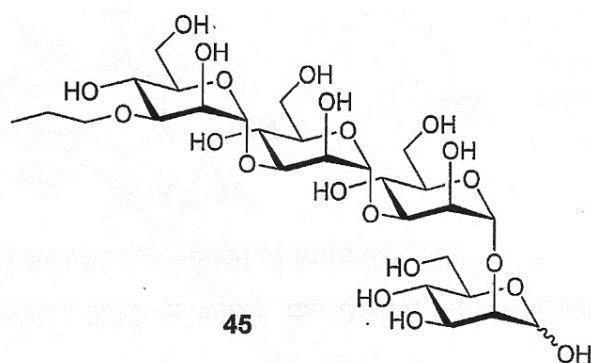
**Ejemplo 12: pg512 (Ejemplo de referencia)****Bencil(3-o-alil- $\alpha$ -d-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -d-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-( $\alpha$ -d-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-(3,4,6-tri-o-bencil- $\alpha$ -d-mannopiranosida) (44)**

Se le añadió sodio (pedazo pequeño) al nonabenzoato (28) (115 mg, 0.79 mmol en MeOH (6 mL) y la mezcla combinada se agitó (temperatura ambiente, durante la noche). La mezcla se neutralizó (Dowex 50X8, H<sup>+</sup>), se filtró y se concentró el filtrado y se sometió a FC (0-10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para producir el éter tetrabencílico (44) como un aceite incoloro (89 mg, 64%). RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.33-7.13 (m, 20H, ArH), 6.02-5.92 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.32-5.27, 5.11-5.09 (2m, 2H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.10 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.4 Hz, H1a), 5.09 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.5 Hz, H1b), 5.03 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.2 Hz, H1c), 4.97 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.4 Hz, H1d), 4.74, 4.49 (2d, AB de ABq,  $J_{H,H}$  10.9 Hz, PhCH<sub>2</sub>-a), 4.67, 4.48 (2d, AB de ABq,  $J_{H,H}$  11.8 Hz, PhCH<sub>2</sub>-b), 4.65, 4.58 (2d, AB de ABq,  $J_{H,H}$  11.6 Hz, PhCH<sub>2</sub>-c), 4.57, 4.51 (2d, AB de ABq,  $J_{H,H}$  12.4 Hz, PhCH<sub>2</sub>-d), 4.21-3.62 (m, 26H, H2<sup>I-IV</sup>, 3<sup>I-IV</sup>, 4<sup>I-IV</sup>, 5<sup>I-IV</sup>, 6a<sup>I-IV</sup>, 6b<sup>I-IV</sup>, OCH<sub>2</sub>CH=).

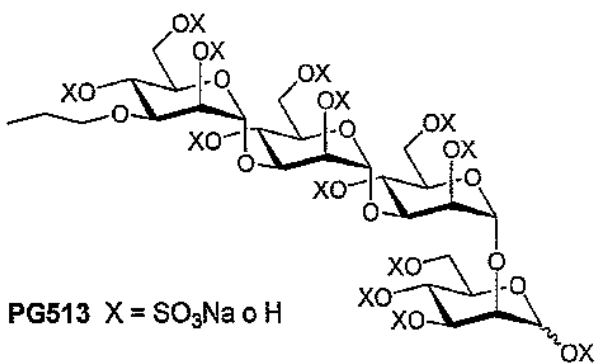


El tetrasacárido 44 (23 mg, 21.5 μmol) se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir PG512 como un polvo incoloro (26 mg, 61%). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.32-7.18, 7.00-6.98 (2m, 20H, ArH), 5.88-5.78 (m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.30-5.23, 5.08-5.04, 4.91-4.90, 4.83-4.82, 4.71-4.08, 4.00-3.89, 3.73-3.70, 3.62-3.45 (8m, 40H, CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH, H1-6<sup>I-IV</sup>, PhCH<sub>2</sub><sup>I-IV</sup>).

**Ejemplo 13: pg513 (Ejemplo de referencia)**

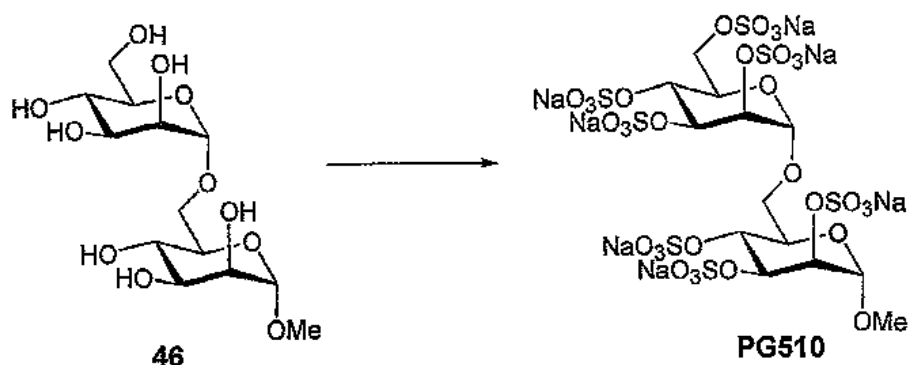


Una mezcla del éter tetrabencílico (44) (62 mg, 50 μmol) y Pd(OH)<sub>2</sub> (10 mg de 10% sobre C) en THF (1 mL) y H<sub>2</sub>O (1 mL) se agitó bajo H<sub>2</sub> (689 kPa (100 psi) (temperatura ambiente, durante la noche). Se filtró la mezcla, se concentró y se sometió a FC (SiO<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O) para producir el éter propílico (45) como un cristal incoloro (32 mg, 73%). RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 5.22 (br s, 1H, H1a), 5.00 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.7 Hz, H1b), 4.97 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.6 Hz, H1c), 4.87 (d, 1H, J<sub>1,2</sub> 1.8 Hz, H1d), 4.11-4.07, 3.91-3.35 (2m, 26H, H2<sup>I-IV</sup>, 3<sup>I-IV</sup>, 4<sup>I-IV</sup>, 5<sup>I-IV</sup>, 6a<sup>I-IV</sup>, 6b<sup>I-IV</sup>, OCH<sub>2</sub>), 1.50-1.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 0.76 (t, 3H, J<sub>H,H</sub> 7.2Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

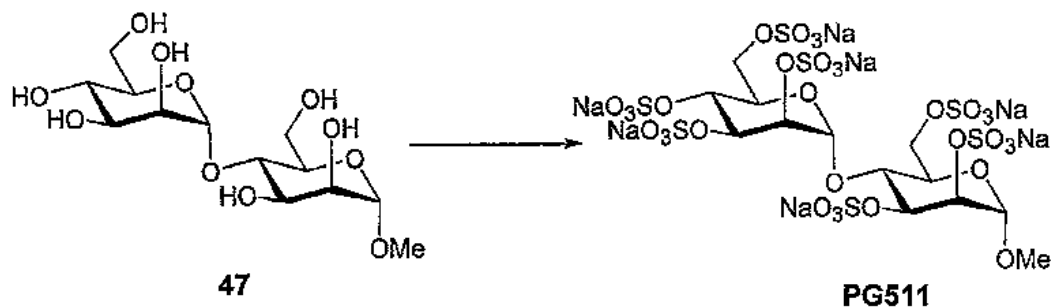


**PG513**

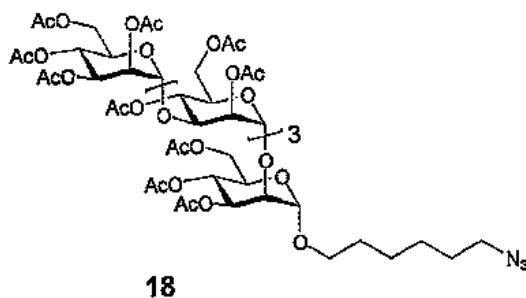
El tetrasacárido 45 (21 mg, 29.6  $\mu\text{mol}$ ) se sulfonó de acuerdo con los procedimientos generales para producir PG513 como un polvo incoloro (29 mg, 34%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.61 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.3 Hz; H1a), 5.61 (br s, 1H; H1b), 5.32 (d, 1H,  $J_{1,2}$  1.8 Hz; H1c), 5.26 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz; H1d), 4.90-4.88, 4.77-4.31, 4.23-4.04, 3.98-3.81, 3.57-3.51, 3.41-3.36 (6m, 26H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ , H2-6<sup>HIV</sup>), 1.48-1.39 (m, 1H;  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.76 (dd, 1H,  $J_{\text{H,H}}$  7.4 Hz;  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ).

**Ejemplo 14: pg510 (Ejemplo de referencia)**

El poliol 46 [31] (22 mg, 61.7  $\mu\text{mol}$ ) se sulfonó de acuerdo con el procedimiento general para producir PG510 como un polvo incoloro (46 mg, 70%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.10 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz; H1<sup>II</sup>), 4.90 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.0 Hz; H1<sup>I</sup>), 4.78 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz; H2<sup>II</sup>), 4.73 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.1 Hz; H2<sup>I</sup>), 4.64-4.40 (m, 1H; H3<sup>II</sup>), 4.52 (dd, 1H,  $J_{3,4}$  9.5 Hz; H3<sup>I</sup>), 4.33-4.30 (m, 2H; H4<sup>II</sup>, 6a<sup>II</sup>), 4.22 (dd, 1H,  $J_{4,5}$  9.7 Hz; H4<sup>I</sup>), 4.12-4.04 (m, 2H; H5<sup>II</sup>, 6b<sup>II</sup>), 3.96-3.90 (m, 2H; H5<sup>I</sup>, 6a<sup>I</sup>), 3.76 (dd, 1H,  $J_{5,6b}$  8.6,  $J_{6a,6b}$  11.3 Hz; H6b<sup>I</sup>), 3.31 (s, 3H;  $\text{OCH}_3$ ).

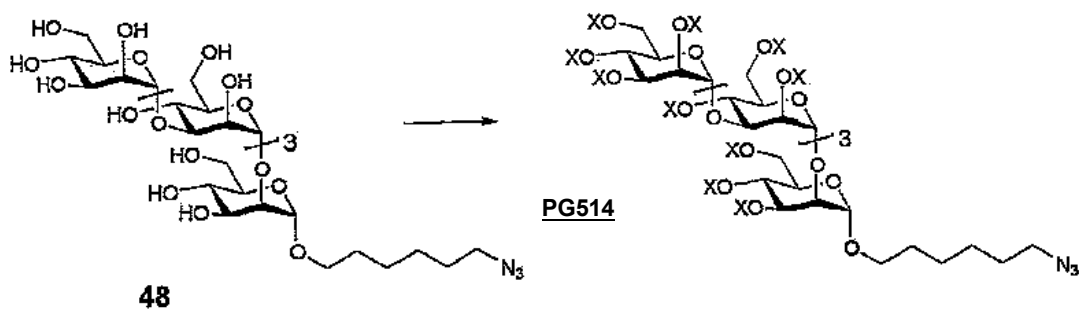
**Ejemplo 15: pg511 (Ejemplo de referencia)**

El poliol 47 [31] (20mg, 56  $\mu\text{mol}$ ), se sulfonó de acuerdo con el procedimiento general para producir PG511 como un polvo incoloro (29 mg, 48%). RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  5.36 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.2 Hz; H1<sup>II</sup>), 4.90 (br s, 1H; H2<sup>II</sup>), 4.87 (d, 1H,  $J_{1,2}$  2.1 Hz; H1<sup>I</sup>), 4.74 (dd, 1H,  $J_{2,3}$  3.0 Hz; H2<sup>I</sup>), 4.58-4.40, 4.29-4.10, 3.88-3.85 (3m, 10H, H3-6<sup>I,II</sup>), 3.30 (s, 3H;  $\text{OCH}_3$ ).

**Ejemplo 16: pg514 (Ejemplo de referencia)****AZIDA 18**

(A) Se le añadió eterato dietílico de trifluoruro de boro (257mg, 1.81 mmol) lentamente, a una solución del peracetato 12 (700 mg, 0.453 mmol) y 6-bromo-1-hexanol (492.7 mg, 2.721mmol) en DCE (20 mL, tamices moleculares de 3Å) y la mezcla se agitó bajo argón a 60° C durante 72 h. Se enfrió la solución, se neutralizó con Et<sub>3</sub>N, se diluyó con DCM (30mL), se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se sometió a cromatografía instantánea (sílice, gradiente de elución, 40:60 hasta 100:0 EtOAc:Hx) para dar 340 mg (0.204 mmol, 45.0%) de 6-bromohexilglicosida. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ: 5.25-5.08 (m, 8H), 4.98-4.81 (m, 8H), 4.25-3.70 (m, 19H), 3.607 (dt, 1H, J= 9.553, J= 6.635, OCH<sub>2</sub>A), 3.354 (dt, 1H, J= 9.641, J= 6.637, OCH<sub>2</sub>B), 3.33 (t, 2H, J= 6.700, CH<sub>2</sub>Br), 2.104, 2.096, 2.09, 2.06, 2.043, 2.038, 2.036, 2.033, 2.029, 2.02, 2.01, 1.97, 1.95, 1.94 y 1.90 (16x S, 48H, OAc), 1.85-1.74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.59-1.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.44-1.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.35-1.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ: 170.42, 170.41, 170.39, 170.28, 170.16, 170.07, 169.96, 169.94, 169.83, 169.77, 169.58, 169.52, 169.45, 169.36, 169.25 (19xCO), 99.10, 98.83, 98.75, 98.01 (azúcar-C1), 76.96, 75.00, 74.83, 74.75, 70.96, 70.82, 70.70, 70.08, 69.49, 69.28, 69.16, 68.24, 68.17, 68.04, 67.20, 66.65, 66.60, 66.09, 65.44, 62.41, 62.31, 61.86, y 61.54 (los carbonos de azúcar excluyen azúcar-C1 y bromohexil-CH<sub>2</sub>O), 33.49, 32.32, 29.43, 28.92, 27.59, 25.12 (6x bromohexil-CH<sub>2</sub>), 20.73, 20.71, 20.68, 20.62, 20.56, 20.47, 20.44, 20.41, (Ac-CH<sub>3</sub>), 13.85 (CH<sub>2</sub>Br).

(B) Una solución de 6-bromohexil glicosida de (A) (340 mg, 0.204 mmol) y azida de sodio (66 mg, 1.02 mmol) en DMF (4 mL) se calentó a 100° C durante 48 h. El análisis con TLC de la mezcla cruda no indicó cambios. Luego se le añadió yoduro de tetrabutilamonio (20 mg) y la mezcla se dejó reaccionar durante un tiempo adicional de 48 h. La mezcla cruda se enfrió y se sometió a cromatografía instantánea (0:100 hasta 5:95 DCM:MeOH) para dar 21.1mg (0.013 mmol, 6.4%) de azida 18.

**PG514** X = SO<sub>3</sub>Na o H

(A) Se desacetiló la azida 18 (21.1 mg, 0.013 mmol) bajo condiciones Zemplén estándar (2 mL de MeOH) para obtener 12.6 mg (0.013 mmol, 102%) de poliol 48.

(B) El poliol 48 (12.6 mg, 13.2  $\mu$ mol) se trató con SO<sub>3</sub>.trimetilamina de acuerdo con el procedimiento de sulfatación general para producir PG514 como un polvo incoloro (18.4 mg, 54%). RMN de <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 400 MHz): 5.40-4.69 (m, 8H), 4.68-3.41 (m, 27H), 3.22 t, 2H, *J* = 6.5), 1.51 (br, s, 5H, 1.29 (br, s, 5H).

#### **Prueba biológica de compuestos** **ensayos de fijación con factor de crecimiento**

Se midieron las afinidades de fijación de ligandos para los factores de crecimiento FGF-1, FGF-2 y VEGF usando un ensayo de afinidad de solución basado en resonancia del plasmón superficial (SPR). El principio del ensayo es que la heparina inmovilizada en la superficie con un chip sensor distingue entre factor de crecimiento libre y fijado en una solución equilibrada del factor de crecimiento y un ligando. Al inyectarse la solución, el factor de crecimiento libre se fija a la heparina inmovilizada, se detecta como un aumento en la respuesta a la SPR y se determina así su concentración. Una disminución en la concentración de factor de crecimiento libre como una función de la concentración de ligando permite el cálculo de la constante de disociación, *K<sub>d</sub>*. Es importante notar que la fijación de ligando a los factores de crecimiento solamente puede ser detectada cuando la interacción involucra el sitio de unión HS, eliminando así la oportunidad de evaluar la fijación no específica a otros sitios en la proteína. Se ha asumido una estequiometría 1:1 para todas las interacciones proteína:ligando.

Para la prueba de actividad de fijación con factor de crecimiento, se usaron chips sensores recubiertos con heparina. Su preparación, por medio de la inmovilización de BSA biotinilada-heparina en un chip sensor recubierto con estreptavidina, ha sido descrita [5]. La heparina también ha sido inmovilizada por medio de acoplamiento con aldehído usando ya sea dihidrazida de ácido adípico o 1,4-diaminobutano. Para cada medición de *K<sub>d</sub>*, se prepararon soluciones que contenían una concentración fija de proteína y concentraciones variables del ligando en el regulador. Los ligandos que se unieron a FGF-1 y a VEGF fueron medidos en regulador HBS-EP (10 mM de HEPES, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 3.0 mM de EDTA y 0.005% (v/v) de polisorbato 20), mientras que la unión a FGF-2 fue medida en regulador HBS-EP que contenía 0.3 M de NaCl [5]. Antes de la inyección, se mantuvieron las muestras a 4 °C para aumentar al máximo la estabilidad de la proteína. Para cada mezcla del ensayo, se inyectó 50-200  $\mu$ L de solución a 5-40  $\mu$ L/min y se midió la respuesta de fijación relativa. Todos los experimentos de fijación en superficie se realizaron a 25 °C. La superficie fue regenerada mediante inyección de 40  $\mu$ L de NaCl 4M a 40  $\mu$ L/min, seguida por inyección de 40  $\mu$ L de regulador a 40  $\mu$ L/min.

Los datos del sensorgrama fueron analizados usando el software BIAevaluation (BIAcore). Los sensorgramas anteriores fueron sustraídos de sensorgramas experimentales para producir curvas de fijación específicas y después se ajustaron las líneas de base a cero para todas las curvas. Las curvas estándar que relacionan el valor de respuesta relativo con la concentración de proteína inyectada son lineales, lo que indica que la respuesta de fijación es proporcional a la concentración de proteína, y por ello sugiere que los experimentos de fijación fueron realizados bajo condiciones de transporte de masa [34]. Por lo tanto, la respuesta de fijación relativa para cada inyección se puede convertir en concentración de proteína libre usando la ecuación

$$[P] = \frac{r}{r_m} [P]_{total}$$

en donde *r* es la respuesta de fijación relativa y *r<sub>m</sub>* es la respuesta de fijación máxima.

Se asumió que el equilibrio de fijación establecido en solución antes de la inyección era estequiometría 1:1. Por lo tanto, para el equilibrio,



en donde *P* corresponde a la proteína del factor de crecimiento, *L* es el ligando, y *P*•*L* es el complejo proteína:ligando, la ecuación del equilibrio es

$$K_d = \frac{[P][L]}{[P \cdot L]}$$

y la ecuación de fijación [5] se puede expresar como

$$[P] = [P]_{total} - \frac{(K_d + [L]_{total} + [P]_{total})}{2} + \sqrt{\frac{(K_d + [L]_{total} + [P]_{total})^2}{4} - [L]_{total} [P]_{total}}$$

Los valores de  $K_d$  dados son los valores ajustados, usando la ecuación de fijación, a un punto de  $[P]$  contra  $[L]_{total}$ . En donde los valores  $K_d$  se miden por duplicado, los valores representan el promedio de las mediciones duplicadas. Se ha demostrado que imitaciones de GAG que se unen estrechamente con esos factores de crecimiento, por ejemplo, PI-88, desencadenan una respuesta biológica in vivo. [5]

### **Ensayos de inhibición de heparanasa**

Se realizaron ensayos con heparanasa usando un ensayo de ultrafiltración Microcon. Los ensayos descansan sobre el principio de separar físicamente el heparán sulfato (HS) que ha sido digerido por la heparanasa de HS de origen natural para determinar la actividad heparanasa. El ensayo utiliza dispositivos de ultrafiltración (Microcon YM-10) para separar los fragmentos de HS escindidos por la heparanasa más pequeños de HS de origen natural.

Se preparó una reacción con un volumen de 90  $\mu$ L,  
40 mM de regulador acetato (pH 5.0)  
0.1 mg/mL de BSA  
90 ng de heparanasa  
2.5  $\mu$ M de HS marcada con  $^3$ H  
diversas concentraciones de inhibidores.

Las reacciones se establecieron con todos los componentes, excepto con la HS marcada con  $^3$ H y se dejaron equilibrar durante 10 min a 22 °C. Luego se iniciaron los ensayos añadiendo la HS e inmediatamente se tomó 20  $\mu$ L, se mezcló con 80  $\mu$ L de fosfato 10 mM (pH 7.0), y se transfirieron los 100  $\mu$ L a un concentrador Microcon YM-10, el cual luego se centrifugó aproximadamente a 14000 g durante 5 minutos. La solución que pasó a través de la membrana (filtrado) se retuvo. Esta muestra fue considerada la muestra de tiempo = 0. Los ensayos (ahora 70  $\mu$ L en volumen) se dejaron reaccionar a 22 °C durante 2.5 h y luego se repitió el paso de filtración en tres alícuotas de 20  $\mu$ L de cada ensayo.

El filtrado de tiempo 0 y las tres muestras de filtrado de 2.5 h se contaron por 3H. La diferencia entre las muestras de tiempo 0 y las muestras promediadas de 2.5 h dio la cantidad de actividad heparanasa. Todos los ensayos de inhibición se corrieron con un ensayo patrón de heparanasa, el cual fue idéntico para la composición del ensayo anterior, excepto que no estuvo presente ningún inhibidor y la cantidad de inhibición de heparanasa en los otros ensayos se determinó mediante comparación con este patrón. La IC50 para PI-88 en este ensayo es de 0.98  $\mu$ M.

### **Ensayos antivirales**

En el ensayo se usaron cultivos monocapa de células de riñón de mono verde africano [35] y virus de herpes simplex (HSV-1) cepa KOS321 [36]. Los ensayos antivirales en los compuestos fueron realizados tal como se fueron descritos por Nyberg y co-investigadores [13]. Brevemente, los efectos de los compuestos en la infección de las células por virus añadidos exógenamente fueron sometidos a prueba mezclando diluciones en serie del compuesto de cinco veces (a 0.032-20  $\mu$ M) con aproximadamente 200 unidades formadoras de placa del virus. Después de la incubación del virus y el compuesto durante 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla se le añadió a las células, y se dejó sobre la monocapa de células durante 2 horas a 37 °C. Después, se aspiró el inóculo y se reemplazó con un medio de revestimiento de solución de metilcelulosa al 1% en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM). Las placas virales que se desarrollaron después de la incubación de las células durante tres días a 37 °C, se tiñeron con solución de violeta cristal



al 1% y se contaron. Los efectos de los compuestos en la diseminación de célula a célula del HSV-1 fueron sometidos a prueba añadiendo diluciones en serie de cinco veces del compuesto (a 0.032-20  $\mu\text{M}$ ) en el medio de recubrimiento libre de suero a las células después de su infección con HSV-1. Después de la incubación del compuesto con las células durante 3 días a 37 °C, se capturaron las imágenes de 20 placas y se sometieron a determinación de área usando el software IM500 (Leica). Los resultados sobre la infección viral de las células y sobre la diseminación viral de célula a célula se muestran en la figura 1A y 1B, respectivamente, mientras que los valores de  $\text{IC}_{50}$  derivados se presentan en la Tabla 1.

### Resultados

Los resultados de las pruebas que se describen en la sección precedente, se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1**

| Com-<br>puesto | $K_d$ aFGF<br>(pM) | $K_d$ bFGF<br>(nM) | $K_d$ VEGF<br>(nM) | Inhibición de<br>heparanasa<br>( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$ ) | Infectividad<br>por HSV-1<br>( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$ ) | Diseminación<br>de célula a<br>célula de HSV-<br>1 ( $\text{IC}_{50}$ , $\mu\text{M}$ ) |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|---|---|
| PG500          | 120 $\pm$ 25       | 86 $\pm$ 7         | 1.72 $\pm$ 0.19    | 1.83 $\pm$ 0.483  | 2   | 1   |
| PG501          | 144 $\pm$ 8        | 68.3 $\pm$ 2.9     | 1.67 $\pm$ 0.11    | 1.64 $\pm$ 0.406  | 1   | 0.4   |
| PG502          | 660 $\pm$ 40       | 112 $\pm$ 9        | 7.1 $\pm$ 0.6      | 2.02 $\pm$ 0.284  | 7   | 5   |
| PG503          | 390 $\pm$ 70       | 84 $\pm$ 8         | 7.2 $\pm$ 0.6      | 1.85 $\pm$ 0.311  | 2   | 3   |
| PG504          | 361 $\pm$ 28       | 150 $\pm$ 9        | 8.1 $\pm$ 0.6      | 6.03 $\pm$ 1.05   | No<br>evaluado  | 11  |
| PG505          | 1960 $\pm$ 300     | 137 $\pm$ 12       | 4.8 $\pm$ 0.4      | 1.04 $\pm$ 0.147  | 3   | 6   |
| PG506          | 88 $\pm$ 17        | 114 $\pm$ 13       | 3.5 $\pm$ 0.8      | 2.12 $\pm$ 0.152  | 10  | 7   |

### Evaluación farmacocinética

#### preparación de compuestos marcados con [ $^{35}\text{S}$ ]

Los precursores de poliol para PG500, 501, 503, 504, 506 y PI-88 (2 mg cada uno) fueron disecados al vacío sobre  $\text{P}_2\text{O}_5$  durante 3 días. En cada frasco se inyectó 50  $\mu\text{L}$  de una solución madre de 1.77 mg (2.0 mCi) de complejo  $^{35}\text{SO}_3\cdot\text{piridina}$  y 2 mg de  $\text{SO}_3\cdot\text{Me}_3\text{N}$  en 300  $\mu\text{L}$  de DMF anhidro (Aldrich, resecado sobre tamices moleculares de 3A recién encendidos). Se añadió 600  $\mu\text{L}$  adicionales de DMF anhidro al frasco con  $\text{SO}_3$  y se distribuyó a cada frasco de muestra. Se calentaron las muestras hasta 60 °C durante 66 h. Se le añadió a cada recipiente  $\text{SO}_3\cdot\text{Me}_3\text{N}$  (14 mg en 300  $\mu\text{L}$  de DMF anhidro) y se calentaron las soluciones resultantes a 60 °C durante la noche. Se enfriaron los frascos a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C esperando la purificación.

Se extinguió la reacción en cada muestra mediante la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (acuoso saturado, ajustado a un pH de 8-9), se evaporó hasta secar y se sometió a SEC (Biogel P2, 2.6 x 90 cm, tasa de flujo 30 mL/h, 5 min/fracción). Se detectaron las fracciones que contenían el material deseado usando un contador G-M y prueba DMB seguida por CE.

Los resultados se resumen en la Tabla 2.

**Tabla 2: resumen de resultados de los experimentos con marcado radiactivo**

| 5  | Compuesto | Cantidad     | Pureza radio- | Actividad específica         |
|----|-----------|--------------|---------------|------------------------------|
|    |           | aislada (mg) | química       | ( $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ) |
| 10 | PI-88     | 2.8          | 99.0 %        | 38.01                        |
|    | PG500     | 2.1          | 98.7 %        | 29.19                        |
| 15 | PG501     | 1.7          | 98.0 %        | 6.56                         |
|    | PG503     | 1.0          | 99.2 %        | 5.49                         |
| 20 | PG504     | 5.0          | 98.3 %        | 6.47                         |
|    | PG506     | 3.6          | 99.0 %        | 26.23                        |

25

#### **Estudios farmacocinéticos**

Se usaron ratas macho Sprague Dawley (250-350 g). Se les permitió a los animales el libre acceso a comida y agua antes y durante los experimentos, durante los cuales fueron mantenidos sin restricciones en jaulas para metabolismo. Se anestesiaron las ratas con isoflurano (Forthane®). Se insertó un catéter en la vena yugular externa por medio de una incisión en el cuello, y se hizo pasar bajo la piel hasta una segunda incisión en la piel de la espalda (proximidad en la línea media de la escápula). Éste fue exteriorizado luego con la protección de un resorte de metal ligero. La incisión se cerró y el resorte se fijó a la piel con suturas Michel, de manera tal que las ratas tuvieran una amplitud de movimientos total. Los animales fueron vigilados cuidadosamente durante la recuperación (1 a 4 horas).

Se prepararon soluciones madre para dosificación mezclando cantidades apropiadas de fármaco no marcado y marcado radiactivamente (disuelto en solución salina fosfatada) para dar una concentración de fármaco total de 1.25 mg/mL. Todas las dosis se administraron como una inyección intravenosa en bolo de 2.5 mg/kg en un volumen de dosis de 2 mL/kg. La cantidad total de radiactividad administrada a cada rata fue de 0.5 a 10  $\mu\text{Ci}$ . El nivel de dosis usado en este estudio es 10 veces menor que la dosis sin efecto establecida previamente para la toxicidad aguda del PI-88. Se recolectaron muestras de sangre (~250  $\mu\text{L}$ ) antes de la dosis y 5, 15, 30, 45 minutos, y 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 24, 36 y 48 h después de la dosis. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente y se recolectó el plasma. Al terminar los experimentos, se sacrificaron los animales mediante una sobredosis letal de anestésico IV pentobarbitona (Nembutal®). Se recolectó la orina de cada animal a intervalos de 0-12 h, 12-24 h y 24-48 h después de la dosificación. También se recolectaron los lavados de la jaula (~15 mL de agua des-ionizada). Al final del experimento, se aspiraron los contenidos de la vejiga de cada animal y se añadieron a las micciones de 24-48 h. Se recolectaron las heces en los mismos intervalos de tiempo que en la orina.

Se transfirieron directamente alícuotas de plasma (100  $\mu\text{L}$ ), orina y lavados de jaula (500  $\mu\text{L}$ ) directamente a frascos de polipropileno de 6 mL para destello, para determinación de radiactividad. Las heces recolectadas durante cada periodo de tiempo (de un animal dosificado con cada compuesto) se pesaron y se homogenizaron en 4 volúmenes de agua des-ionizada usando una homogenizadora mecánica. Aproximadamente 1 g (pesado cuidadosamente) de esta suspensión, se transfirió a un frasco de vidrio de 20 mL para destello, se le añadió 2 mL de solubilizante de tejido y se taparon los frascos y se incubaron a 60 °C durante al menos 24 h. Se midió la radiactividad después de mezclar las muestras con coctel para conteo de destello líquido Packard Ultima Gold (2.0 mL para plasma y dosis, 5.0 mL para orina y lavados de jaula, 10 mL para heces). El conteo se realizó en un contador de destello líquido Packard Tr-Carb. Cualquier resultado

menor de tres veces el antecedente, fue considerado menor que el límite inferior de cuantificación no usado en los cálculos. El plasma, la orina y los lavados de jaula fueron contados por triplicado dentro de 5 días de recolección, y su disminución radioquímica no fue corregida. Las heces fueron procesadas como un lote al terminar el estudio y los conteos de estas muestras fueron corregidos en su disminución radioquímica. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos en plasma usando el software PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, Ohio) y se presentan en la Tabla 3.

**TABLA 3**

Parámetros farmacocinéticos determinados para los compuestos marcados con  $^{35}\text{S}$  tras la administración por vía intravenosa a ratas macho Sprague Dawley

|   | PI-88             | PG500             | PG501             | PG503                       | PG504             | PG506                      |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|
| n                                       | 4                 | 4                 | 4                 | 4                           | 4                 | 4                          |
| $C_0$<br>( $\mu\text{g-eq/mL}$ )        | 17.7 $\pm$ 2.23   | 20.5 $\pm$ 1.3    | 35.6 $\pm$ 3.1    | 14.0 $\pm$ 0.84             | 30.5 $\pm$ 2.3    | 17.1 $\pm$ 1.8             |
| $AUC_{0-12h}$ ( $\mu\text{g-eq/h.mL}$ ) | 9.6 $\pm$ 1.9     | 12.6 $\pm$ 1.2    | 29.7 $\pm$ 3.4    | 6.5 $\pm$ 0.4 <sup>b</sup>  | 14.7 $\pm$ 1.2    | 6.2 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup> |
| $t_{1/2}^*$ (h) <sup>c</sup>            | 0.83 $\pm$ 0.09   | 0.83 $\pm$ 0.02   | 1.10 $\pm$ 0.09   | 0.79 $\pm$ 0.03             | 2.81 $\pm$ 0.04   | 0.59 $\pm$ 0.01            |
| $k^*$ (h <sup>-1</sup> )                | 0.844 $\pm$ 0.096 | 0.836 $\pm$ 0.024 | 0.633 $\pm$ 0.053 | 0.879 $\pm$ 0.028           | 0.247 $\pm$ 0.003 | 1.17 $\pm$ 0.024           |
| $Cl^*$ (mL/h/kg)                        | 250 $\pm$ 27.6    | 199 $\pm$ 13.2    | 83.6 $\pm$ 9.1    | 380 $\pm$ 24.3 <sup>b</sup> | 172 $\pm$ 11.8    | 404 $\pm$ 59.5             |
| $Vd^*$ (mL)                             | 43.1 $\pm$ 1.9    | 38.4 $\pm$ 3.8    | 22.9 $\pm$ 2.2    | 55.1 $\pm$ 2.6              | 24.9 $\pm$ 2.9    | 44.5 $\pm$ 4.5             |
| Recuperación<br>urinaria (% dosis)      | 59.1 $\pm$ 13.1   | 39.3 $\pm$ 5.5    | 41.8 $\pm$ 1.5    | 80.5 $\pm$ 3.9              | 66.5 $\pm$ 9.4    | 79.1 $\pm$ 3.6             |

\* Valores evidentes

<sup>a</sup> Calculado durante el intervalo de 0-8 h después de la dosis solamente

<sup>b</sup> Calculado durante el intervalo de 0-4 h después de la dosis solamente

<sup>c</sup> Calculado durante el intervalo de 0.75-4.0 h después de la dosis para PI-88, PG500, PG501, PG503 y PG506; calculado durante el intervalo de 4.0-12 h después de la dosis para PG504.

Los resultados presentados en la Tabla 1 demuestran que la amplia gama de compuestos comprendidos por la invención posee actividad inhibidora de heparanasa y tiene fuerte afinidad para los factores de crecimiento fijadores de GAG y por ello pueden servir como moduladores de la actividad de estos factores en una forma similar al PI-88. Además, los compuestos tienen una actividad antiviral similar a PI-88. Los resultados presentados en la Tabla 3 ilustran que los compuestos tienen unas propiedades farmacocinéticas alteradas en comparación con PI-88.

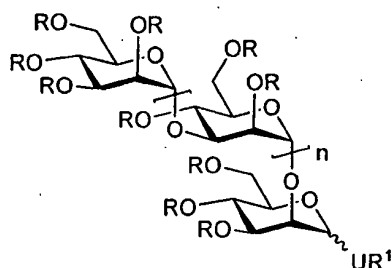
El término “comprenden” y variantes del término, tales como “comprende” o “comprendiendo” se usan aquí para referirse a la inclusión de un entero declarado o enteros declarados, pero no para excluir cualquier otro entero o cualesquiera otros enteros, a menos que en el contexto o en el uso se requiera una interpretación exclusiva del término.

**Referencias**

- [1] Parish, C.R.; Freeman, C.; Brown, K.J.; Francis, D.J.; Cowden, W.B. *Cancer Res.* **1999**, 59, 3433.
- [2] Parish, C.R.; Cowden, W.B. 6, 143, 730, **2000**.
- [3] Iversen, P.O.; Sorenson, D.R.; Benestad, H.B. *Leukemia* **2002**, 16, 376.
- [4] Ferro, V.; Don, R. *Australas. Biotechnol.* **2003**, 13, 38.
- [5] Cochran, S.; Li, C.; Fairweather, J.K.; Kett, W.C.; Coombe, D.R.; Ferro, V.J. *Med. Chem.* **2003**, 46, 4601.
- [6] Vlodavsky, I.; Friedmann, Y.J. *Clin. Inverst.* **2001**, 108, 341.
- [7] Parish, C.R.; Freeman, C.; Hulett, M.D. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1471, M99.
- [8] Wall, D.; Douglas, S.; Ferro, V.; Cowden, W.; Parish, C. *Thromb. Res.* **2001**, 103, 325.
- [9] Demir, M.; Iqbal, O.; Hoppensteadt, D.A.; Piccolo, P.; Ahmad, S.; Schultz, C.L.; Linhardt, R.J.; Fareed, J. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **2001**, 7, 131.
- [10] Hembrough, T.A.; Ruiz, J.F.; Papathanassiou, A.E.; Green, S.J.; Strickland, D.K.J. *Biol. Chem.* **2001**, 276, 12241.
- [11] Amirkhosravi, A.; Meyer, T.; Chang, J.Y.; Amaya, M.; Siddiqui, F.; Desai, H.; Francis, J.L. *Thromb. Haemost.* **2002**, 87, 930.
- [12] Francis, D.J.; Parish, C.R.; McGarry, M.; Santiago, F.S.; Lowe, H.C.; Brown, K.J.; Bingley, J.A.; Hayward, I.P.; Cowden, W.B.; Campbell, J.H.; Campbell, G.R.; Chesterman, C.N.; Khachigian, L.M. *Circ. Res.* **2003**, 92, e70.
- [13] Nyberg, K.; Ekblad, M.; Bergström, T.; Freeman, C.; Parish, C.R.; Ferro, V.; Trybala, E. *Antiviral Res.* **2004**, 63, 15.
- [14] Levidiotis, V.; Freeman, C.; Punler, M.; Martinello, P.; Creese, B.; Ferro, V.; van der Vlag, J.; Berden, J.H.M.; Parish, C.R.; Power, D.A.J. *Am. Soc. Nephrol.* **2004**, 15, 2882.
- [15] Ferro, V.; Li, C.; Ferwings, K.; Palermo, M.C.; Linhardt, R.J.; Toida, T. *Carbohydr. Res.* **2002**, 337, 139.
- [16] Yu, G.; Gunay, N.S.; Linhardt, R.J.; Toida, T.; Fareed, J.; Hoppensteadt, D.A.; Shadid, H.; Ferro, V.; Li, C.; Fewings, K.; Palermo, M.C.; Podger, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, 37, 783.
- [17] Ferro, V.; Fewings, K.; Palermo, M.C.; Li, C. *Carbohydr. Res.* **2001**, 332, 183.
- [18] Parolis, L.A.S.; Parolis, H.; Kenne, L.; Meldal, M.; Bock, K. *Carbohydr. Res.* **1998**, 309, 77.
- [19] Gunay, N.S.; Linhardt, R.J. *Planta Med.* **1999**, 65, 301.
- [20] Ferro, V.; Hammond, E.; Fairweather, J.K. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2004**, 4, 159.
- [21] Alban, S.; Franz, G. *Biomacromolecules* **2001**, 2, 354.
- [22] Foxall, C.; Wei, Z.; Schaefer, M.E.; Casabonne, M.; Fugedi, P.; Peto, C.; Castellot, J.J.; Jr; Brandley, B.K.J. *Cell. Physiol.* **1996**, 168, 657.
- [23] Fugedi, P.; Tyrrell, D.J.; Tressler, R.J.; Stack, R.J.; Ishihara, M. 5,739, 115, **1998**.
- [24] Katsuraya, K.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Uryu, T. *Carbohydr. Res.* **1999**, 315, 234.
- [25] Wessel, H.P. *Topics Curr. Chem.* **1997**, 187, 215.
- [26] Chen, L.; Kong, F. *J. Carbohydr. Chem.* **2002**, 21, 341.
- [27] Mori, M.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Carbohydr. Res.* **1989**, 192, 131.
- [28] Kerekgyarto, J.; Karmeling, J.P.; Bouwstra, J.B.; Vliegthart, J.F.; Liptak, A. *Carbohydr. Res.* **1989**, 186, 51.
- [29] Jacobsen, S. *Acta Chem. Scand. Ser. B, Org. Chem. Biochem.* **1984**, B38, 157.
- [30] Ogawa, T.; Sasajima. *Carbohydr. Res.* **1981**, 93, 53.
- [31] Ogawa, T.; Sasajima. *Carbohydr. Res.* **1981**, 97, 205.
- [32] Garegg, P.J.; Olsson, L.; Oscarson, S. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 1867.
- [33] Fairweather, J.K.; Karoli, T.; Ferro, V. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 6063.
- [34] Karlsson, R.; Roos, H.; Fägerstam, L.; Persson, B. *Methods* **1994**, 6, 99.
- [35] Gunalp, A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1965**, 118, 185.
- [36] Holland, T.C.; Homa, F.L.; Marlin, S.D.; Levine, M.; Glorioso, J.J. *Viol.* **1984**, 52, 566.

## REVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula general

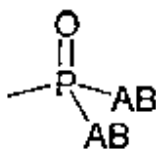


en donde:

n es un entero que tiene un valor de 0 a 6;

U es C, N, S o es O, o sus estados de oxidación superior, incluyendo CO, COO, NO, NO<sub>2</sub>, S(O), S(O)O;

cada R independientemente es SO<sub>3</sub>M o H, en donde M es cualquier catión aceptable para uso farmacéutico o es cualquiera de alquilo, arilo, acilo, aroilo, alquil sulfonilo, aril sulfonilo, PEG, un derivado de PEG, H o el grupo



en donde independientemente en cada grupo AB, A es O o NH, y B es H, o M, en donde M es como se definió anteriormente, o un grupo alquilo, arilo o cualquier otro grupo apropiado;

R<sup>1</sup> es alquilo, arilo, acilo, aroilo, alquil sulfonilo, aril sulfonilo, PEG o un derivado de PEG, o R<sup>1</sup> junto con U es N<sub>3</sub> o un triazol sustituido, o un tetrazol sustituido, o un arilo sustituido, o un heteroarilo sustituido;

con la condición de que:

al menos 50% de los grupos R sea SO<sub>3</sub>M.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde M es sodio.

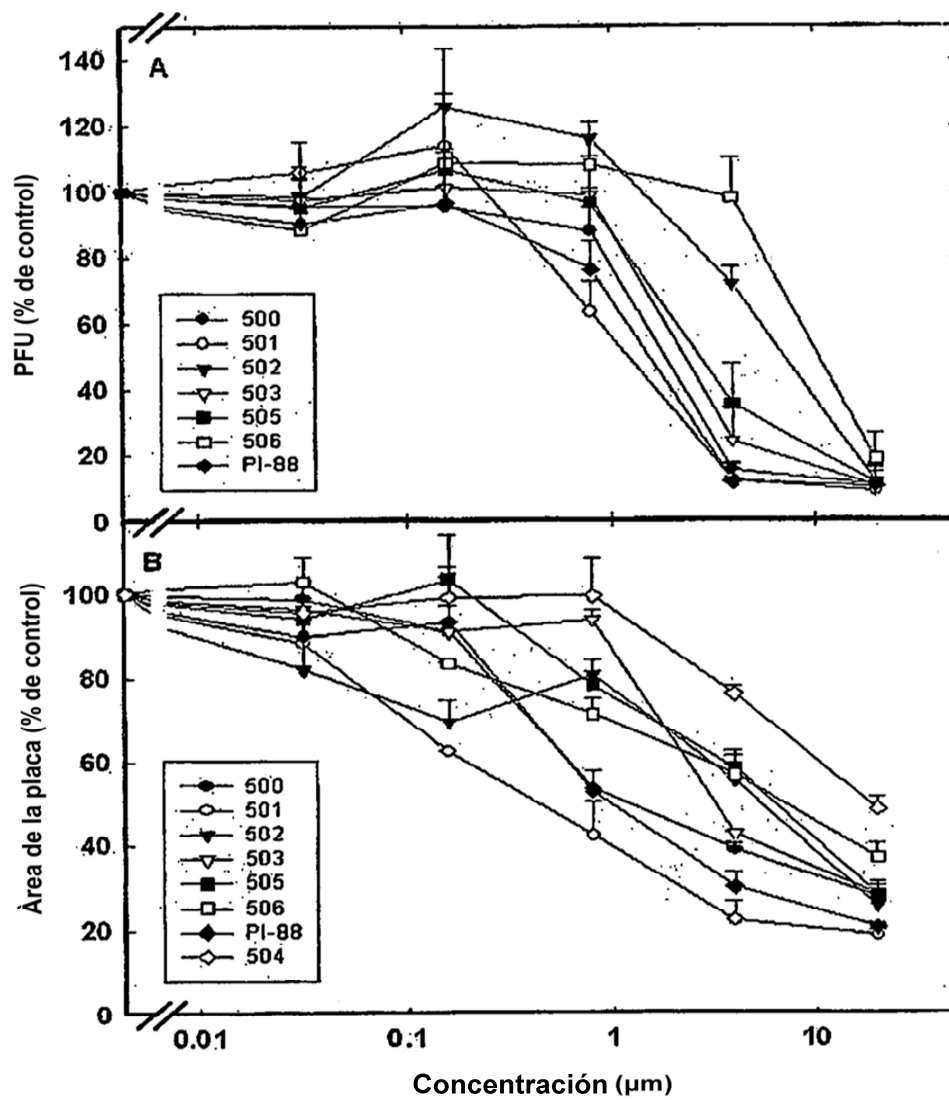
3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde n es 3.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R<sup>1</sup> es n-octilo.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en donde de 70 a 100% de los grupos R contienen SO<sub>3</sub>M.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto es **PG500**: bencil-2,3,4,6-tetra-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosida, sal de hexadecasodio; **PG501**: octil-2,3,4,6-tetra-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 2)-3,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosida, sal de hexadecasodio; **PG502**: 2,3,4,6-tetra-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-mannopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 3)-(2,4,6-tri-O-sulfono- $\alpha$ -D-

- mannopiranosil)-(1→2)-*N*-(2-fenoxiacetil)-3,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosilamina, sal de hexadecasodio; **PG503**: 2,3,4,6-tetra-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil)-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil)-(1→2)-*N*-(6-(5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahidro-1*H*-  
5 **PG504**: 2,3,4,6-tetra-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil)-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil)-(1→2)-1-(metoxipoli(etilenglicol)<sub>5000</sub>)-3,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosida, sal de hexadecasodio; o **PG506**: 2,3,4,6-tetra-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil)-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil-(1→3)-(2,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosil)-(1→2)-1-(metoxipoli(etilenglicol)<sub>2000</sub>)-3,4,6-tri-*O*-sulfono-α-D-mannopiranosida, sal de hexadecasodio.
- 10 7. Una composición para uso farmacéutico o veterinario, para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero, de un trastorno resultante de angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos elevados en sangre, infección por el virus del herpes simplex (HSV-1) y/o enfermedad cardiovascular, cuya composición contiene al menos un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
- 15 junto con un portador o diluyente aceptable para uso farmacéutico o veterinario para dicho al menos un compuesto.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, que incluye además un excipiente, regulador, estabilizador, agente isotonzante, conservador o antioxidante, aceptable para uso farmacéutico o veterinario.
- 20 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicho compuesto está presente en ella como un éster, un ácido o base libre o un hidrato.
10. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero, de un trastorno resultante de angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos elevados en la sangre, infección con HSV-1 y/o enfermedad cardiovascular.
- 25 11. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.
12. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho trastorno resultante de angiogénesis es una retinopatía proliferativa o angiogénesis resultante del crecimiento de un tumor sólido.
- 30 13. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho trastorno resultante de inflamación es artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, rechazo de aloinjerto o asma crónica.
- 35 14. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho trastorno resultante de coagulación y/o trombosis es trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, derrame trombótico, trombosis arterial periférica, angina inestable o infarto al miocardio.



*Fig. 1*