

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 927**

51 Int. Cl.:

C07H 11/00	(2006.01) C07H 3/04	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01) C07J 9/00	(2006.01)
C07H 15/04	(2006.01) A61P 9/00	(2006.01)
A61K 31/7016	(2006.01) C07H 3/06	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
C07H 15/24	(2006.01) C07H 5/04	(2006.01)
A61K 31/702	(2006.01)	
A61P 35/04	(2006.01)	
C07H 17/02	(2006.01)	
A61P 7/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08839676 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2205616**

54 Título: **Derivados de oligosacáridos sulfatados novedosos**

30 Prioridad:

16.10.2007 AU 2007905680

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

30.09.2016

73 Titular/es:

**PROGEN PG500 SERIES PTY LTD. (100.0%)
Level 18 101 Collins Street
Melbourne, VIC 3000, AU**

72 Inventor/es:

**FERRO, VITO;
KAROLI, TOMISLAV;
LIU, LIGONG;
HANDLEY, PAUL NEWTON;
JOHNSTONE, KENNETH DAVID;
WIMMER, NORBERT y
HAMMOND, EDWARD TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 584 927 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 novedosos

5 Campo de la Invención

La presente invención descrita aquí mismo se relaciona con compuestos que tienen una actividad como inhibidores de proteínas de unión al sulfato de heparano, incluyendo la enzima heparanasa. En particular, la presente invención está dirigida a los derivados de oligosacáridos sulfatados, aunque el alcance de la presente invención no se limita necesariamente a los mismos. Específicamente, la presente invención se relaciona con oligosacáridos polisulfatados modificados con grupos específicos altamente lipofílicos. La presente invención también se relaciona con métodos para la preparación de los compuestos, composiciones que comprenden los compuestos, y los compuestos y composiciones de los mismos para el tratamiento antiangiogénico, antimetástasico, antiinflamatorio, antimicrobiano, anticoagulante y/o antitrombótico de un sujeto mamífero. De manera adicional, los compuestos tienen una utilidad de prevención de los trastornos anteriores cuando son administrados a un sujeto mamífero.

Antecedentes de la Invención

El agente oligosacárido sulfatado conocido como PI-881,2 es un inhibidor prometedor del crecimiento tumoral y metástasis^{3,4,1} y ha pasado por ensayos clínicos en pacientes con cáncer^{5,6}. PI-88 es una mezcla de oligosacáridos de manosa monofosforilados altamente sulfatados que se encuentran en un rango de tamaño de di- a hexasacárido^{7,8}. PI-88 ejerce efectos angiogénicos inhibiendo las interacciones de factores de crecimiento angiogénicos (principalmente FGF-1, FGF-2 y VEGF) y sus receptores con sulfato de heparano^{9,1}. Además, PI-88 es un inhibidor potente de la enzima heparanasa, una glucosidasa que escinde cadenas laterales de sulfato de heparano de proteoglicanos que son un constituyente principal de la matriz extracelular (ECM) y membranas basales que rodean las células tumorales^{1,2}. La heparanasa ha estado fuertemente implicada en la angiogénesis: es capaz de liberar factores de crecimiento angiogénicos enlazados a sulfato de heparano activos de la ECM y está implicada en la degradación de la ECM y remodelación de tejido subsecuente asociado con la formación de nuevos vasos sanguíneos¹⁰. La degradación de la ECM por la heparanasa también es crucial en el esparcimiento de células tumorales (metástasis) permitiéndoles pasar al torrente sanguíneo y colocarse en sitios remotos en donde pueden formar tumores secundarios^{11,10}.

Además de sus efectos angiogénicos, PI-88 inhibe la cascada de coagulación de la sangre (i) inhibiendo las proteasas en la vía intrínseca, (ii) estimulando la liberación del inhibidor de la vía del factor tisular (TPFI), y (iii) activando la inhibición mediada por el cofactor de heparina II de trombina. Sin embargo, PI-88 no interactúa con AT III y por lo tanto no muestra una actividad anti-Xa o anti-IIa mediada por AT-III^{12,13}. Los estudios *in vivo* en monos han mostrado que las dosis bajas de PI-88 estimulan la liberación de todo el sulfato de heparano enlazado a TPFI de la pared de la célula vascular¹². Aparte de su efecto en la coagulación, la TPFI también es un agente antiangiogénico¹⁴ y un inhibidor de la metástasis¹⁵. PI-88 también ha demostrado bloquear la proliferación de las células del músculo liso vascular y el engrosamiento intimal¹⁶, para inhibir la infección por el virus del herpes simple (HSV) de células y el esparcimiento de célula a célula de HSV-1 y HSV-2¹⁷, para inhibir la inefectividad y mejorar la supervivencia de modelos de muridos del dengue y flavivirus encefalíticos¹⁸, para inhibir la proteinuria en nefritis de Heymann pasiva¹⁹ y para mostrar una actividad antimalárica *in vitro* contra el *Plasmodium falciparum*²⁰.

Varios otros polisacáridos y oligosacáridos polisulfatados y sus derivados son bien conocidos por exhibir tipos similares de actividades biológicas a PI-88²¹⁻²⁶. Estas actividades biológicas son atribuidas a la inhibición de varias proteínas de unión al sulfato de heparano (HS.). Recientemente, se divulgaron algunos derivados de oligosacáridos sulfatados con perfiles farmacocinéticos y/o ADME (absorción, distribución, metabolismo, excreción) mejorados²⁷⁻²⁸. Los compuestos comprendieron un solo esqueleto de carbono y, por lo tanto, también proporcionan ventajas de síntesis y caracterización sobre mezclas tales como PI-88.

El objeto de la presente invención es la creación de miméticos de HS con una potencia aún mayor, propiedades farmacocinéticas mejoradas y un perfil de efectos secundarios reducido.

Compendio de la Invención

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



60 en donde:

X e Y son cada uno una unidad de monosacárido en donde cada grupo hidroxilo no comprendido en un enlace glucosídico está independientemente sustituido por un grupo SO₃M o H, en donde M es cualquier catión farmacéuticamente aceptable;

65 X e Y son cualquiera de D- o L-hexosa o pentosa;

Y está en una forma abierta de anillo o cíclica;

Z es O, S, un estado de oxidación más elevado de S, o un enlace, y está enlazado al carbono anomérico cuando Y es un monosacárido de reducción;

5

R¹ es un conector seleccionado del grupo que incluye alquileo, alquenileno, alquinileno, arileno, heteroalquileo, heteroarileno, acileno, aroileno, alquilenamido, alquilentioamido, triazolileno, un conector oximetil[1,2,3]-triazol-1-ilo o es un enlace;

10

R² es un resto lipofílico seleccionado del grupo que incluye colestano, colato, desoxicolato, propilestearamida;

n es un número entero de 0-6;

15

el nivel de sulfatación de cada compuesto es de entre 70 y 100% de los grupos hidroxilo totales, en donde cuando X e Y son ribosa, y R¹ es un enlace, entonces R² no es un grupo C18.

20

De acuerdo con una segunda realización de la presente invención, se proporciona una composición veterinaria o farmacéutica para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de un melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno que resulta del crecimiento tumoral, la angiogénesis, tal como la proliferación o migración de células endoteliales, la propagación de células tumorales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovasuclar, cuya composición comprende por lo menos un compuesto de acuerdo con la primera realización junto con un diluyente o portador veterinaria o farmacéuticamente aceptable para dicho al menos un compuesto.

25

La tercera realización de la presente invención comprende el uso de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de un melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno que resulta del crecimiento tumoral, la angiogénesis, tal como la proliferación o migración de células endoteliales, la propagación de células tumorales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.

30

De acuerdo con una cuarta realización de la presente invención, se proporciona un compuesto de Fórmula I para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de un melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno que resulta de la angiogénesis, tal como la proliferación o migración de células endoteliales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.

35

Para que la presente invención pueda ser entendida más fácilmente y puesta en práctica, una o más realizaciones preferidas de la misma serán descritas a continuación, a modo de ejemplo solo, haciendo referencia a las figuras adjuntas.

40

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra ejemplos del grado de formación de brotes angiogénicos en el análisis de angiogénesis aórtico de rata utilizado para demostrar la actividad angiogénica de los compuestos.

45

La figura 2 muestra los datos para cultivos aórticos tratados con medio (para un grupo de control no tratado) o compuestos de análisis cada 48 días desde el día 0 durante 7 días. En séptimo día, se agregó VEGF (10 mg/mL) a los cultivos cada 2-3 días durante 7 días adicionales y la cantidad de angiogénesis fue posteriormente evaluada, por lo tanto, se demostró que los compuestos ejercen sus efectos inhibitorios a través de un mecanismo antiangiogénico en lugar de mediante la inducción de un efecto tóxico en el tejido. Los tres compuestos inhibieron la angiogénesis de manera potente (ver Tabla 4).

50

La figura 3 muestra la mediana de los volúmenes de tumor de ratones de control no tratados y de ratones tratados con compuestos de análisis seleccionados en el modelo de melanoma de ratón B16. A pesar de la reducción de los niveles de dosis para los compuestos de la presente invención, o duración limitada de la exposición, la actividad antitumoral se vio incrementada de todas formas en comparación con PI-88 o análogos nolipofílicos. Bid = *bis in die* (dos veces al día), sid = *semel in die* (una vez al día), qd = *quaque die* (cada día).

55

La figura 4 muestra los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) de ratones que tienen tumores tratados con compuestos de análisis seleccionados en el modelo de melanoma de ratón B16. A pesar de la reducción de los niveles de dosis para los compuestos de la presente invención, los valores %TGI se vieron aun así mejorados en comparación con PI-88 o análogos nolipofílicos. Bid = *dis in die* (dos veces al día), sid = *semel in die* (una vez al día).

60

La figura 5 muestra ejemplos de compuestos de análisis que bloquean la formación de colonias de pulmonares de las células de melanoma B16F1 en ratones. Los compuestos y dosis administrados son descritos debajo de cada imagen.

65

La figura 6 muestra el número de nódulos metastásicos de pulmón como un porcentaje comparado con el control salino con compuestos de análisis seleccionados en el modelo de metástasis de pulmón B16. Los ratones tratados con PI-88 y los compuestos seleccionados mostraron menos nódulos metastásicos de pulmón en comparación con el control salino. A pesar de la reducción de los niveles de dosificación en la mayoría de los casos para los compuestos de la presente invención, la inhibición de la metástasis aun así fue similar a las observadas con las dosificaciones más elevadas de PI-88. Bid = *bis in die* (dos veces al día), sid = *semel in die* (una vez al día).

La figura 7 muestra los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (%TGI) de ratones que tienen tumores tratados con los compuestos de análisis seleccionados en el modelo de xenoinjerto HT29 de cáncer colorrectal. A pesar de la reducción de los niveles de dosis para los compuestos de la presente invención, los valores %TGI se vieron aun así mejorados en comparación con PI-88 o análogos nolipofílicos. Bid = *bis in die* (dos veces al día), sid = *semel in die* (una vez al día).

La figura 8 muestra el efecto de compuestos de análisis en la transmisión de célula a célula de HSV. Las células fueron infectadas con ~200 PFU de ya sea HSV-1 o HSV-2, y posteriormente revestidas con EMEM suplementado con 1% de metilcelulosa y 10 µg/ml del compuesto de análisis. Los resultados son expresados como un porcentaje del área promedio de placas virales desarrolladas en células tratadas con fármaco relativas a controles con un tratamiento simulado. Las imágenes de veinte placas virales fueron capturadas y sometidas a determinaciones de área utilizando el software IM500.

La figura 9 muestra el efecto de los compuestos de análisis de la unión de viriones de HSV a células. Los compuestos de análisis a concentraciones específicas fueron incubados a una temperatura de 4°C con HSV-1 o HSV-2 marcado con metil-³H]timidina durante un periodo de 2 horas de absorción de virus a células GMK AH1. Los resultados son expresados como un porcentaje de cpm viral adherido que se halla en los viriones tratados con compuesto en relación con controles con un tratamiento simulado. Los experimentos con el compuesto 4, el número medio de cpm adherido de virus con un tratamiento simulado que se adhirió a las células a 4°C fue 4263 para HSV-1 y 1742 para HSV-2. Los valores mostrados son las medias de cuatro determinaciones de dos experimentos separados.

Las figuras de la 10 a la 40 muestran los esquemas de reacción y estructuras químicas de la presente invención.

Descripción Detallada de Realizaciones Preferidas

Los derivados de oligosacárido sulfatado descritos en WO 2005/085264 son buenos inhibidores de la angiogénesis y otros procesos mediados por proteínas de unión a HS. Tales compuestos tienen utilidad en la prevención o tratamiento en sujetos mamíferos de un trastorno que resulta de la angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación, trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular. Esta utilidad resulta de la habilidad de los compuestos para inhibir la actividad de proteínas de unión a HS tales como los factores de crecimiento FGF-2 y VEGF, y la enzima heparanasa. Los inventores han encontrado que si los oligosacáridos sulfatados son modificados con grupos altamente lipofílicos, por ejemplo, colestanol o ácido esteárico, dichos grupos estando adheridos a un carbohidrato directamente o a través de un conector, entonces los nuevos compuestos generados tienen una potencia incrementada significativamente como agentes antiangiogénicos y han mejorado sus propiedades farmacocinéticas. Esto es demostrado por su actividad en varios análisis de angiogénesis *in vitro* y *ex vivo* tal como la proliferación de células endoteliales inducida por el factor de crecimiento y análisis de migración, el análisis de formación de tubo endotelial en MatrigelTM y el análisis de aorta de rata. La potencia incrementada también es manifestada en modelos animales de crecimiento tumoral. Cabe destacar el hecho de que los sacáridos sulfatados más pequeños (por ejemplo, mono- a trisacáridos), los cuales generalmente son inactivos o tienen solo una actividad antiangiogénica leve (u otra actividad parecida a HS) comparada con homólogos más grandes, una vez modificados tienen una actividad incrementada significativamente similar o mejor que sus cogéneres más grandes pero no modificados.

Algunos de los compuestos también muestran una potencia incrementada como agentes antivirales. Por ejemplo, la modificación lipofílica resultó en una capacidad aumentada para inhibir la infección de células y la transmisión de célula a célula del virus del herpes simple (HSV), virus sincitial respiratorio (RSV), o VIH. Además, las modificaciones proporcionaron algunos compuestos con la capacidad de inactivar de manera completa las partículas de virus, por lo tanto, haciéndolos antivirales más potentes que los oligosacáridos sulfatados no modificados (tales como PI-88) los cuales pueden inhibir los pasos de unión/entrada del virus sin inactivar los viriones.

Uno de los efectos secundarios de los oligosacáridos sulfatados no modificados es una actividad anticoagulante. Las modificaciones lipofílicas descritas en la presente invención resultan en compuestos nuevos con una actividad anticoagulante reducida comparada con PI-88, la cual puede resultar en márgenes terapéuticos más amplios. El hematoma en el sitio de inyección comúnmente visto en animales tratados con PI-88 también es eliminado, por lo tanto, se mejora potencialmente el cumplimiento del paciente.

Los derivados de oligosacáridos sulfatados descritos en esta especificación también pueden ser sintetizados utilizando un número de estrategias diferentes tal y como se ha descrito ampliamente más adelante y tal y como se ha ilustrado en los ejemplos.

- 5 Con respecto a los compuestos de la Fórmula I, las unidades de monosacárido X e Y pueden ser, por ejemplo, cualquier hexosa o pentosa y pueden ser isómeros ya sea D o L. Tales hexosas incluyen glucosa, manosa, altrosa, alosa, talosa, galactosa, idosa o gulosa. Tales pentosas incluyen ribosa, arabinosa, xilosa y lixosa. Los conectores glucosídicos de las unidades de monosacárido pueden ser exclusivamente de un tipo de tipos diferentes en términos de configuración y conexión.
- 10 El catión farmacéuticamente aceptable M puede ser cualquier catión de este tipo, pero es preferentemente sodio. Con respecto al número entero n, n es un número entero de 0-6, preferentemente 2, 3 o 4, para proporcionar un compuesto el cual es un tri-, tetra- o pentasacárido.
- 15 El grupo R² puede ser cualquier resto lipofílico, tal como se define en la reivindicación 1, pero es preferentemente estereamida de propilo o colestano.
- La configuración anomérica, en donde sea aplicable, en ZR¹ de los compuestos de la fórmula I pueden ser ya sea α o β o una mezcla anomérica α/β .
- 20 Con respecto a los sustituyentes dados anteriormente en la definición de compuestos de la Fórmula I, el término "alquilo", cuando es utilizado solo o en palabras compuestas tales como "arilalquilo" se refiere a un grupo de cadena lineal, ramificada o hidrocarburo cíclico.
- El término "arilo", cuando es utilizado solo o en palabras compuestas tales como "arilalquilo", denota residuos simples, polinucleares, conjugados o fusionados de hidrocarburos aromáticos. Un grupo arilo puede ser sustituido de manera opcional por uno o más sustituyentes opcionales.
- 25 El término "acilo" se refiere a un grupo -C(O)-R en donde R es un grupo alquilo o arilo. Ya que el grupo R puede ser sustituido de manera opcional tal y como se describió anteriormente, "acilo" es usado para referirse a un acilo sustituido de manera opcional.
- 30 Los sustituyentes opcionales para alquilo, arilo o acilo incluyen halo (bromo, fluoro, cloro, yodo), hidroxilo, C₁₋₆alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, propilo (n- e i-isómeros)), C₁₋₆alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi, propoxi (n- e i-isómeros), butoxi (n-, sec- y t-isómeros), nitro, amino, C₁₋₆alquilamino (por ejemplo metilamino, etilamino, propil (n- e i- isómeros)amino), C₁₋₆dialquilamino (por ejemplo, dimetilamino, dietilamino, diisopropilamino), halometilo (por ejemplo, trifluorometilo, tribromometilo, triclorometilo), halometoxi (por ejemplo trifluorometoxi, tribromometoxi, triclorometoxi) y acetilo.
- 35 El grado de sulfatación de los compuestos de acuerdo con la presente invención es típicamente de por lo menos 70%. Es decir, por lo menos el 70% de los grupos hidroxilo de un derivado de oligosacárido no comprendido en un enlace glucosídico son substituidos por SO₃M. El grado de sulfatación es típicamente de 70 a 100% y preferentemente es por lo menos tan elevado como 90%.
- 40 Los compuestos de la Fórmula I pueden hacerse a través de una ruta sintética en pasos a partir de unidades estructurales de tipo carbohidrato o comenzando con un oligosacárido de la longitud apropiada y haciendo las modificaciones deseadas. Los monosacáridos de la fórmula I pueden hacerse directamente del material de partida del monosacárido. Las modificaciones lipofílicas pueden ser introducidas al sacárido por un número de métodos diferentes, como será aparente para aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, los grupos lipofílicos pueden ser introducidos en la posición anomérica del extremo reductor del azúcar a través de un enlace glucosídico O-, N-, S- o C- y dicho grupo puede estar directamente enlazado con la posición anomérica o puede estar adherido a través de un conector. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que existen varios tipos de conectores adecuados.
- 45 Cabe destacar que todos los derivados hechos tal y como se describió anteriormente son posteriormente sometidos a una desprotección (típicamente, desacetilación con NaOMe) y el poliol sulfonado resultante con un reactivo de sulfonación tal como un complejo de trióxido de azufre y piridina o un complejo de trióxido de azufre y trimetilamina.
- 50 Tal y como se indica anteriormente, los compuestos de acuerdo con la presente invención tienen utilidad en la prevención o tratamiento en sujetos mamíferos de un trastorno resultante de la angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación, trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana o enfermedad cardiovascular. Los compuestos tienen una utilidad particular en el tratamiento de los desórdenes en humanos. Los compuestos tienen una utilidad particular en el tratamiento de los desórdenes anteriores en humanos. Los compuestos son típicamente administrados como un componente de una composición farmacéutica tal y como se describe en los siguientes párrafos.
- 55 Las composiciones farmacéuticas para una administración oral pueden ser en forma de un comprimido, cápsula, polvo o líquida. Un comprimido puede incluir un portador sólido tal como una gelatina o un adyuvante o un diluyente inerte. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites vegetales o animales, un aceite mineral o un aceite sintético. Solución salina fisiológica, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol pueden ser incluidos. Tales composiciones y preparaciones generalmente contendrán por lo menos 0.1% del compuesto.
- 60
- 65

- La administración parenteral incluye la administración por las siguientes vías: intravenosamente, cutáneamente o subcutáneamente, nasalmente, intramuscularmente, intraocularmente, transeptelialmente, intraperitonealmente y tópicamente. La administración tópica incluye una administración dérmica, ocular, rectal, nasal así como una administración por inhalación o por medio de un aerosol. Para una inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o una inyección en el sitio en donde el tratamiento es deseado, el principio activo estará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable la cual está libre de pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la técnica serán capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, soluciones de los compuestos en cuestión o derivados de estos.
- Además del por lo menos un compuesto y un diluyente o portador, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden incluir de manera adicional un excipiente, amortiguador, estabilizador, agente de isotonización, conservante o antioxidante o cualquier otro material conocido por aquellos expertos en la técnica veterinaria o farmacéuticamente aceptables. Podrá ser apreciado por un experto en la técnica que tales materiales deberán ser no tóxicos y no deberán interferir con la eficacia del/de los compuesto(s). La naturaleza precisa de cualquier aditivo puede depender de la vía de administración de la composición, es decir, si la composición es para ser administrada oralmente o parenteralmente. Con respecto a los amortiguadores, las composiciones acuosas típicamente incluyen tales sustancias de modo de mantener la composición a un pH cercano al fisiológico o al menos dentro de un rango de aproximadamente un pH 5.0 a 8.0.
- Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden incluir principios activos además del por lo menos un compuesto. Tales principios serán escogidos principalmente por su eficacia como agentes antiangiogénicos, antimetastásicos, antiinflamatorios, anticoagulantes, antimicrobianos y antitrombóticos, y agentes efectivos contra los niveles de triglicéridos en sangre elevados y enfermedad cardiovascular, pero pueden ser escogidos por su eficacia contra cualquier afección asociada.
- Una composición veterinaria o farmacéutica de acuerdo con la presente invención será administrada a un sujeto en ya sea una cantidad efectiva profilácticamente o efectiva terapéuticamente como sea necesario para la situación particular bajo consideración. La cantidad real de por lo menos un compuesto administrado mediante una composición, y la tasa y tiempo de administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de la afección tratada o la profilaxis requerida. La prescripción de tratamiento tales como decisiones o dosificación y similares estarán dentro de la habilidad del médico o veterinario responsable del cuidado del sujeto. Sin embargo, típicamente, las composiciones para la administración a un sujeto humano incluirán de entre aproximadamente 0.01 y 100 mg del compuesto por kg de peso corporal y más preferentemente entre aproximadamente 0.1 y 10 mg/kg de peso corporal.
- Los compuestos pueden ser incluidos en composiciones como derivados aceptables en veterinaria o farmacéuticamente de los mismos. Tal y como se utiliza en la presente invención "derivados" de los compuestos incluye sales, complejos de coordinación con iones de metal tales como Mn^{2+} y Zn^{2+} , ésteres tales como ésteres hidrolizables *in vivo*, ácidos libres o bases, hidratos y profármacos. Los compuestos que tienen grupos acídicos tales como fosfatos o sulfatos pueden formar sales con metales alcalinos o alcalinotérreos tales como Na, K, Mg y Ca, y con aminas orgánicas tales como trietilamina y Tris (2-hidroxietil) amina. También pueden formarse 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 benzóico, ácido fumárico, o ácido tartárico. Los compuestos que tienen tanto grupos básicos como acídicos pueden formar sales internas.
- Los ésteres pueden formarse entre grupos de ácido carboxílico o hidroxilo en el compuesto y un ácido carboxílico o un alcohol apropiados como el otro componente de la reacción, utilizando técnicas que serán bien conocidas para aquellos expertos en la técnica.
- Los derivados de profármaco de los compuestos de la presente invención pueden ser transformados *in vivo* o *in vitro* en los compuestos originales. Típicamente, por lo menos una de las actividades biológicas de un compuesto original puede ser eliminada en la forma de profármaco del compuesto, y puede ser activada por una conversión del profármaco al compuesto original o un metabolito del mismo. Los profármacos de los compuestos de la presente invención incluyen el uso de grupos de protección los cuales pueden ser removidos *in vivo* para liberar el compuesto activo o servir para inhibir la eliminación del fármaco. Los grupos de protección adecuados serán conocidos por aquellos expertos en la técnica.
- También como se indicó anteriormente, los compuestos de acuerdo con la presente invención tienen utilidad en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de un trastorno que resulta de la angiogénesis, metástasis, inflamación, coagulación/trombosis, infección microbiana, niveles de triglicéridos en sangre elevados, y/o enfermedad cardiovascular. Los procesos para la fabricación de tales medicamentos serán conocidos por aquellos expertos en la técnica e incluyen los procesos utilizados para fabricar las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.
- Ahora se brindará una descripción general de las vías sintéticas para obtener los compuestos de acuerdo con la presente invención.

Procedimientos Generales

Procedimiento General de Desacetilación

5 Una solución del peracetato en MeOH anhidro (0.1 M) (o MeOH-THF) fue tratada con una solución de NaOMe en MeOH (1.35 M, 0.2-0.6 eq). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1 a 3 horas (monitoreada por TLC). Se agregó resina ácida AG ®-50W-X8 (forma H⁺) para ajustar el pH = 6-7, y la mezcla fue filtrada y la resina fue lavada con MeOH. El filtrado combinado y los lavados fueron concentrados al vacío y secados por completo para proporcionar el producto de poliol.

10

Procedimiento general para sulfonación

15 Una mezcla del poliol y el complejo trimetilamina SO₃ o piridina SO₃ (2 eq. por alcohol) en DMF fue calentada (60°C, o/n). La mezcla de reacción enfriada (TA) fue tratada con MeOH y posteriormente hecha básica (hasta un pH >10) mediante la adición de Na₂CO₃ (10% p/p). La mezcla fue filtrada y el filtrado evaporado y coevaporado (H₂O). El material polisulfatado crudo fue disuelto en H₂O y sometido a una cromatografía de exclusión por tamaño (ver abajo) para proporcionar el producto sulfatado. Cuando fue requerido, después de la liofilización el producto fue pasado a través de una columna de resina de intercambio iónico (AG ®-50W-X8, forma Na⁺, 1 x 4 cm, H₂O desionizado, 15 mL) para poder transferir el producto uniformemente en la forma de sal de sodio. La solución recolectada fue evaporada y liofilizada para proporcionar el producto final.

20

Cromatografía de exclusión por tamaño

25 La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) fue ejecutada sobre Bio-Gel P-2 en una columna de 5 x 100 cm y una velocidad de flujo de 2.8 mL/min de 0.1 M NH₄⁺ HCO₃⁻, recolectando fracciones de 2.8 min (7.8 mL). Las fracciones se analizaron para determinar el contenido en carbohidratos sembrándolas en placas de gel de sílice y se visualizaron por calcinación y/o se analizaron para determinar las especies policargadas mediante el ensayo de azul de dimetilmileno (DMB)²⁹. Finalmente, se verificó la pureza de las fracciones mediante CE⁸ y aquellas libres de sal fueron agrupadas y liofilizadas.

30

Ejemplo 1: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosida (2) de dodecilo

35

A una solución de tricloroacetamida 1²⁸ (0.469 g, 0.285 mmol) en DCM (15 mL) se le agregó 1-dodecanol (0.849 mmol), 3 eq) y 3Å MS (50 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de -20°C durante 20 minutos. TMSOTf (103 μ L, 0.57 mmol, 2 eq) fue agregado y la mezcla fue agitada a una temperatura de -20°C durante 50 minutos antes de desactivarla con Et₃N (30 μ L, 0.285 mmol, 1 eq). Posteriormente a calentar a temperatura ambiente, la mezcla fue filtrada y el sólido fue lavado con DCM. Los lavados y filtrados combinados fueron evaporados en gel de sílice y purificados por cromatografía en columna (sílice 2 x 20 cm, gradiente de elución con CHCl₃, CHCl₃-MeOH 99:1 a 98:2) para proporcionar el de glucósido 2 como una goma incolora. Dos fracciones fueron obtenidas, cada una conteniendo el producto derivado (76 mg, 2:BnNHAc = 5:3; 179 mg, 2:BnNHAc = 5:11) ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 5.30-5.16 (m, 8H), 4.99-4.87 (m, 8H), 4.31-3.77 (m, 19H), 3.68-3.61 (m, 1H, OCH₂), 3.44-3.36 (m, 1H, OCH₂), 2.18, 2.17, 2.15, 2.11, 2.10, 2.09, 2.07, 2.06, 2.05, 2.02, 2.01, 1.97, 1.95 (cada s, total 48H, 16xAc), 1.58 (quintete, 2H, J= 6.7, CH₂), 1.33-1.22 (m, 18H, 9xCH₂), 0.86 (t, 3H, J= 6.7, CH₃).

40

45

α -D-Manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de dodecilo (3)

50

Siguiendo el procedimiento general para la desacetilación, se trató glucósido 2 (72 mg, 0.043 mmol) en MeOH (3 mL) con NaOMe (11 M en MeOH, 5 μ L, 0.055 μ mol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 20 horas, neutralizada por adición de resina AG50WX8 (forma H⁺), filtrada y lavada con agua. La solución fue extraída con EtOAc (x2) para eliminar el BnNHAc. La fase acuosa fue evaporada a sequedad y el residuo fue secado con congelamiento para proporcionar el poliol 3 como un sólido amorfo, utilizado directamente para el siguiente paso ¹H RMN (D₂O, 400 MHz, interno DOH a 4.60 ppm) δ 4.97-4.83 (m, 5H), 4.06-3.21 (m, 32H), 1.41 (s a, 2H), 1.11 (s a, 18H), 0.71 (t, 3H, J= 6.7, CH₃).

55

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de dodecilo (4)

60

Siguiendo el procedimiento estándar para la sulfonación, el poliol 3 (0.43 mmol) fue sulfonado y purificado por SEC para proporcionar el producto 4 como un polvo blanco (77 mg). ¹H RMN (D₂O, 400 MHz, interno DOH a 4.60 ppm) δ 5.19 (s, 1H), 5.15 (d, 1H₅ J= 1.9), 5.10 (d, 1H₅ J= 1.9), 5.07 (d, 1H₅ J= 1.9), 4.89 (m, 1H), 3.77-3.64 (m, 3OH, azúcar), 3.48-3.41 (m, 1H, OCH₂), 3.33-3.27 (m, 1H, OCH₂), 1.30 (m, 2H, CH₂), 1.10-0.90 (m, 18H, 9xCH₂), 0.54 (t, 3H₅ J= 6.7, CH₃).

65

Ejemplo 2: 12-Azido-1-dodecanol

Una mezcla de 12-bromo-1-dodecanol (246 mg, 0.97 mmol) en t-butanol (1.8 mL, 0.5 M) fue tratada con azida de sodio (121 mg, 1.855 mmol, 2 eq), ioduro de tetrabutilamonio (17 mg, 0.0464 mmol, 0.05 eq) y solución de bicarbonato de sodio sat. aq. (0.9 mL) en ese orden. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 4 días. La mezcla fue filtrada a través de un lecho de celite y la masa retenida lavada con acetato de etilo (20 mL). Los lavados y el filtrado combinados fueron evaporados en gel de sílice y purificados por columna flash (2.5x18 cm, gradiente de elución con hexano-acetato de etilo 6:1, 4:1 a 2:1) para proporcionar 12-Azido-1-dodecanol como un aceite incoloro (193 mg, 92%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 3.62 (t, 2H, J= 7.0, OCH₂), 3.24 (t, 2H, J= 7.0, NCH₂), 1.61-1.51 (m, 4H)₅ 1.35-1.25 (m, 16H).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 12-azidododecilo (5)

A una solución de tricloroacetimidato 1 (0.325 g, 0.197 mmol) en DCM (15 mL) se le agregó 12-azidododecanol (1.5 eq) y 3Å MS (50 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de -20°C durante 20 minutos. TMSOTf (54 μ L, 0.296 mmol, 1.5 eq) fue agregado y la mezcla fue agitada a una temperatura de -20°C durante 30 minutos antes de desactivarla con Et₃N (1 eq). Posteriormente a calentar a temperatura ambiente, la mezcla fue filtrada y el sólido fue lavado con DCM. Los lavados y el filtrado combinados fueron evaporados en gel de sílice y purificados por cromatografía en columna (sílice 2 x 20 cm, de gradiente de elución con CHCl₃, CHCl₃-MeOH 99:1 a 98:2) para proporcionar el glucósido 5 como una goma incolora que contiene el producto derivado BnNHAc (71.1 mg, 5:BnNHAc = 1:1). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.29-5.14 (m, 8H), 5.01-4.86 (m, 8H), 4.28-3.75 (m, 19H), 3.64 (dt, 1H, J= 9.5, 7.0, OCH₂), 3.39 (dt, 1H, J= 9.5, 7.0, OCH₂), 3.22 (t, 2H, J= 7.0, NCH₂), 2.16, 2.15, 2.11, 2.10, 2.09, 2.09, 2.09, 2.09, 2.07, 2.06, 2.04, 2.04, 2.01, 1.95 (cada s, total 48H, 16xAc), 1.57 (m, 4H, 2xCH₂), 1.36-1.22 (m, 16H, 8xCH₂).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 12-(4-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)dodecilo (6)

En un frasco de muestra de HPLC de 1 mL se cargó la azida 5 (71 mg, 41.5 μ L), t-butanol (100 μ L, 0.4 M), fenilacetileno (83 μ L, 2 eq), solución de sulfato de cobre (0.3 M en agua, 14 μ L, 4.2 μ L, 10 mol%) y solución de ascorbato de sodio (1M en agua, 12.4 μ L, 12.4 μ L, 30 μ mol%) en ese orden. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla fue posteriormente evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía en columna flash (1 x 18 cm, gradiente de elución con hexano-acetato de etilo 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 a 1:3) para proporcionar feniltriazolo 6 como una goma incolora (46.3 mg, 62%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.82 (d, 2H, J= 7.2, Ph), 7.75 (s, 1H, triazolo), 7.41 (t, 2H, J= 7.2, Ph), 7.31 (t, 1H, J= 7.2, Ph), 5.30-5.15 (m, 8H), 5.03-4.87 (m, 8H), 4.38 (t, 2H, J= 7.2, NCH₂), 4.29-3.77 (m, 19H), 3.64 (dt, 1H, J= 9.6, 6.8, OCH₂), 3.40 (dt, 1H, J= 9.6, 6.8, OCH₂), 2.17, 2.16, 2.16, 2.13, 2.11, 2.11, 2.11, 2.10, 2.09, 2.07, 2.05, 2.05, 2.02, 2.00, 1.96 (cada s, total 48H, 16xAc), 1.93 (m, 2H, CH₂), 1.57 (m, 2H, CH₂), 1.34-1.24 (m, 16H, 8xCH₂).

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 12-(4-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)dodecilo (8)

(a) Siguiendo el procedimiento general para la desacetilación, se trató peracetato 6 (46 mg, 0.0254 mmol) en MeOH (4.5 mL) con NaOMe (11 M en MeOH, 50 μ L, 0.55 μ mol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 18 horas, neutralizada por adición de resina AG50WX8 (forma H⁺), filtrada y lavada con MeOH. El filtrado fue evaporado y el residuo fue secado en disecadores al vacío bajo P₂O₅ y utilizado sin una purificación o caracterización adicional. (b) siguiendo el procedimiento estándar de sulfonación, el poliol 7 descrito anteriormente fue sulfonado y purificado por SEC para proporcionar el producto 8 (45 mg) como un polvo blanco ¹H RMN (D₂O, 400 MHz, interno DOH a 4.60 ppm) δ 7.88 (s, 1H, triazol-CH), 7.47-7.44 (m, 2H), 7.21-7.10 (m, 3H), 5.23 (s a, 1H), 5.19 (d, 1H, I= 1.5), 5.12 (d, 1H, J= 1.8), 5.10 (d, 1H, J= 1.5), 4.91 (m, 1H), 4.76-3.72 (m, 32H, azúcar y NCH₂), 3.37-3.30 (m, 1H, OCH₂), 3.23-3.17 (m, 1H, OCH₂), 1.51 (m, 2H, CH₂), 1.12 (m, 2H, CH₂), 0.90-0.63 (m, 16H, 8xCH₂).

Ejemplo 3: 2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 12-(4-naftalen-1-il-[1,2,3]triazol-1-il)dodecilo (9)

En un frasco de muestra de HPLC de 1 mL se cargó azida 5 (86 mg, 50.3 μ L), t-butanol (100 μ L, 0.4 M), 1-etilinaftaleno (83 μ L, 2 eq), solución de sulfato de cobre (0.3 M en agua, 14 μ L, 4.2 μ L, 10 mol%) y solución de ascorbato de sodio (1M en agua, 12.4 μ L, 12.4 μ L, 30 μ mol%) en ese orden. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 11 días. Posteriormente la mezcla fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna flash (1 x 18 cm, gradiente de elución con hexano-acetato de etilo 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 a 1:3) para proporcionar naftiltriazolo 9 como una goma incolora (24.2 mg, 26%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.38-8.33 (m, 1H), 7.92-7.86 (m, 2H), 7.80 (s, 1H, triazol-CH), 7.72 (dd, 1H, J= 7.3, 1.5), 7.54-7.48 (m, 3H), 5.31-5.15 (m, 8H), 5.03-4.87 (m, 8H), 4.47 (t, 2H, J= 7.3, N-CH₂), 4.30-3.77 (m, 19H), 3.64 (dt, 1H, J= 9.7, 6.8, OCH₂), 3.40 (dt, 1H, J= 9.7, 6.8, OCH₂), 2.17, 2.16, 2.16, 2.13, 2.12,

2.11, 2.11, 2.10, 2.09, 2.07, 2.06, 2.05, 2.02, 2.00, 1.97, 1.57 (15s, cada 3H, excepto 2.100 (6H), 16 χ Ac), 2.07-1.95 (m, solapado con singletes Ac, 2H, CH₂), 1.57 (m, 1H, CH₂), 1.42-1.23 (m, 16H, 8 \times CH₂).

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 12-(4-naftalen-1-il-[1,2,3]triazol-1-il)dodecilo (11)

(a) Siguiendo el procedimiento general para la desacetilación, se trató glucósido 9 (39.6 mg, 0.0213 mmol) en MeOH (3 mL) con NaOMe (11 M en MeOH, 40 μ L, 0.044 μ L). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas, neutralizada por adición de resina AG50WX8 (forma H⁺), filtrada y lavada con MeOH. El filtrado fue evaporado y el residuo fue secado en un desecador al vacío bajo P₂O₅. (b) siguiendo el procedimiento estándar de sulfonación, el poliol 10 descrito anteriormente fue sulfonado y purificado por SEC para proporcionar el producto 11 como un polvo blanco (40 mg, 68%). ¹H RMN (D₂O, 400 MHz, interno DOH a 4.60 ppm) δ 8.05 (s, 1H, triazol-CH), 7.97 (d, 1H, J = 8.3), 7.90 (d, 2H, J = 7.8), 7.55-7.40 (m, 4H), 5.44-5.22 (m, 4H), 5.09-3.82 (m, 33H, azúcar y NCH₂), 3.41-3.33 (m, 1H, OCH₂), 3.25-3.16 (m, 1H, OCH₂), 1.78 (quintete, 2H, CH₂), 1.14-0.79 (m, 18H, 9 \times CH₂).

Ejemplo 4: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosido (13)

El tetrasacárido 12³⁰ fue peracetilado (Ac₂O, piridina, DMAP, TA, 4 días) y purificado por cromatografía flash (gel de sílice, gradiente de hexano-EtOAc) para proporcionar el peracetato 13 como un aceite. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6.20 (d, 1H, J_{1,2} = 1.8, H-1), 5.35-5.15 (m, 7H), 5.05-4.92 (m, 5H), 4.30-3.85 (m, 15H), 2.18 (s, 6H, OAc), 2.14 (s, 6H, OAc), 2.12 (s, 6H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 6H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 6H, OAc), 1.97 (s, 3H, OAc).

Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosilo (14)

El peracetato 13 (500 mg, 398 μ L) en éter dietílico (3.0 mL) y THF (750 μ L) fue tratado con bencilamina (0.137 g, 1.3 mmol, 139 μ L) a una temperatura de 0°C. La mezcla fue calentada lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente y se dejó reaccionar durante la noche. El solvente fue evaporado y el residuo recogido en DCM y lavado con 0.5 M HCl frío (x3), seguido por salmuera y la solución orgánica fue secada (Na₂SO₄), filtrada y evaporada. Al residuo se añadió DCM seco y tamices moleculares (3Å, 30 mg), carbonato de cesio anhidro (12.9 mg, 39.8 μ L) y carbonato de potasio (110 mg, 796 μ L) fueron agregados. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C antes de que el tricloroacetoniitrilo (115 mg, 80 μ L, 796 μ L) fuera agregado. La mezcla fue agitada durante 5 horas a temperatura ambiente hasta una conversión completa de TLC. La mezcla fue filtrada y el solvente fue evaporado para proporcionar el producto crudo el cual fue sometido a una cromatografía de columna (SiO₂, 6:1 Hex:EtOAc a 1:3 Hex: EtOAc, producto eluido con 1:2 Hex:EtOAc) para proporcionar la tricloroacetimidina 14 (307.5 mg, 57%) como un aceite claro el cual fue solidificado cuando se mantuvo en el refrigerador. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6.40 (d, 0.7H, J_{,2} = 1.5, H-1 α), 6.22 (d, 0.3H, J_u = 1.5, H-1 β), 5.40-5.14 (m, 7H), 5.05-4.89 (m, 5H), 4.31-3.84 (m, 15H), 2.19-1.98 (m, 39H, OAc).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 3 β -colesterilo (15)

Una solución de 14 (90 mg, 0.0663 mmol) y colesterol (39.8 mg, 0.0995 mmol), 1.5 eq) en DCE (secado sobre 3Å MS, 0.7 mL, 0.094 M) fue agitada con 3Å MS (~50 mg) a una temperatura de -20 °C mientras TMSOTf (10 mL, 0.0995 mmol, 1.5 eq) fue agregado a través de una jeringa. La temperatura (externa) fue calentada hasta -5°C durante un periodo de 40 min. El color amarillo lentamente se tornó anaranjado (rojizo). Se agregó Et₃N (50 μ L). El color desapareció inmediatamente. La mezcla fue diluida con DCM (20 mL) y lavada con Na₂CO₃-salmuera sat., secada (Na₂SO₄) y filtrada. El filtrado fue evaporado en gel de sílice y purificado por cromatografía de columna (sílice 1x18 cm, gradiente de elución con hexano-EtOAc 4:1, 2:1, 1:1, 1:2 a 1:3) para proporcionar un glucósido 15 como una goma incolora (58 mg, 55%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): 5.34-5.14 (m, 8H, azúcar y colesterol-H6), 5.05-4.90 (m, 6H, azúcar), 4.30-3.84 (m, 15H, azúcar), 2.34-0.80 (m, 30H, colesterol), 2.17, 2.16, 2.13, 2.06, 2.05, 2.02, 2.01, 2.01, 1.96 (cada s, cada 3H, 9 \times Ac), 2.11, 2.10 (cada s, cada 6H, 4 χ Ac), 0.98 (s, 3H, Me), 0.90 (d, 3H, J = 6.4, Me), 0.85 (d, 3H, J = 6.4, Me), 0.84 (d, 3H, J = 6.4, Me), 0.66 (s, 3H, Me); ESMS: m/z 1604 ([M+Na]⁺).

α -D-Manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de 3 β -colesterilo (16)

Una solución de 15 (56 mg, 0.0354 mmol) en MeOH (secado sobre 3Å MS, 3 mL) fue agitada con 11M NaOMe en MeOH (50 μ L) durante 40 minutos. Se formó un precipitado color blanco. El THF (1 mL) fue agregado con éxito para mejorar la solubilidad. Se agregó DMF (4 mL). Se disolvió una parte del precipitado. La mezcla fue agitada por un total de 6 horas. Agua (0.8 mL) fue agregada para hacer una solución transparente. El pH fue ajustado a 6~7 con la adición de resina AG50W-X8 (forma H⁺). La mezcla fue filtrada y la resina fue lavada con MeOH (1 mL). La evaporación pretendida en un evaporador de rotación fue detenida ya que hubo un surgimiento de espuma serio. La mezcla fue evaporada mediante flujo de aire y liofilizada durante 8 horas para proporcionar el poliol 16 como un sólido blanco el

cual fue secado en un desecador de vacío bajo P₂O₅ durante la noche y utilizado directamente para el próximo paso.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3 β -colesterilo (17)

Siguiendo el procedimiento estándar para sulfonación, el poliol 16 (0.0354 mmol) fue sulfonado. La mezcla cruda enfriada fue basicada mediante la adición de 5 M NaOH (561 μ L, 2.81 mmol, 2.05 eq basado en un complejo de piridina SO₃). Posteriormente a la evaporación, el residuo fue disuelto en agua (3 mL) y purificado por SEC. Las fracciones puras fueron combinadas y dializadas utilizando Slide-A-Lyser® Cassette 2K (0.5-3 mL) en agua purificada con la adición de 1M Na₂CO₃ durante la noche. Otra carga de 1M Na₂CO₃ fue agregada y el agua recién purificada fue cambiada. La diálisis continuó durante la noche. La solución amarilla fue removida y liofilizada para proporcionar el producto 17 como un polvo blanquecino (34.8 mg, 42%). ¹H RMN (D₂O, 400 MHz) δ 6.41-6.26 (m, 4H, azúcar y colesiterilo-H6), 5.09 (s, 1H), 5.03 (d, 1H, J= 2.2), 4.86 (s, 1H), 4.73-3.94 (m, 22H), 3.51 (m, 1H, colesiterilo-H3), 2.35 (dm, 1H, J= 11.7, colesiterilo-H4), 2.24 (dm, 1H, J= 11.7, colesiterilo-H4), 1.90-0.51 (m, incluyendo 0.869 [s, 3H], 0.766 [d, 3H, J= 6.6], 0.689 [d, 3H, J= 6.6], 0.686 [d, 3H, J= 6.6], y 0.533 [s, 3H], 43H, colesiterilo).

Ejemplo 5: Colestanol

Al colesterol (500 mg) se añadió acetato de etilo. Paladio sobre carbón al 10% fue agregado y la mezcla fue agitada durante la noche con un globo de hidrógeno. La mezcla fue filtrada y el solvente evaporado para proporcionar el producto como un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.58 (m, 1H, CHOH), 2.44 (ancho, 1H, OH), 1.97-0.83 (m, 31H), 0.88 (d, 3H, J = 6.6, CH₃), 0.85 (dd, 6H, J= 1.5, J= 6.6, CH₃), 0.79 (s, 3H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanilo (18)

A una solución de 14 (600 mg, 4.42 x 10⁻⁴ moles) en DCM (32 mL) bajo argón, se le agregó colestanol (300 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de -20°C durante 20 minutos. TMSOTf (40 μ L) fue agregado. La mezcla fue agitada a una temperatura de -20°C durante 40 minutos, posteriormente calentada hasta una temperatura de -10°C durante 20 minutos. Se agregó trietilamina (70 μ L) a la mezcla y fue calentada hasta alcanzar la temperatura ambiente. El solvente fue evaporado. El producto crudo fue purificado utilizando cromatografía de columna (SiO₂: 3:1 Hex:EtOAc a 1:2 Hex:EtOAc) para producir el glucósido 18 (220 mg, 31%) como un aceite claro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 5.35-5.15 (m, 7H), 5.03-4.91 (m, 6H), 4.31-3.85 (m, 15H), 3.51 (m, 1H, C-3), 2.18 (s, 3H, OAc), 2.17 (s, 3H, OAc), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 6H, OAc), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.97-0.78 (m, 31H, colestanol), 1.97 (s, 3H, OAc), 0.88 (d, 3H, J = 6.6, CH₃), 0.85 (dd, 6H, J= 1.5, J= 6.6, CH₃), 0.79 (s, 3H, CH₃), 0.63 (s, 3H, CH₃).

α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanilo (19)

El glucósido 18 (43.1 mg) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar el poliol 19 como un sólido blanco (21 mg, 74%) el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanilo (20)

El poliol 19 (19 mg, 18.3 μ L) fue disuelto en DMF (1.3 mL, 0.015 M). Se agregó piridina SO₃ (6 equiv./OH, 1.43 mmol, 227 mg) y la mezcla fue agitada durante la noche a una temperatura de 60°C. La mezcla fue enfriada en un baño de agua fría antes de que se agregara 5M NaOH (613 μ L) de una vez para neutralizar la solución. El solvente fue evaporado. El residuo fue descolorado con un cartucho C18 SPE y desalado por diálisis, utilizando un cartucho de diálisis MWCO 2000 durante 48 horas con tres cambios de agua, seguido por la liofilización para producir el producto 20 como un sólido blanco (19.2 mg, 44%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 5.52-5.46 (m, 3H), 5.26-5.20 (m, 2H), 5.04 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 4.84- 4.15 (m, 21H), 3.76 (m, 1H, C-3), 2.00-0.81 (m, 31H, colestanol), 0.91 (d, 3H, CH₃), 0.86 (d, 6H, J= 6.2, CH₃), 0.81 (s, 3H, CH₃), 0.66 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 6. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 3-azidoprop-1-ilo (21)

BF₃ Et₂O (78 mg, μ L) fue agregado a una solución de peracetato 13 (276 mg, 220 μ L) y 3-azidopropan-1-ol³¹ (67 mg, 660 μ L) en DCE anhidro (8 mL). Esta solución fue agitada a una temperatura de 60°C en un frasco sellado durante 2 horas, antes de que fuera agregada una porción adicional de BF₃ Et₂O (115 mg, 810 μ L) y la solución fue calentada durante 3 horas adicionales. La solución fue enfriada a temperatura ambiente y vertida en un mezcla de hielo triturado, NaHCO₃ (sat. aq.) y salmuera. La mezcla fue extraída con EtOAc y la capa orgánica fue lavada de manera adicional con

1:1 salmuera:NaHCO₃ (sat. aq.), y posteriormente secada (Na₂SO₄), evaporada y codestilada con tolueno anhidro. Se agregó DCM anhidro (5 mL), anhídrido acético (66 mg, 648 µL), Et₃N (89 mg, 875 µL) y DMAP (cristal) y la solución fue almacenada a una temperatura de -20 °C durante la noche. La solución fue aplicada directamente a una columna de cromatografía flash preparada (17 x 2 cm de gel de sílice, gradiente de elución 60:40 a 75:25 EtOAc:Hx) para proporcionar el glucósido 21 (176 mg, 61%) como un aceite. ESMS: m/z 1319.69 ([M+Na]⁺). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.31-5.12 (m, 7H), 5.00-4.87 (m, 6H), 4.26-3.94 (m, 1 IH), 3.90-3.81 (m, 2H), 3.77 (dt, IH, J= 9.9, 6.0), 3.47 (dt, IH, J= 9.9, 6.0), 3.42-3.32 (m, 2H), 2.14(1), 2.13(5), 2.10, 2.08 x 2, 2.06 x 2, 2.05, 2.03(2), 2.02(5), 1.99, 1.98, 1.93 (13xs, 13x3H, OAc>>13), 1.84 (quintete, IH, J= 6.2). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ:170.6, 170.5, 170.4, 170.3, 170.1(4), 170.0(9), 169.9(2), 169.8(8), 169.7, 169.6, 169.5(4), 169.4(5), 169.3, 99.4, 98.9, 98.8, 98.1, 76.8, 75.1(5), 75.1(1), 70.9, 70.8, 70.1, 69.6, 69.5, 69.4, 69.2, 68.5, 68.3, 67.3, 66.6, 66.1, 65.5, 64.7, 62.5, 61.9, 61.7, 48.0, 28.5, 20.8(4), 20.7(6), 20.7, 20.6, 20.5(4), 20.5(2), 20.4(9), 20.4(7).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (22)

(a) El glucósido 21 (500 mg, 386 µL) fue disuelto en THF (10 mL). Se agregó trifetilfosfina enlazada a un polímero (725 mg) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. Agua (210 µL) fue agregada, y la mezcla fue agitada a una temperatura de 50°C durante 4 horas. La mezcla fue enfriada, filtrada, y el solvente evaporado para producir un sólido blanco el cual fue utilizado sin una purificación o caracterización adicional en el siguiente paso.

(b) La amina descrita anteriormente (250 mg, 197 µL) fue disuelta en DCM (6 mL). Se agregó cloruro de estearoilo (2 equivalentes, 394 µL, 119 mg, 133 µL), seguido por trietilamina, y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 5 horas. El solvente fue evaporado, y al residuo fue añadido DCM, antes de ser lavado con NaHCO₃ (sat.), secado (Na₂SO₄), y el solvente evaporado. El producto crudo fue purificado por cromatografía de columna (SiO₂: DCM → 4% MeOH/DCM) para proporcionar la amida 22 como un aceite claro (102 mg, 33%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.86 (ancho m, IH, NH), 5.32-5.12 (m, 7H), 5.02-4.88 (m, 6H), 4.28-3.96 (m, 15H), 3.73 (m, IH, CH₂O), 3.45 (m, IH, CH₂O), 3.32 (m, 2H, CH₂N), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.15 (s, 3H, OAc), 2.12 (m, 2H, CH₂CO), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 6H, OAc), 2.08 (s, 6H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 6H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.79 (m, 2H, CH₂), 1.58 (m, 2H, CH₂), 1.28-1.20 (m, 28H, CH₂), 0.84 (t, 3H, CH₃).

α-D-Manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (23)

La amida 22 (101.6 mg) fue desacetilada de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar el poliol 23 (61 mg, 93%) como un sólido blanco que fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (24)

El poliol 23 (60.9 mg, 62 µL) fue disuelto en DMF (0.02 M, 3.1 mL). Se agregó SO₃.piridina (3 equiv/OH, 2.42 mmol, 385 mg) y la solución fue agitada a una temperatura de 60°C durante la noche. La mezcla fue enfriada en un baño de agua fría y se agregó 5M NaOH (2.1 equiv/SO₃.piridina, 5.08 mmol, 1.02 mL) de una vez antes de que el solvente se evaporara. Al compuesto fue añadido 1% MeOH en agua y purificada en un cartucho C18 SPE. El compuesto fue posteriormente dializado durante dos noches utilizando un cartucho de diálisis 2000 MWCO, antes de ser liofilizado para producir el producto 24 (113 mg, 79%) como un sólido color blanco. ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 5.56 (m, IH), 5.48 (m, 2H), 5.28 (m, IH), 5.11 (m, IH), 5.06 (m, IH), 4.91-4.13 (m, 22H), 3.87 (m, IH, CH₂O), 3.70 (m, IH, CH₂O), 3.32 (m, 2H, CH₂N), 2.29 (t, 2H, CH₂CO), 1.88 (m, 2H, CH₂), 1.62 (m, 2H, CH₂), 1.33-1.28 (m, 28H, CH₂), 0.90 (t, 3H, CH₃).

Ejemplo 7. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido de 3β-colestanilo (25)

El tricloroacetimidato 1 (165 mg, 0.1 mmol), colestanol (78 mg, 2 eq, 0.2 mmol) y tamices moleculares 3 Å (100 mg) fueron agitados en DCM seco durante 2 horas. Una solución de triflato-TMS en DCM seco (0.4 M, 0.075 mL, 0.03 mmol, 0.3 eq) fue agregada en forma de gotas a una temperatura de 0°C y continuo agitándose durante 40 minutos a la misma temperatura. La reacción fue desactivada agregando Et₃N (5 µL), diluida con EtOAc (100 mL), sonicada (3 minutos) y decantada. La solución orgánica fue lavada con solución NaHCO₃ (3 X 20 mL) sat., la fase orgánica fue extraída nuevamente con EtOAc (3 x 20 mL), lavada con salmuera (1 x 20 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada al vacío para producir la glucósido como una espuma incolora. El producto fue purificado en una columna de gel de sílice (20 x 2 cm, tolueno: EtOAc, 1 : 2). La purificación dio 2 fracciones (A, B) en donde la fracción A (90 mg, 48% de producción) contenía el producto puro pero la fracción B fue una mezcla del producto puro y un producto desacetilado (1 : 1, 74 mg). Para mejorar la producción de la glucósido deseada, la fracción secada B y DMAP (cat) fue disuelta en piridina seca (2 mL) y acetilada agregando Ac₂O (0.1 mL) a una temperatura de 0°C y la agitación continuó durante 30 minutos a TA. La solución fue concentrada al vacío y coevaporada con tolueno (3 x 20 mL) para producir el glicosido puro 25 (71 mg, 38% de producción) para proporcionar una producción total de 86%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.14-5.32 (m, 9 H, 5 H-4, 2

H-3, H-2^{IV}), 4.90-5.05 (m, 8 H, 5 H-I, 3 H-3), 3.90-4.31 (m, 19 H, H-2, H-3^I, H-3^{II}, H-3^{III}, 5 H-5, 5 H-6^a, 5 H-6^b), 3.80 (ddd, 1 H, H-5), 3.52 (m, 1 H, H-3 Col.), 2.18, 2.17, 2.14, 2.12, 2.11, 2.10, 2.08, 2.07, 2.06, 2.03, 2.01, 1.98, (s, 48H, 16 x Ac), 0.55-1.82 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.89 (d, 3H, J= 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.857 (d, 3H, J= 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.853 (d, 3H, J= 6.6, colestaniolo-CH₃), 0.79 (s, 3H, colestaniolo-CH₃), 0.64 (s, 3H, colestaniolo-CH₃).

5 α -D-Manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de 3 β -colestaniolo (26)

10 El glucósido 25 (181 mg, 0.097 mmol) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar un poliol cristalino blanco 26 (116 mg, 100%), utilizado sin una purificación o caracterización adicional en el siguiente paso.

15 2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3 β -colestaniolo (27)

20 El poliol seco 26 (40 mg, 0.033 mmol) fue disuelto en DMF seco (0.83 mL) y SO₃.piridina recién lavada y secada (250 mg, 3 eq por grupo OH, 1.85 mmol) fue agregada y agitada 16 horas a una temperatura de 60°C. La reacción fue desactivada agregando en forma de gotas una solución NaOH acuosa (5 M, 2.1 eq SO₃, 0.66 mmol) a una temperatura de 0°C (pH 12) y una concentración al vacío a una temperatura de 40°C para producir un polvo color amarillo. El polvo fue disuelto en agua (calidad HPLC, 12 mL) y dializado en un cartucho 2K contra el agua purificada durante 36 horas. Después de 16 horas una solución acuosa de NH₄HCO₃ (0.1 M, 0.5 mL) fue agregada al cartucho para garantizar un pH mayor a 7. El producto fue purificado mediante HPLC de fase inversa utilizando un gradiente de 10% MeCN-agua \rightarrow 35% MeCN-agua y rango de flujo de 5 mL/min con la detección por ELS. Las fracciones que contenían el producto puro fueron combinadas y liofilizadas para producir 27 como un polvo esponjoso color blanco (23.8 mg, 25% de producción).
25 ¹H RMN (400 MHz, D₂O): ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5.48-5.57 (m, 4 H, 4 H-2), 5.29, 5.23 (bs, 4 H, H-I', H-I'', H-I''', H-I''''), 4.35-4.90 (m, 23 H, H-I, 5 H-3, 5 H-4, 2 H-5, 5 H-6^a, 5 H-6^b), 4.28 (t, 1 H, H-2), 4.15-4.24 (m, 3 H, 3 H-5), 3.81 (m, 1 H, H-3 Col.), 0.66-2.05 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.96, 0.94, 0.90, 0.88, 0.85, 0.70 (s, 15 H, CH₃). 0.85 (d, 3H, J= 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.88 (d, 6H, J= 6.8, 2 x colestaniolo-CH₃), 0.85 (s, 3H, colestaniolo-CH₃), 0.70 (s, 3H, colestaniolo-CH₃).

30 Ejemplo 8. 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosido de bencilo (28)

35 Se disolvió 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil tricloroacetimidato³² (0.609 g, 0.822 mmol, 1.1 eq) y bencil 3,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosida³³ (0.435 g, 0.747 mmol) en DCM anhidro (6 mL). Se agregó MS 3Å en polvo (80 mg recién activado). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 40 minutos. Una solución de TMSOTf (0.027 mL, 0.149 mmol, 0.2 eq) en DCM (1.5 mL) fue agregada en forma de gotas. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C mientras la reacción fue monitoreada por TLC (hexano EtOAc = 65:35). Tras 40 minutos, la reacción fue completada y Et₃N (0.3 mL, 2.15 mmol) fue agregado. La mezcla cruda fue combinada con la forma cruda de otro lote (TCA: 1.42 g, 2.098 mmol; 2-alcohol; 1.22 g, 2.098 mmol, TMSOTf: 0.114 mL, 0.629 mmol, 0.3 eq, 0°C, 40 minutos). La mezcla fue filtrada a través de un lecho de Celite y enjuagada con DCM (3 x 1 mL). A los lavados y filtrado combinados se les agregó piridina (0.121 mL, 1.494 mmol, 2 eq) y cloruro de benzoilo (0.130 mL, 1.212 mmol, 1.5 eq). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente o/n, evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna (gel de sílice 3 x 20 cm, gradiente de elución con hexano-EtOAc 200:20, 200:80, 200:50, 240:80, 200:90, 200:100) para proporcionar el disacárido 28 como una goma incolora (594 mg, 68%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.15-7.88 (m, 14H, Ph), 7.59-7.25 (m, 26H, Ph), 6.16-5.94 (m, 5H), 5.30-5.27 (m, 2H), 4.82 (d, 1H, J= 11.7), 4.68-4.39 (m, 8H).

45 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-benzoil-D-manopiranosida (29)

50 El disacárido 28 (670 mg, 0.577 mmol) fue disuelto en MeOH (3 mL) y EtOAc (30 mL). Paladio en carbón vegetal (5%, 80 mg) fue agregado. La mezcla fue agitada bajo 50 psi de hidrógeno a temperatura ambiente o/n. TLC indicó ~60% de conversión. Se agregó más paladio sobre carbón vegetal (5%, 80 mg). La agitación fue continuada a 50 psi durante 3 días. TLC indicó la conversión completa. La mezcla fue filtrada a través de un lecho de Celite y lavada con EtOAc (5 x 1 mL). Los lavados y filtrado combinados fueron evaporados a sequedad para proporcionar el compuesto de título 29 como una espuma incolora (609 mg, 99%). El producto fue utilizado directamente para el siguiente paso sin purificación.

55 Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-benzoil-D-manopiranosilo (30)

60 A una solución preenfriada (0°C) de 29 (609 mg, 0.569 mmol) en DCM anhidro (2.8 mL, 0.2 M) se le agregó tricloroacetimidato (114 μ L, 1.138 mmol, 2 eq). Una solución de DBU (4.3 μ L, 0.05 eq, 0.0285 mmol) en DCM anhidro (0.3 mL) fue agregada. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 4 horas y TLC (hexano-EtOAc = 65:35) indicó una conversión completa. La mezcla cruda fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna de sílice (2.5 x 14 cm, gradiente de elución con hexano-EtOAc-Et₃N 210:20:0.5, 200:50:0.5, 180:60:0.5, 150:70:0.5). Las fracciones del producto fueron combinadas, evaporadas y secadas en un desecador de vacío sobre P₂O₅ o/n para proporcionar el tricloroacetimidato 30 como una espuma blanca (530 mg, 77%), utilizado sin una purificación adicional en el siguiente paso.

65 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-benzoil-D-manopiranosido de 3 β -colestaniolo (31)

A una solución de tricloroacetimidato 30 (260 mg, 0.214 mmol) y 3 β -colestanol (166 mg, 0.428 mmol, 2 eq) en DCM anhidro (3.8 mL) se le agregó tamices moleculares 3Å en polvo recién activados (50 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 0.5 h y una solución de TMSOTf (7.7 μ L, 0.0428 mmol, 0.2 eq) en DCM anhidro (0.3 mL) fue agregada en forma de gotas a una temperatura de 0°C. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 1.5 horas y el TLC indicó la terminación de la reacción. Et₃N (150 μ L) fue agregado y la mezcla fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna de sílice (2 x 15 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 210:20, 200:50, 180:60, 180:90) para proporcionar el glucósido 31 como una espuma color blanca (301 mg, 98%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.11-7.28 (m, 35H, Bz), 6.09 (dd o t, 1H, J_{H3(ii)}-H4(ii)) = 10.3, J_{H4(ii)}-H5(ii)) = 9.6, H4ⁱⁱⁱ), 5.97-5.87 (m, 3H, H2ⁱⁱⁱ, H3ⁱ y H4ⁱ), 5.28 (d, 1H, J_{H1-H2} = 2.2, H1), 5.28 (d, 1H, J_{H1-H2} = 1-5, H1), 4.69-4.44 (m, 6H, H5ⁱ, H5ⁱⁱⁱ, H6ⁱ y H6ⁱⁱⁱ), 4.33 (s a, 1H, H2ⁱ), 3.59 (m, 1H, OCH-col), 3.02 (dd, 1H, J_{H2(ii)}-H3(π)) = 2.9, H3ⁱⁱⁱ), 1.99-0.47 (m, 31H, colestanoilo), 0.91 (d, 3H, J = 6.6, colestanoilo-CH₃), 0.872 (d, 3H, J = 6.6, colestanoilo-CH₃), 0.867 (d, 3H, J = 6.6, colestanoilo-CH₃), 0.75 (s, 3H, colestanoilo-CH₃), 0.65 (s, 3H, colestanoilo-CH₃).

α -D-Manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-manopiranosido de 3 β -colestanoilo (32)

Una solución de 31 (293 mg, 0.203 mmol) en THF anhidro (4 mL) y MeOH (6 mL) fue tratada con una solución de 11 M NaOMe en MeOH (0.1 mL, 1.1 mmol, 5.4 eq). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente o/n. La suspensión fue tratada con AcOH (50 μ L) para proporcionar una solución clara instantánea. Se agregó la resina AG50WX8 (forma H⁺) para ajustar el pH a 6. La mezcla fue filtrada y la resina fue lavada con MeOH (2 x 2 mL). Los lavados y el filtrado combinados fueron evaporados a sequedad y fueron disecados en un disecador de vacío o/n para proporcionar el poliol 32 como un polvo color amarillo claro (171 mg, 118%), utilizado sin una purificación adicional en el siguiente paso.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanoilo (33)

El poliol 32 (96 mg, 0.135 mmol) fue disuelto en un DMF anhidro (3.4 mL, 0.04 M). El complejo de trióxido de azufre y piridina (451 mg, 2.835 mmol, 3 eq por hidroxilo, recién lavado con agua, tolueno, EtOH, DCM y secado con P₂O₅ en un disecador de vacío durante 1 hora) fue agregado. La mezcla fue agitada a una temperatura de 60°C o/n enfriada hasta 0°C. Se agregaron 5 M NaOH (794 μ L, 3.969 mmol, 1.4 eq basado en SO₃) y sat. Na₂CO₃ (2.5 M, 690 mL, 1.701 mmol, 0.6 eq basado en SO₃). El color se tornó un poco más oscuro (amarillo-anaranjado). La mezcla fue evaporada hasta que se secura. El residuo fue disuelto en 4 mL de agua (pH > 9) y purificado por cromatografía en columna Bio-Gel P-2 (eluido con 0.1 M NH₄HCO₃ a 196 mL/h, 6 minutos por colección). Las fracciones de producto fueron identificadas por MBT y CE. La liofilización proporcionó el producto 33 como un polvo amarillo pálido (33 mg, 20% para dos pasos). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz) δ 5.27 (s, 1H), 4.98 (s, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.64-4.48 (m, 4H), 4.38-4.18 (m, 4H), 4.08-3.85 (m, 4H), 3.50 (m, 1H, OCH), 1.75-0.49 (m, 46H, colestanoilo).

Ejemplo 9. Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosilo (36)

El trisacárido 34³⁰ fue peracetilado (Ac₂O, piridina, DMAP, TA, 4 días) y purificado por cromatografía flash (gel de sílice, gradiente de hexano-EtOAc) para proporcionar el peracetato 35 como un aceite. El ácido acético glacial (0.65 mmol, 0.038 mL) fue agregado en forma de gotas en una solución de etilendiamina (1.2 mmol, 0.08 mL) en THF seco (15 mL) a una temperatura de 0°C, resultando en una formación inmediata de un precipitado, el cual permanece presente hasta un desarrollo de solución acuosa. El peracetato 35 (500 mg, 0.52 mmol) fue agregado a una temperatura de 0°C y la mezcla fue agitada durante 2.5 horas a temperatura ambiente y almacenada durante la noche a una temperatura de -20°C. El TLC (tolueno / EtOAc, 1:2) posteriormente mostró la ausencia del material de partida y la presencia de un producto que se movía más lento, el cual aparece en su mayoría como una mezcla anomérica. La solución fue neutralizada agregando ácido acético (0.12 mL) para alcanzar un pH de 6. El solvente fue evaporado bajo una corriente de aire, el residuo fue disuelto en EtOAc (100 mL), lavado con solución NaHCO₃ sat. (3 x 50 mL), agua (3 x 10 mL), salmuera (30 mL), secado (Na₂SO₄) y concentrado al vacío para obtener el hemiacetal como una espuma color amarillo (500 mg), utilizada sin purificación adicional. El hemiacetal (500 mg, ~ 0.54 mmol) fue disuelto en DCM seco (4 mL), K₂CO₃ (0.95 g, 6.81 mmol) y tricloroacetnitrilo (0.67 mL, 6.63 mmol) fue agregado a una temperatura de 0°C y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 120 minutos. La mezcla fue directamente purificada en una columna de gel de sílice (30 x 2.5 cm, tolueno - EtOAc, 1:1 \rightarrow 1:2 \rightarrow EtOAc) y se obtuvo el tricloroacetimidato 36 como un polvo esponjoso blanco (300 mg, 65%). El compuesto fue secado sobre P₂O₅ durante la noche a una temperatura de -20°C.

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanoilo (37)

El imidato 36 (195 mg, 0.20 mmol), colestanol (210 mg, 2 eq, 0.56 mmol) y tamices moleculares 3 Å (100 mg) fueron agitados en DCM seco durante 0.5 horas. Una solución de triflato de TMS en DCM seco (0.4 M, 0.21 mL, 0.084 mmol, 0.3 eq) fue agregada en forma de gotas a una temperatura de 0°C y la agitación continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue desactivada agregando Et₃N (0.02 mL) a una temperatura de 0°C (pH 5), diluida con DCM (25 mL), sonicada (3 min) y decantada. La solución orgánica fue lavada con solución NaHCO₃ sat. (3 x 20 mL), la fase acuosa fue reextraída con EtOAc (50 mL), lavada con salmuera (20 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada al vacío para producir el glucósido crudo como un sólido color blanco (564 mg). El producto fue purificado en una columna

de gel de sílice (20 x 2 cm, tolueno:EtOAc 3:2 → 1:1 → 1:2). La purificación proporcionó una fracción de mezcla A (56 mg, ~80% glucósido) y la fracción B que contenía el glucósido puro 37 como un sólido blanco (170 mg, 58% de producción). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.26-5.34 (m, 3H, 2 x H₄, H₃), 5.17-5.24 (m, 3H, H₂¹, H₃¹, H₄), 5.28 (dd, 1H, J_{H₁-H₂} = 2.0, H₂¹), 5.05 (d, 1H, J_{H₁-H₂} = 2.0, H₁), 5.02 (d, 1H, H₁¹), 4.93 (d, 1H, J_{H₁-H₂} = 2.0, H₁¹), 4.30 (dd, 1H, J_{H_{6a}-H_{6b}} = -12.7, J_{H₆-H₇} = 3.9, H_{6a}), 3.97-4.22 (m, 9H, 2 x H_{6a}, 3 x H_{6b}, H₃¹, 3 x H₅, 3.95 (dd, 1H, H₂), 3.53 (m, 1H, colestaniolo-H₃), 2.19, 2.15, 2.14, 2.11, 2.10, 2.08, 2.07, 2.03, 2.02, 1.99 (s, 30H, 10 x Ac), 0.55-1.85 (m, 33H, 12 CH₂, 9 CH), 0.89 (d, 3H, J = 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.860 (d, 3H, J = 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.854 (d, 3H, J = 6.6, colestaniolo-CH₃), 0.80 (s, 3H, colestaniolo-CH₃), 0.64 (s, 3H, colestaniolo-CH₃).

10 α-D-Manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosido de 3β-colestaniolo (38)

El peracetato 37 (165 mg, 0.127 mmol) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para producir el poliol cristalino blanco 38 (107 mg, 96% de producción), utilizado sin una purificación o caracterización adicional en el siguiente paso.

15 2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3β-colestaniolo (39)

20 El poliol seco 38 (50 mg, 0.058 mmol) fue disuelto en DMF seco (2.9 mL, 0.02 M) y piridina SO₃ recién lavada y secada fue añadida (1:1, 277 mg, 3 eq por grupo OH, 1.74 mmol). La mezcla fue agitada durante 16 horas a una temperatura de 60°C y posteriormente fue enfriada hasta una temperatura de 0°C durante 15 minutos y neutralizada agregando una solución de NaOH acuosa helada (5 M, 2.1 eq/SO₃, 0.731 mL, 3.65 mmol) a una temperatura de 0°C en una porción (a pH 12). La suspensión fue agitada durante 15 minutos a una temperatura de 0°C, diluida con agua (10 mL) transferida a un frasco de fondo redondo de 500 mL y concentrada al vacío a una temperatura de 40°C. Un polvo amarillo pálido fue producido, el cual fue disuelto en agua (10 mL) obteniendo una solución con pH 10. La solución fue establecida a un pH 12 agregando una solución acuosa de NaOH (5 M, 5 gotas), dializada contra agua (4 L) utilizando un cassette Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 4-12 mL) durante 16 horas a temperatura ambiente. La diálisis continuó a una temperatura de 0°C contra agua (4 L) durante 3 días, en donde cada 24 horas una solución acuosa de NH₄HCO₃ (3 M, 0.6 mL) fue agregada al agua para establecer el pH a ~ 6.5. La solución desalada fue posteriormente liofilizada para producir el persulfato 39 como un polvo esponjoso blanco (91 mg, 83%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) 5.50 (m, 2 H, H₁ o H₂), 5.23, 5(m, 2 H, H₁ o H₂), 4.12-4.92 (m, 17 H, H₁, 1 x H₂, 3 x H-3, 3 x H-4, 3 x H-5, 3 H-6^a, 3 H-6^b) 3.80 (m, 1 H, H-3 Col.), 0.66-2.04 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.95 (d, 3H, J = 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.887 (d, 3H, J = 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.882 (d, 3H, J = 6.8, colestaniolo-CH₃), 0.85 (s, 3H, colestaniolo-CH₃), 0.70 (s, 3H, colestaniolo-CH₃).

35 Ejemplo 10. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido de 3-azidopropilo (41)

40 BF₃ Et₂O (115 mg, 810 μL) se agregó a una solución de peracetato de pentasacárido 40²⁸ (500 mg, 324 μL) y 3-azidopropan-1-ol (98 mg, 972 μL) en DCE anh. (8 mL). La solución fue agitada a una temperatura de 60°C en un frasco sellado durante 2 horas, antes de que una porción adicional de BF₃ Et₂O (115 mg, 810 μL) se agregara y la solución fue calentada durante 3 horas adicionales. La solución fue enfriada a temperatura ambiente y vertida en una mezcla de hielo triturado, NaHCO₃ (sat. Aq.) y salmuera. La mezcla fue extraída con EtOAc y la capa orgánica fue lavada de manera adicional con 1:1 salmuera:NaHCO₃ (sat. Aq.), y posteriormente secada (Na₂SO₄), evaporada y codestilada con Tolueno anh. DCM Anh. (5 mL), anhídrido acético (66 mg, 649 μL), Et₃N (89 mg, 875 μL) y DMAP (cristal) fueron agregados y la solución fue almacenada a una temperatura de -20°C durante la noche. La solución fue aplicada directamente a una columna de cromatografía flash preparada (17 x 2 cm de gel de sílice, elución gradiente 60:40 a 75:25 EtOAc:Hx) para proporcionar el glucósido 41 (387 mg, 75%) como un aceite. ESMS: 1601.81, [M+NH₄]⁺. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 5.30-5.13 (m, 8H), 5.02-4.88 (m, 8H), 4.28-3.75 (m, 20H), 3.49 (dt, 1H, J = 9.8, 6.1, OCH₂CH₂B), 3.42-3.35 (m, 2H, CH₂N₃), 2.16, 2.14(9), 2.14(7), 2.11, 2.10, 2.09(2), 2.08(8), 2.08(7), 2.08, 2.07, 2.06, 2.05, 2.04, 2.00, 1.99, 1.95 (16s, 16x3H, AcOx16), 1.89-1.84 (m, 2H, CCH₂C). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ: 170.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.9, 169.8(2), 169.7(7), 169.6, 169.5, 169.4, 169.3, 169.2, 99.1(2), 99.1(0), 98.8(4), 98.7(7), 98.1, 76.7, 75.0, 74.9, 74.7, 71.0, 70.8, 70.7, 70.0, 69.5, 69.3, 69.2, 68.5, 68.2, 67.2, 66.7, 66.6, 66.0, 65.4, 64.6, 62.4, 62.3, 61.9, 61.5, 47.9, 28.5, 20.7(4), 20.7(2), 20.6(9), 20.6, 20.4(9), 20.4(6), 20.4.

55 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (42)

60 La azida 41 (460.5 mg, 291 μL) fue disuelta en THF (10 mL). Trifenilfosfina enlazada a un polímero (725 mg) fue agregada y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó agua (200 μL), y la mezcla fue agitada a una temperatura de 50°C durante 4 horas. La mezcla fue enfriada, filtrada, y el solvente evaporado para proporcionar un sólido color blanco (APCIMS: 1558.25 [M+H]⁺). El producto fue disuelto en DCM (10 mL). Cloruro de estearoilo (2 equivalentes, 580 μL, 176 mg, 196 μL) fue agregado, seguido por trietilamina (2 equiv, 580 μL, 80 μL), y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 6 horas. El solvente fue evaporado, y al residuo fue añadido DCM, antes de ser lavado con NaHCO₃ (sat.), secado (Na₂SO₄), y el solvente fue evaporado. El producto crudo fue purificado

por cromatografía de columna (SiO₂: DCM → 2% MeOH/DCM) para producir la amida 42 como un aceite transparente (232 mg, 44%, dos pasos). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 6.10 (ancho m, 1H, NH), 5.24-5.09 (m, 8H), 4.96-4.83 (m, 8H), 4.22-3.71 (m, 19H), 3.68 (m, 1H, CH₂O), 3.40 (m, 1H, CH₂O), 3.26 (m, 2H, CH₂NH), 2.12-2.09 (m, 2H, CH₂CO), 2.11 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 6H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 12H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 6H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.94 (s, 3H, OAc), 1.90 (s, 3H, OAc), 1.74 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1.53 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.23-1.16 (m, 28H, CH₂), 0.79 (t, 3H, CH₃).

α-D-Manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (43)

La amida 42 (231.5 mg) fue desacetilada de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar el poliol 43 (140 mg, 96%) como un sólido color blanco que se hizo reaccionar sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (44)

El poliol 43 (140 mg, 122 μL) fue disuelto en DMF (0.02 M, 6.1 mL). Se agregó SO₃.piridina (3 equiv/OH, 5.83 mmol, 928 mg) y la solución fue agitada a una temperatura de 60°C durante la noche. La mezcla fue enfriada en un baño de agua fría y se agregaron 5M NaOH (2.1 equiv/SO₃.piridina, 2.45 mL) de una vez antes de que el solvente fuera evaporado. Al compuesto se añadió 1% MeOH en agua y se purificó sobre un cartucho C18 SPE. El compuesto fue posteriormente dializado por dos noches utilizando un cartucho de diálisis MWCO, antes de que fuera liofilizado para producir el producto 44 (220 mg, 65%) como un sólido color blanco. ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 5.55 (d, 1H, H-1), 5.53 (d, 1H, H-1), 5.50 (d, 1H, J₁₂ = 1.8, H-1), 5.49 (d, 1H, H-1), 5.28 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.90-4.12 (m, 28H), 3.85 (ddd, 1H, J = 6.2, J = 7.0, J = 10.5, CH₂O), 3.68 (ddd, 1H, J = 6.2, J = 6.2, J = 9.7, CH₂O), 3.31 (m, 2H, CH₂N), 2.29 (t, 2H, J = 7.0, CH₂CO), 1.88 (t, 2H, J = 6.2, CH₂CH₂N), 1.62 (m, 2H, CH₂CH₂CO), 1.31 (m, 28H, CH₂), 0.90 (t, 3H, J = 7.0, CH₃).

Ejemplo 11. 3β-(Prop-2-iniloxi)colestanol

3β-colestanol (1.23 g, 3.16 mmol) fue disuelto completamente en tolueno anhidrido (7 mL, 0.45 M) a temperatura ambiente. Se añadió t-butoxido de potasio en polvo (1.06g, 9.49 mmol, 3 eq) de una vez. La mezcla se agitó a TA durante 3 horas. Se añadió una solución de bromuro de propargilo (80 p% en tolueno, 0.94g, 6.32 mmol, 2 eq). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla fue diluida con hexano (30 mL) y EtOAc (10 mL), lavada con agua (2 x 60 mL) y salmuera (60 mL). La fase acuosa fue extraída una vez con EtOAc (20 mL). Las fases orgánicas combinadas fueron secadas (Na₂SO₄), filtradas y el filtrado fue evaporado en gel de sílice y purificado por cromatografía de columna (gel de sílice 2.5 x 24 cm, elución gradiente con hexano 250 mL, hexano EtOAc 125:5) para producir el producto como un sólido color amarillo. La recristalización de EtOAc (3 mL) proporcionó cristales blanquecinos (736 mg, 55%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.18 (d, 2H, J = 2.2), 3.45 (m, 1H), 2.38 (t, 1H, J = 2.2), 1.99-0.57 (m, 31H), 0.89 (d, 3H, J = 6.6), 0.86 (d, 3H, J = 6.6), 0.86 (d, 3H, J = 6.6), 0.79 (s, 3H), 0.64 (s, 3H).

2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido de 3-azidopropilo (45)

El peracetato 35 (1000 mg, 1.03 mmol) y 3-azidopropanol (1.2 eq., 124 mg, 1.24 mmol) fue disuelto en DCM seco (5 mL) y posteriormente a una temperatura de 0°C BF₃-esterato (5 eq., 0.546 mL, 5.17 mmol) fue agregado en forma de gotas y la mezcla fue agitada durante 3 horas a una temperatura de 60°C. La reacción fue detenida agregando Et₃N (2.2 mL, 15.5 mmol) a una temperatura de 0°C. La mezcla de reacción cruda fue posteriormente acetilada agregando piridina (1 mL), DMAP (cat.) y Ac₂O (0.585 mL) a una temperatura de 0°C y la agitación continuó o/n a temperatura ambiente. La solución color rojo oscuro se desactivó agregando MeOH seco (5mL) a 0°C y se agitó durante 2 horas a TA. Posteriormente a la coevaporación con tolueno (50 mL), el residuo fue disuelto en EtOAc (100 mL), lavado con solución NaHCO₃ sat. (3 x 20 mL), agua (50 mL), la fase acuosa fue reextraída con EtOAc (3 x 20 mL), combinada con el otro extracto orgánico, lavada con salmuera (20 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada al vacío para producir el glucósido crudo como una goma (~ 1 g). El producto crudo fue purificado en una columna de gel de sílice (20 x 2 cm, tolueno – EtOAc, 2:1→1:1→1:2) y el glucósido deseado 45 fue obtenido como una espuma color blanquecino (374 mg, 36%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.19-5.38 (m, 6H, 3 x H₄, H₂¹¹, ID'-ID¹¹¹), 5.08 (dd 1H, J_{H₂-H₃} = 3.3, H₂¹¹¹), 5.04 (d, 1H, J_{m-H₂} = 1.7, H¹¹¹), 4.94 (m, 2H, H¹, H-I¹¹), 4.31 (dd, 1H, J_{H_{6a}-H_{6b}} = 12.5, J_{H₆-H₅} = 4.2, H_{6a}), 3.93-4.26 (m, 9H, 2 x H_{6a}, 3 x H_{6b}, H₂¹, H₃¹¹, HS'.HS¹¹ o H₅¹¹¹), 3.93 (ddd, 1H, H₅¹¹ o H₅¹¹¹), 3.82 (dt, 1H, J_{gem} = 10.0, J = 6.6, OCH₂), 3.53 (dt, 1H, J = 6.6, OCH₂), 3.43 (t, 2H, J = 6.6, CH₂N₃), 2.20, 2.161, 2.157, 2.12, 2.11, 2.10, 2.19, 2.05, 2.04, 2.00 (s, 30H, 10 x Ac), 1.90 (quintete, 2H, J = 6.6, CH₂).

2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-acetil-α-D-manopiranosido de 3-{4-(colestano-3β-il-oximetil)-[1,2,3]triazol-1-il}propilo (46)

3β-(Prop-2-iniloxi)colestanol (156 mg, 2 eq., 0.367 mmol) y la azida 45 (185 mg, 0.183 mmol) fueron disueltos en una mezcla de DCM / t-BuOH (3 : 2, p/p, 0.4 M, 0.562 mL). A la mezcla se le agregaron una solución acuosa de CuSO₄ (0.3 M, 0.1 eq., 0.061 mL) y una solución acuosa de ascorbato de sodio (1 M, 0.3 eq., 0.055 mL) y la mezcla fue agitada

vigorosamente sin luz durante 48 horas. El análisis TLC (tolueno : EtOAc, 1:1) mostró la finalización de la reacción con la aparición de un producto más polar que la azida inicial. La mezcla fue diluida con DCM (50 mL) y lavada con solución NaHCO₃ sat. (3 X 30 MI). La fase acuosa fue reextraída con EtOAc (3 x 20 mL), los extractos orgánicos fueron combinados, lavados con salmuera (20 mL), secados (Na₂SO₄) y concentrados al vacío para producir el producto crudo como una espuma color amarilla (475 mg). El producto crudo fue purificado en una columna de gel de sílice (25 x 2.5 cm, tolueno – EtOAc, 1:2 → 1:3 → 1:4) para producir el triazol 46 como una espuma blanca (214 mg, 81%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.76 (s, IH₅=CH), 5.18-5.36 (m, 6H, 3xH4, H2¹¹, IB¹-ID¹¹¹), 5.06 (dd IH, J_{H2-H3} = 3.2, H2^m), 5.02 (d, IH, J_{H1-H2} = 1.7, HI¹¹¹), 4.94 (d, 2H, J_{H1-H2} = 1.6, H-I¹¹), 4.92 (d, IH, J_{H1-H2} = 1.6, HI¹), 4.71 (s, 2H, OCH₂), 4.49 (t, 2H, J= 6.6, CH₂N), 4.30 (dd, IH, J_{H6a-H6b} = -11.9, J_{H6-H5} = 4.0, H6a), 3.96-4.26 (m, 9H, 2 x H6a, 3 x H6b, H2¹, H3¹¹, H5¹, H5¹¹ o H5¹¹¹), 3.92 (ddd, IH, H5¹¹ o H5¹¹¹), 3.43 (m, 2H, OCH₂, H-3 Choi), 2.31 (m, 2H, CH₂), 2.19, 2.145, 2.142, 2.11, 2.09, 2.08, 2.06, 2.04, 1.99 (s, 3OH, 10 x Ac), 1.90 (quintete, 2H, J= 6.6, CH₂), 0.56-2.04 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.89 (d, 3H, J= 6.8, colestaniil-CH₃), 0.858 (d, 3H, J= 6.8, colestaniil-CH₃), 0.855 (d, 3H, J= 6.8, colestaniil-CH₃), 0.79 (s, 3H, colestaniil-CH₃), 0.64 (s, 3H, colestaniil-CH₃).

15 α-D-Manopiranosil-(1→3)-α-D-manopiranosil-(1→2)-α-D-manopiranosido de 3-{4-(colestaniil-3β-il-oximetil)-[1,2,3]triazol-1-il}propilo (47)

El peracetato seco 46 (202 mg, 0.141 mmol) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para producir el poliol 47 como un sólido cristalino blanco (138 mg, 97%), utilizado sin una purificación o caracterización adicional en el siguiente paso.

20 2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3-{4-(colestaniil-3β-il-oximetil)-[1,2,3]triazol-1-il}propilo (48)

El poliol seco 47 (50 mg, 0.49 mmol) fue disuelto en DMF seco (2.45 mL, 0.02 M) y se agregó un complejo de SO₃.piridina recién lavado y secado (234 mg, 3 eq por grupo de OH, 1.47 mmol) y la mezcla fue agitada durante 16 horas a una temperatura de 60°C. La mezcla de reacción fue enfriada a una temperatura de 0°C durante 15 minutos, posteriormente neutralizada agregando solución NaOH acuosa helada (5M, 2.1 eq/SO₃, 0.617 mL, 3.09 mmol) a una temperatura de 0°C en una porción (hasta pH 12). La suspensión fue agitada durante 15 minutos a una temperatura de 0°C, diluida con agua (10 mL) y coevaporada con agua (3 x 20 mL) al vacío a una temperatura de 40°C. El sólido amarillo fue disuelto en agua (9 mL, → pH10.5), posteriormente la solución fue establecida en un pH 12 agregando una solución acuosa de NaOH (5 M, 5 gotas) y dializada contra agua (4 L) durante 16 horas a temperatura ambiente utilizando cassette Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 4-12 mL). La diálisis continuó a una temperatura de 0°C contra agua (4 L) durante 2 días, en donde después de cada 24 horas una solución acuosa NH₄HCO₃ (3 M, 0.6 mL) fue agregada al agua cambiada (4 L) para establecer el pH a 6-6.5. La solución desalada fue posteriormente liofilizada para producir el producto 48 como un polvo esponjoso blanco (94 mg, 94%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 8.08 (s, IH, =CH), 5.50 (m, 2 H, H2¹¹, H2¹¹¹), 5.22, 5(m, 1 H, HI¹¹ o HI¹¹¹), 5.07 (m, IH, HI¹), 4.33-4.93 (m, 19 H, HI¹¹ o HI¹¹¹, 3 x H3, 3 x H4, 3 x H4, CH₂N, 4 H6, H2, OCH₂), 4.15 (m, 4 H, 2 x H6, 2 x H-5), 4.02 (m, IH, H-5), 3.83 (m, IH, OCH₂), 3.71 (m, IH, OCH₂), 3.51 (m, IH, H-3 Col.), 2.28 (m, 2H, CH₂), 0.62-2.06 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.94 (d, 3H, J= 5.8, colestaniil-CH₃), 0.86 (d, 9H, J= 6.7, colestaniil-CH₃), 0.70 (s, 3H, colestaniil-CH₃).

40 Ejemplo 12. 3-O-Alil-2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosido de bencilo (49)

Se disolvió tricloroacetimidato³⁴ de 3-O-alil-2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosilo (0.504 g, 0.744 mmol, 1.05 eq) y 2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosido de bencilo (0.413 g, 0.709 mmol) en DCM anhidro (6.4 mL, 0.11 M). Se agregó MS 3Å en polvo (70 mg recién activado). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 30 minutos. Una solución de TMSOTf (26 µL, 0.142 mmol, 0.2 eq) en DCM (0.6 mL) fue agregada en forma de gotas (concentración final: 1M). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C mientras que la reacción fue monitoreada por TLC (hexano-EtOAc = 65:35). Después de 60 minutos, la conversión fue completada y se agregó Et₃N (0.15 mL). La mezcla cruda fue tratada con piridina (0.115 mL, 1.418 mmol, 2 eq) y cloruro de benzoilo (0.124 mL, 1.064 mmol, 1.5 eq). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente o/n y filtrada. El sólido fue lavado con DCM (6 x 1 mL). Los lavados y el filtrado combinados fueron evaporados en gel de sílice y purificados por cromatografía de columna (gel de sílice 2.5 x 24 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 200:20, 210:40, 200:50, 180:60, 170:85) para proporcionar el producto puro 49 como una goma color amarillo pálido (0.738 g, 95%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.20-8.06 (m, 8H, Ph), 7.90-7.80 (m, 4H, Ph), 7.67-7.23 (m, 23H, Ph), 5.98 (dd o t, IH, J_{H3(l)-H4(l)}} = 9.8, J_{H4(l)-H5(l)}} (D = 9.8, H4¹) > 5.75 (dd o t, IH, J_{H3(l)-H4(l)}} = 9.8, J_{H4(l)-H5(l)}} = 9.8, H4¹¹), 5.41 (m, IH, alil-2'), 5.23 (d, IH, J= 2.0), 5.18-5.15 (m, 2H), 4.87-4.71 (m, 3H), 4.64-4.56 (m, 4H), 4.48 (dd o t, IH, J= 12.7, J= 4.9), 4.34-4.27 (M, 2H), 4.22 (dd, IH, J= 12.7, J= 3.9), 3.87 (dd, IH, J= 9.8, J= 2.9), 3.74 (dd, IH, J= 12.7, J= 5.9), 3.59 (dd, IH, J= 12.7, J= 5.9).

60 2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosido de bencilo (50)

Una solución de éter de alilo 49 (688 mg, 0.627 mmol) en MeOH (6 mL) y 1,2-dicloroetano (6 mL) (0.05 M) fue tratada con cloruro de paladio sólido (25 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de 70°C (baño de aceite externo) durante 2 horas. El TLC indicó la conversión completa. La mezcla fue evaporada en sílice y purificada por cromatografía de columna (sílice 2.7 x 17 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 200:20, 200:40, 200:50, 210:70, 200:100) para proporcionar el alcohol 50 como una goma incolora (0.539 mg, 81%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.18-8.03 (m, 8H, Ph), 7.85-7.81 (m, 4H, Ph), 7.68-7.25 (m, 23H, Ph), 5.97 (dd o t, IH, J_{H3(l)-H4(l)}} = 9.8, J_{H4(l)-H5(l)}} = 9.8, H4¹), 5.68 (dd, IH,

$J_{H1(ii)-H2(i)} = 2.0$, $J_{H2(i)-H3(i)} = 2.9$, $H2^{11}$), 5.60 (dd o t, IH, $J_{H3(ii)-H4(ii)} = 9.8$, $J_{H4(ii)-H5(ii)} = 9.8$, $H4^{11}$), 5.28 (s a, IH, $H1^{11}$), 5.15 (d, IH, $J_{H1(ii)-H2(ii)} = 2.0$, $H1^{11}$), 5.05 (dd, IH, $J_{H1(ii)-H2(ii)} = 2.0$, $J_{H2(ii)-H3(ii)} = 2.9$, $H2^{11}$), 4.77 (d, IH, $J_{gem} = 11.7$, CH_2), 4.65-4.56 (m, 4H, CH_2 , $H6^{1eq}$, $H3^{11}$ y $H6^{11}$), 4.44 (dd, IH, $J_{gem} = 12.7$, $J_{H5(i)-H6(i)ax} = 4.9$, $H6^{1ax}$), 4.34 (m, IH, $H5^{11}$), 4.32 (dd, IH, $J_{gem} = 10.7$, $J_{H5(ii)-HC(ii)} = 2.9$, $H6^{11}$), 4.28 (ddd, IH, $J_{H5(i)-H6(i)eq} = 4.9$, $J_{H5(i)-H6(i)eq} = 2.9$, $H5^{11}$), 4.17 (dd, IH, $H3^{11}$).

5

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosido de bencilo (51)

10

Una solución de alcohol 50 (242 mg, 0.401 mmol) y tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil (357 mg, 0.481 mmol, 1.2 eq) en DCM anhidro (7.5 mL) fue agitada con tamices moleculares en forma de polvo 3Å (50 mg) a una temperatura de 0°C durante 1 hora. Una solución de TMSOTf (15 μ L, 0.0802 mmol, 0.2 eq) en DCM (0.5 mL) fue agregada en forma de gotas a través de una jeringa. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 2 horas y el TLC indicó la conversión completa. Se agregó Et_3N (100 μ L). Se agregaron piridina (65 μ L, 0.802 mmol) y cloruro de benzoilo (47 μ L, 0.401 mmol). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente o/n y evaporada en gel de sílice. La purificación por cromatografía de columna (sílice 2.5 x 17 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 210:30, 200:50, 180:60, 160:80 y 150:100) proporcionó el trisacárido 51 como una goma incolora (392 mg, 60%). 1H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.19-7.89 (m, 16H, Ph), 7.68-7.63 (m, 4H, Ph), 7.61-7.15 (m, 35H, Ph), 6.00 (dd o t, IH, $J_{H3-H4} = 10.7$, $J_{H4-H5} = 9.8$, H4), 5.98 (dd o t, IH, $J_{H3-H4} = 9.8$, $J = 9.8$, H4), 5.92 (dd o t, IH, $J = 10.7$, $J = 9.8$, H4), 5.72 (dd, IH, $J_{H1-H2} = 2.0$, $J_{H2-H3} = 3.9$, H2), 5.56 (dd, IH, $J_{H2-H3} = 2.9$, H3), 5.33 (d, IH, $J = 2.0$, H1), 5.26 (dd, IH, $J = 2.0$, H2), 5.19 (d, IH, $J = 2.0$, $J = 3.9$, H2), 5.16 (d, IH, $J = 2.0$, H1), 4.90 (d, IH, H1), 4.78 y 4.62 (AB quartete, 2H, $J_{gem} = 11.7$, CH_2), 4.65-4.56 (m, 3H), 4.45 (dd, IH, $J_{gem} = 12.7$, $J_{H5-H6} = 3.9$, H6), 4.35 (dd, IH, H3), 4.34-4.28 (m, 2H), 4.24 (dd, IH, $J = 12.7$, $J_{H5-H6} = 2.9$, H6), 4.10 (dt o dm, IH, H5), 4.01 (dd, IH, $J = 12.7$, H6), 3.95 (dd, 1H, $J_{H5-H6} = 2.0$, H6).

15

20

25

2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosida (52)

30

El glucósido de bencilo 51 (385 mg, 0.235 mmol) fue disuelto en MeOH (5 mL) y cloroformo (5 mL). Paladio y carbón vegetal (5%, 538 mg) fueron agregado. La mezcla fue agitada bajo hidrógeno a 100 psi durante 3 días. El TLC indicó una conversión completa. La mezcla fue filtrada a través de un lecho de Celito y lavada con EtOAc (5 x 1 mL). Los lavados y el filtrado combinados fueron evaporados a sequedad, co-evaporados con DCM (3 mL) para proporcionar hemiacetal 52 como una espuma amarilla pálida (338 mg, 93%), utilizada sin una purificación o caracterización adicional en el siguiente paso.

35

Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosilo (53)

40

El hemiacetal 52 (330 mg, 0.214 mmol) fue disuelto en DCM anhidro (1.1 mL, 0.2 M). A una solución se le agregó tricloroacetimidato (43 μ L, 0.427 mmol, 2 eq). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C mientras que una solución de DBU (1.6 μ L, 0.05 eq, 0.0107 mmol) en DCM anhidro (0.15 mL) fue agregada. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 4 horas y TLC (hexano-EtOAc = 65:35) indicó la conversión completa. El producto crudo fue evaporado en gel de sílice y purificado por cromatografía de columna de sílice (2 x 14 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 200:20, 150:30, 120:30, 150:50 y hexano-EtOAc- Et_3N 140:70:0.3) para proporcionar el tricloroacetimidato 53 como una espuma blanca (261 mg, 72%) la cual fue utilizada directamente sin una caracterización adicional.

45

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanoil (54)

50

A una solución del tricloroacetimidato 53 (128 mg, 0.0757 mmol) y 3 β -colestanol (59 mg, 0.151 mmol, 2 eq) en DCM anhidro (2 mL) se le agregó tamices moleculares en polvo recién activados 3Å (50 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 0.5 h y una solución de TMSOTf (2.7 μ L, 0.0151 mmol, 0.2 eq) en DCM anhidro (0.15 mL) fue agregado en forma de gotas a una temperatura de 0°C. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 2 horas y TLC indicó la finalización de la reacción. Se agregó Et_3N (150 μ L). La mezcla fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna de sílice (2 x 14 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 180:20, 150:30, 120:30, 120:40 y 120:60) para proporcionar el glicosido 54 como una goma incolora (74 mg, 51%). 1H RMN ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 8.21-7.15 (m, 5OH, Bz), 6.00 (dd o t, IH, $J_{H3(ii)-H4(ii)} = 10.0$, $J_{H4(ii)-H5(ii)} = 10.0$, $H4^{11}$), 5.93 (dd o t, IH, $J_{H3-H4} = 10.0$, $J_{H4-H5} = 10.0$, $H4^{11}$ y $H4^{111}$), 5.61 (dd, IH, $J_{H2H2(i)-H3(i)} = 3.0$, $J_{H1(ii)-H2(ii)} = 1.5$, $H2^{11}$), 5.57 (dd, IH, $J_{H3(iii)-H4(iii)} = 10.0$, $J_{H2(iii)-H3(iii)} = 3.0$, H3), 5.36 (d, IH, $J_{H1(ii)-H2(ii)} = 1.5$, H1), 5.26 (dd, IH, $J_{H2(ii)-H3(ii)} = 3.0$, $H2^{11}$), 5.21 (m, 2H, $H1^{11}$ y $H2^{111}$), 4.91 (s, IH, $H1^{111}$), 4.68-3.90 (m, 11H), 3.62 (m, IH, OCH-col), 1.99-0.50 (m, 31H, colestanoil), 0.90 (d, 3H, $J = 6.9$, colestanoil- CH_3), 0.87 (d, 3H, $J = 6.9$, colestanoil- CH_3), 0.86 (d, 3H, $J = 6.9$, colestanoil- CH_3), 0.80 (s, 3H, colestanoil- CH_3), 0.65 (s, 3H, colestanoil- CH_3).

60

3 β -Colestanoil α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosida (55)

65

El glucósido 54 (70 mg, 0.0365 mmol) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar el poliol 55 como un polvo amarillo pálido, utilizado directamente en el siguiente paso.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-

2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3'-colestanilo (56)

El polvo descrito anteriormente (55) fue disuelto en DMF anhidro (1.8 mL, 0.02 M). Se agregó complejo de SO₃.piridina (174 mg, 1.096 mmol, 3 eq por hidroxilo, recién lavado con agua, tolueno, EtOH, DCM y secado sobre P₂O₅ en un desecador de vacío durante 1 hora). La mezcla fue agitada a una temperatura de 60°C o/n (18 h) y enfriada hasta una temperatura de 0°C. Se agregó 5 M NaOH hasta que el pH fuera de > 10. Se agregó EtOH (6 mL) y la mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 20 minutos. El precipitado fue aislado por centrifugación y evaporado a sequedad en un evaporador rotatorio. El residuo fue redisoluto en agua (1.5 mL). La solución fue cargada en un cassette de diálisis Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 0.5-3.0 mL de capacidad). El matraz fue lavado con agua (2 x 0.5 mL) y los lavados también fueron cargados en el cassette. La diálisis fue llevada a cabo en 10 L de agua purificada a temperatura ambiente durante 4 horas. El agua fue cambiada (10 L) y la diálisis fue continuada a una temperatura de 0°C o/n. El agua fue cambiada (4 L) y la diálisis continuó por otro día más. La solución ligeramente amarilla fue removida y liofilizada para proporcionar el persulfato 56 como un polvo ligeramente anaranjado (46.8 mg). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz) δ 5.28 (s, IH), 5.21 (s, IH), 5.16 (s, IH), 5.05 (s, a, IH), 4.76 (s, a, IH), 4.67-3.88 (m, 16H), 3.53 (m, IH, OCH), 1.82-0.44 (m, 3 IH, colestanil), 0.74 (d, 3H, colestanil-CH₃), 0.67 (d, 6H, colestanil-CH₃), 0.65 (s, 3H, colestanil-CH₃), 0.49 (s, 3H, colestanil-CH₃).

Ejemplo 13. 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosido de 3-azidopropilo (57)

A una solución de tricloroacetimidato 53 (128 mg, 0.0757 mmol) y 3-azidopropanol (15 mg, 0.151 mmol, 2 eq) en DCM anhidro (2 mL) se le agregó tamices moleculares en forma de polvo recién activados 3Å (50 mg). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 0.5 horas y una solución de TMSOTf (2.7 μ L, 0.0151 mmol, 0.2 eq) en DCM anhidro (0.15 mL) fue agregada en forma de gotas a una temperatura de 0°C. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 2 horas y el TLC indicó la finalización de la reacción. Se agregó Et₃N (150 μ L). La mezcla fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna de sílice (2 x 14 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 150:20, 150:30, 120:30, 120:40, 120:60 y 120:80) para proporcionar el glucósido 57 como una goma incolora (86 mg, 70%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.22-7.16 (m, 50H, Bz), 6.02 (dd o t, IH, J_{H3(ii)-H4(ii)} = 10.0, J_{H4(ii)-H5(ii)} = 9.5, H4¹¹), 6.00 (dd o t, IH, J_{H3(i)-H4(i)} = 10.0, J_{H4(i)-H5(i)} = 9.5, H4¹), 5.96 (dd o t, IH, J_{H3(iii)-H4(iii)} = 10.0, J_{H4(iii)-H5(iii)} = 9.5, H4¹¹¹), 5.69 (dd, IH, J_{H2(i),H3(i)} = 3.2, J_{H1(ii)-H2(ii)} = 1.6, H2¹), 5.59 (dd, IH, J_{H3(iii)-H4(iii)} = 10.3, J_{H2(iii)-H3(iii)} = 3.2, H3¹¹¹), 5.37 (d, IH, J_{H1(ii)-H2(ii)} = 2.4, H1¹¹), 5.29 (dd, IH, J_{H1(iii)-H2(iii)} = 1.6, J_{H2(iii)-H3(iii)} = 2.4, H2¹¹¹), 5.23 (dd, IH, J_{H1(iii)-H2(iii)} = 1.6, H2¹¹¹), 5.09 (d, IH, J_{H1(i)-H2(i)} = 1.6, H1¹), 4.94 (d, IH, J_{H1(ii)-H2(ii)} = 1.6, H1¹¹), 4.71 (dd, IH, J_{gem} = 11.9, J = 2.4, H6), 4.60 (dd, IH, J = 11.9, J = 2.4, H6), 4.58 (dd, IH, H3¹), 4.50 (dd, IH, J = 4.8, H6), 4.38 (dd, IH, J_{H2(ii)-H3(ii)} = 3.2, H3¹¹), 4.34-4.22 (m, 3H), 4.14-3.94 (m, 3H), 3.91 (dt, IH, J_{gem} = 9.5, J = 6.4, J = 6.4, OCH₂), 3.59 (dt, IH, J = 6.4, J = 6.4, OCH₂), 3.44 (t, 2H, J = 6.4, NCH₂), 1.91 (quintete, 2H, J = 6.4, CH₂).

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-benzoil- α -D-manopiranosido de 3-{4-colestano-3 β -il-oximetil}-[1,2,3]triazol-1-il}propilo (58)

A una mezcla de 57 (81 mg, 0.0497 mol), 3 β -(prop-2-iniloxi)colestanol (43 mg, 0.0994 mmol, 2 eq) en DCM (64 μ L) y t-butanol (60 μ L) (0.4 M) se agregó una solución de CuSO₄ (0.3 M en agua, 33 μ L, 0.00994 mmol, 0.2 eq) y una solución de ascorbato de sodio (1M en agua, 20 μ L, 0.0199 mmol, 0.4 eq). La mezcla fue agitada vigorosamente a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna de sílice (2 x 14 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 170:20, 150:30, 120:30, 120:40, 120:60, 120:80 y 100:100) para proporcionar el triazolo 58 como una goma incolora (74 mg, 72%). ¹H RMN (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.19-7.88 (m, 16H, Bz), 7.69-7.15 (m, 35H, Bz y triazolo-CH), 5.99 (dd o t, IH, J_{H3-H4} = 9.9, J_{H4-H5} = 9.9, H4), 5.98 (dd o t, IH, J = 9.9, J = 9.9, H4), 5.94 (dd o t, IH, H4), 5.66 (dd, IH, J_{H2(i)-H3(i)} = 3.1, J_{H1(i)-H2(i)} = 1-6, H2¹), 5.57 (dd, IH, J_{H3(iii)-H4(iii)} = 10.0, J_{H2(iii)-H3(iii)} = 3.1, H3¹¹¹), 5.36 (d, IH, J_{H1(ii)-H2(ii)} = 1.6, H1¹¹), 5.28 (dd, IH, J_{H2(ii)-H3(ii)} = 3.1, H2¹¹), 5.21 (dd, IH, J_{H1(iii)-H2(iii)} = 1.6, H2¹¹¹), 5.04 (d, IH, H1¹), 4.94 (d, IH, H1¹¹), 4.70 (s, 2H, OCH₂), 4.70-3.92 (m, 11H), 3.84 (dt o ddd, IH, J_{gem} = 9.9, J = 6.3, J = 6.3, OCH₂), 3.50 (dt o ddd, IH, J = 5.5, J = 5.5, OCH₂), 3.37 (m, IH, OCH-chol), 2.26 (m, 2H, CH₂), 1.99-0.53 (m, 3 IH, colestanil), 0.90 (d, 3H, J = 6.8, colestanil-CH₃), 0.87 (d, 3H, J = 6.8, colestanil-CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 6.8, colestanil-CH₃), 0.76 (s, 3H, colestanil-CH₃), 0.64 (s, 3H, colestanil-CH₃).

 α -D-Manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosido de 3-{4-colestano-3 β -il-oximetil}-[1,2,3]triazol-1-il}propilo (59)

El perbenzoato 58 (70 mg, 0.0341 mmol) fue disuelto en THF anhidro (2 mL) en MeOH (2 mL.) La mezcla fue tratada con una solución de 11 M NaOMe en MeOH (0.2 mL, 2.2 mmol). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 2 días, la suspensión blanca fue neutralizada mediante la adición de resina AG50WX8 (forma H⁺). La solución transparente fue separada de la resina por filtración. La resina fue lavada con MeOH (3 x 2 mL). Los lavados y el filtrado combinados fueron evaporados a sequedad y fueron secados en un desecador de vacío bajo P₂O₅ o/n para proporcionar el poliol 59, utilizado directamente en el siguiente paso.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3-{4-colestano-3 β -il-oximetil}-[1,2,3]triazol-1-il}propilo (60)
El poliol 59 fue disuelto en DMF anhidro (1.7 mL, 0.02 M). Se agregó el complejo de SO₃.piridina (163 mg, 1.023 mmol,

3 eq por hidroxilo, recién lavado con agua, tolueno, EtOH, DCM y secado bajo P₂O₅ en un desecador de vacío durante 1 hora). La mezcla fue agitada a una temperatura de 60°C o/n (19 h) y enfriada a una temperatura de 0°C. Se agregó 5 M NaOH hasta que el pH fue de >10. Se agregó EtOH (6 mL) y la mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 20 minutos. El precipitado fue aislado por centrifugación y fue lavado con EtOH (1 mL) y redisolto en agua (1.5 mL). La solución color naranja fue cargada en un SPE C18 Waters® (200 mg, preacondicionado por elución de gravedad con MeOH, MeOH-H₂O 50:50, 10:90, 5:95 y 1:99, 3 mL cada uno) y eluido con MeOH-H₂O (1:99). Las fracciones de producto fueron cargadas en un cassette de diálisis Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 0.5-3.0 mL de capacidad). La diálisis fue llevada a cabo en 10 L de agua purificada a temperatura ambiente durante 1 día. El agua fue cambiada (10 L) y la diálisis fue continuada a una temperatura de 0°C durante otro día. La solución ligeramente amarilla fue removida y liofilizada para proporcionar el persulfato 60 como un polvo ligeramente amarillo (43 mg, 62%). ¹H RMN (D₂O, 300 MHz) δ 7.92 (s, 1H, triazolol), 5.27 (d, 1H, J= 1.8), 5.20 (d, 1H, J= 1.4), 5.04 (m, 1H), 4.89 (s a, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.65-3.28 (m, 23H), 2.07 (m, 2H, CH₂), 1.83-0.45 (m, 31H, colestaniol), 0.73 (d, 3H, J= 6.4, CH₃), 0.66 (d, 6H, J= 6.4, 2xCH₃), 0.63 (s, 3H, CH₃), 0.49 (s, 3H, CH₃).

15 Ejemplo 14. 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→3)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-1,2,3,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranososa (61)

20 Maltotetraosa seca (502 mg, 0.753 mmol) y DMAP (cat.) fueron disueltas en piridina seca (10 mL) posteriormente a una temperatura de 0°C una solución de Ac₂O (2.8 g) en piridina (5 mL) fue agregada en forma de gotas a una temperatura de 0°C, agitada durante 4 horas a una temperatura de 0°C y dejada durante 48 horas a una temperatura de -20 °C. La reacción no fue completada, por lo tanto el Ac₂O adicional (1 g, mmol) fue agregado a una temperatura de 0°C y después de 16 h a temperatura ambiente, la reacción fue desactivada agregando MeOH seco (10 mL) a una temperatura de 0°C y la agitación continuó durante 2 h a temperatura ambiente. La solución fue co-evaporada con tolueno (3 x 30 mL) para proporcionar el peracetato 61³⁵ como un sólido color blanco (920 mg, 97%).

25 Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→3)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosilo (62)

30 A una solución de etilendiamina (1.66 mmol, 0.11 mL) en THF seco (15 mL), se le agregó ácido acético glacial (0.90 mmol, 0.053 mL) en forma de gotas a una temperatura de 0°C resultando en una formación inmediata de un precipitado, el cual permanece presente hasta el desarrollo acuoso. El peracetato 61 (900 mg, 0.717 mmol) fue agregado a una temperatura de 0°C y la mezcla fue agitada durante 2 horas a temperatura ambiente. El TLC (tolueno / EtOAc, 1:2) posteriormente mostró la ausencia del material de partida y la presencia de un producto que se movía más lentamente, el cual aparece en su mayoría como una mezcla anomérica. La solución fue neutralizada agregando ácido acético (0.15 mL) en forma de gotas para alcanzar un pH de 6. El solvente fue soplado con una corriente de aire, el residuo fue disuelto en EtOAc (100 mL), lavado con solución de NaHCO₃ sat. (3 x 50 mL), agua (3 x 10 mL), salmuera (30 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada al vacío para proporcionar el hemiacetal como una espuma color amarilla (830 mg). El hemiacetal seco (830 mg, 0.648 mmol) fue disuelto en DCM seco (5 mL), K₂CO₃ (1.20 g, 8.60 mmol) y tricloroacetoniitrilo (0.849 mL, 8.40 mmol) fue agregado a una temperatura de 0°C y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 40 2 horas. La mezcla fue purificada en una columna de gel de sílice (20 x 1.5 cm, tolueno – EtOAc, 1:2 → EtOAc, conteniendo 0.2% (v/v) Et₃N) y el tricloroacetimidato 62³⁵ deseado fue obtenido como un polvo esponjoso blanco (795 mg, 86%). El compuesto fue secado sobre P₂O₅ durante la noche y almacenado a una temperatura de 20°C.

45 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido de colestaniol (63)

50 El tricloroacetimidato 62 (300 mg, 0.221 mmol), colestanol (2 eq, 172 mg, 0.442 mmol) y 3 tamices moleculares 3Å (100 mg) fueron agitados en DCM seco (1.5 mL) durante 0.5 horas. Una solución de TMS-triflato en DCM seco (0.5 eq., 0.4 M, 0.275 mL, 0.11 mmol), fue agregada en forma de gotas a una temperatura de 0°C. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, otra porción de TMS-triflato en DCM seco (0.36 eq., 0.4 M, 0.2 mL, 0.08 mmol) fue agregada y la agitación continuó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción fue desactivada agregando Et₃N (0.025 mL) a una temperatura de 0°C durante 10 minutos, filtrada a través de un lecho de celito (0.5 cm), lavada con DCM (5 x 25 mL) y EtOAc (3 x 25 mL). Ambas fases orgánicas fueron lavadas separadamente con solución NaHCO₃ sat. (3 X 25 mL) y salmuera (25 mL). Los extractos acuosos fueron combinados y reextraídos con EtOAc (3 x 30 mL), lavados con salmuera (30 mL), combinados con otros extractos orgánicos, secados (Na₂SO₄) y concentrados al vacío para producir la espuma color amarilla cruda (480 mg). El producto fue purificado en una columna de gel de sílice (30 x 5 cm, tolueno: EtOAc 3:2 → 1:1→1:2→ EtOAc, con 0.2 % Et₃N (v/v)). La purificación resultó en el glucósido β-enlazado 63 deseado en la fracción A como una espuma color blanca (81 mg, 23%) y fracción B con 77% de glucósido α-enlazado desacetilado y 23% de glucósido β-enlazado parcialmente desacetilado (118 mg). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.24-5.45 (m, 7H, 3 x H₁, 4 x H₃), 5.08 (t, 3H, J_{H₃-H₄} = J_{H₄-H₅} 9.80, H₄¹¹¹¹) 4.86 (dd, 1H, J_{H₁-H₂} = 4.1, - 41 -J_{H₂-H₃} = 10.4, H₂¹¹¹¹), 4.70-4.80 (m, 3H, 3 x H₂), 4.63 (d, 1H, J_{H₁-H₂} = 7.7, H₁¹), 4.33-4.54 (m, 4H, 4 x H₆), 3.86-4.31 (m, 10 H, 3 x H₄, 3 x H₅, 4 x H₆), 3.70 (ddd, 1H, H₅¹), 3.56 (m, 1H, colestanoil-H₃), 2.20, 2.19, 2.16, 2.11, 2.07, 2.04, 2.03, 2.02, 2.015, 2.010, 2.00, 1.99 (s, 39H, 13 x Ac), 0.55-2.00 (m, 33H, 12 CH₂, 9 CH), 0.90 (d, 3H, J= 6.6, colestanoil-CH₃), 0.871 (d, 3H, J= 6.6, colestanoil-CH₃), 0.867 (d, 3H, J= 6.6, colestanoil-CH₃), 0.78 (s, 3H, colestanoil-CH₃), 0.65 (s, 3H, colestanoil-CH₃).

65 α-D-Glucopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosido de 3β-colestaniol

(64)

El peracetato 63 (75 mg, 0.047 mmol) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para producir el poliol 64 como un sólido color blanco (48 mg, 98%), utilizado sin una purificación adicional o caracterización en el siguiente paso.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoil (65)

El poliol 64 (48 mg, 0.046 mmol) fue disuelto en DMF seco (2.3 mL, 0.02 M) y se agregó el complejo de SO₃.piridina recién lavado y secado (285 mg, 3 eq por grupo OH, 1.79 mmol) y la mezcla fue agitada durante 16 horas a una temperatura de 60°C. La mezcla de reacción fue enfriada a una temperatura de 0°C durante 10 minutos, posteriormente neutralizada agregando una solución NaOH acuosa helada (5 M, 2.1 eq/SO₃, 0.725 mL, 3.76 mmol) a una temperatura de 0°C en una porción (hasta un pH 12). La suspensión fue agitada durante 15 minutos a una temperatura de 0°C, diluida con agua (10 mL) y concentrada al vacío a una temperatura de 40°C. Se produjo un polvo color amarillo pálido, el cual fue disuelto en agua (10 mL) obteniendo una solución con pH 11.5. La solución fue establecida a un pH 12.5 agregando una solución acuosa de NaOH (5 M, 5 gotas) y dializada contra agua (4 L) utilizando un cassette Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 4-12 mL) durante 16 horas a temperatura ambiente. La diálisis contra agua (4 L) fue continuada a una temperatura de 0°C durante 3 días, en donde el agua fue cambiada cada 24 horas, así como una solución acuosa NH₄HCO₃ (3M, 0.6 mL) fue agregada al agua para establecer un pH de ~6.0-6.5. La solución desalada fue posteriormente liofilizada para producir el persulfato 65 como un polvo esponjoso blanco (97 mg, 89%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 5.72 (d, 1 H, J_{H1-H2} = 3.3, IH), 5.69 (d, 1 H, J_{H1-H2} = 3.6, HI), 5.59 (d, IH, J_{H1-H2} = 3.6, HI), 5.10 (d, IH, J_{H1-H2} = 4.8, HI¹), 4.19-5.02 (m, 23H, 4 x H2, 4 x H3, 4 x H-4, 3 x H5, 8 x H6), 4.14 (m, IH, H5¹), 3.85 (m, 1 H, H-3 Col.), 0.63-2.06 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.95 - 42 -(d, 3H, J= 6.5, colestanoil-CH₃), 0.885 (d, 3H, J= 6.6, colestanoil-CH₃), 0.882 (d, 3H, J= 6.6, colestanoil-CH₃), 0.85 (s, 3H, colestanoil-CH₃), 0.70 (s, 3H, colestanoil-CH₃).

Ejemplo 15. 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosil (66)

El jarabe G4 (1.8 g, liofilizado, que contenía ~ 72% Maltotetraosa (p/p), ~1.94 mmol), y DMAP (75 mg) fue disuelto en piridina seca (36 mL) y a una temperatura de 0°C una solución de cloruro de benzoilo (94.7 mmol, 11 mL) en piridina (8 mL) fue agregada en forma de gotas y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla fue desactivada agregando MeOH (50 mL) a una temperatura de 0°C y se continuó agitando durante 2 horas. La mezcla fue co-evaporada con tolueno (3 x 50 mL) para producir un jarabe amarillo. El jarabe fue suspendido en EtOAc (150 mL), lavado con solución de bicarbonato de sodio sat. (5 x 50 mL), HCl acuoso (5%, 5 x 50 mL), y agua (5 x 50 mL). La fase acuosa fue reextraída con EtOAc (2 x 50 mL), combinada con el extracto orgánico principal, lavada con salmuera (50 mL), secada (Na₂SO₄), filtrada y concentrada al vacío. Para remover la mayoría de las impurezas aromáticas, el jarabe fue lavado con n-hexano hirviendo (5 x 50 mL), sonicado y secado en vacío elevado o/n para producir una mezcla de maltooligosacáridos perbenzoilados como una espuma ligeramente beige (6.0 g). El residuo fue disuelto en un volumen mínimo de una mezcla de tolueno / etilacetato (15:1, 25 mL) a una temperatura de 50°C y aplicado en una columna de gel de sílice (21 x 5.5 cm, preconditionada con tolueno) eluyendo con un gradiente de tolueno / etilacetato 15:1, volúmenes de ~ 1 columna) a 10:1 (volúmenes de 1:5 columna) a 5:1 (volúmenes de 1:5 columna). Las fracciones fueron controladas en TLC por UV y manchado químico y fracciones puras de perbenzoato de maltotetraosa fueron combinados, concentrados al vacío y secados en un vacío elevado para producir el producto puro 66 como una espuma color blanca (3.04 g, 76%, basándose en 72% de maltotetraosa en un jarabe seco). ¹H-RMN muestra la presencia de la mezcla anomérica (α ; β = 1 : 1) y la benzoilación completa de todos grupos OH (pureza > 95 %). ¹H RMN (400MHz, CDCl₃): β -anómero: 8.26-7.09 (m, 65H, 13 x Bz), 6.33 (d, IH, J_{1(II)-2(I)}} = 7.5, HI¹), 6.19 (dd o t, IH, J_{2(IV)-3(IV)}} = 10.2, J_{3(IV)-4(IV)}} = 10.2, H3^{IV}), 6.07 (dd, IH, J_{2(II)-3(II)}} = 10.2, J_{3(II)-4(II)}} = 8.9, H3^{II}), 5.96 (dd, IH, J_{2(III)-3(III)}} = 10.2, J_{3(III)-4(III)}} = 8.2, H3^{III}), 5.83 (d, IH, J_{1(IV)-2(IV)}} = 4.1, H1^{IV}), 5.82 (dd o t, IH, J_{2(II)-3(II)}} = 6.8, J_{3(II)-4(II)}} = 8.2, H3^{II}), 5.76 (dd o t, IH, J_{4(IV)-5(IV)}} = 9.6, H4^{IV}), 5.71 (d, IH, J_{1(II)-2(II)}} = 4.1, HI^{II}), 5.69 (d, IH, J_{1(III)-2(III)}} = 4.1, HI^{III}), 5.65 (dd, IH, H2^I), 5.34 (dd, IH, H2^V), 5.20 (dd, IH, H2^{VI}), 5.14 (dd, IH, H2^{III}), 5.03-4.22 (m, 15H, 3 x H4 a 4.70, 4.52 y 4.40 ppm, respectivamente, y 4 x H5 y 8 x H6). Nota: - 43 - Las asignaciones para anillos de azúcar II y III fueron ambiguas, α -anómero: 6.84 (d, IH, J_{1(II)-2(II)}} = 3.6, HI¹), 5.46 (dd, IH, J_{1(II)-2(II)}} = 10.2, J_{2(II)-3(II)}} = 3.6, H2^I).

Azida de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosilo (67)

El perbenzoato 66 (500 mg, 0.235 mmol) fue disuelto en DCM seco (2 mL) posteriormente a una temperatura de 0°C, una solución de 30% HBr de ácido acético (0.5 mL) fue agregada y agitada bajo Ar durante 2 horas. La reacción fue desactivada vertiendo la solución en DCM y agua-hielo (100 mL), la fase orgánica fue lavada con agua-hielo (3 x 50 mL), solución-NaHCO₃ sat. (3 x 3 mL), salmuera (25 mL), secada (Na₂SO₄) y concentrada al vacío a temperatura ambiente para producir bromuro crudo. El bromuro crudo fue disuelto en cloroformo (2 mL), posteriormente NaN₃ (130 mg, 2 mmol), bromuro de tetrabutilamonio (129 mg, 0.4 mmol), y finalmente solución NaHCO₃ sat. (3.5 mL) fueron agregados y agitados vigorosamente a temperatura ambiente durante 24 horas. El solvente fue soplado con una corriente de aire. El residuo fue posteriormente disuelto en EtOAc (10 mL), lavado con agua (3 x 50 mL), solución

NaHCO₃ sat. (4 x 25 mL). La fase acuosa fue reextraída con EtOAc (2 x 50 mL), los extractos orgánicos fueron combinados, lavados con salmuera (2 x 25 mL), secados (Na₂SO₄) y concentrados al vacío. La glicosil-azida 67 fue obtenida como una espuma color amarilla (466 mg, 97%), utilizada sin una purificación adicional en el siguiente paso. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.03-8.24 (m, 65 H, 13 x Bz), 6.10 (dd, IH, J_{H2-H3} = 10.4, J_{H3-H4} 9.9, H3^{III}), 5.99 (dd, IH, J_{H2-H3} = 10.1, J_{H3-H4} 8.7, H3^{III}), 5.84 (dd, IH, J_{H2-H3} = 9.9, J_{H2-H3} = 8.2, H3^{II}), 5.75 (d, IH, J_{H1-H2} = 3.9, H1^{III}), 5.67 (m, 2H, H3, H4^{III}), 5.63 (d, IH, J_{H1-H2} = 4.1, H1^{III}), 5.58 (d, IH, J_{H1-H2} = 3.9, H1^{II}), 5.26 (dd, IH, J_{H1-H2} = 4.1, J_{H2-H3} = 10.4, H2^{III}), 5.20 (dd, IH, J_{H1-H2} = 8.4, J_{H2-H3} = 9.2, H2), 5.10 (dd, IH, J_{H2-H3} = 10.1, H2^{III}), 5.04 (dd, IH, H2^{II}), 4.98 (dd, IH, J_{H6b-H5} = 2.1, J_{H6b-H6a} = -12.0, H6b), 4.88 (d, IH, J_{H1-H2} = 8.4, H1), 4.82 (dd, IH, J_{H6b-H5} = 1.7, J_{H6b-H6a} = -12.0, H6b), 4.67-4.76 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.53-4.63 (m, 2H, H-6a, H-6b), 4.30-4.47 (m, 7H, 3 x H4, 2 x H6, 2 x H5), 4.10-4.21 (m, 2H, 2 x H5).

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosido de 4-(colestan-3β-il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (68)

3β-(Prop-2-iniloxi)colestanol (84 mg, 2eq., 0.196 mmol) y la azida 67 (200 mg, 0.098 mmol) fueron disueltos en la mezcla de DCM / t-BuOH (3:2, p/p, 0.21 M, 0.200 mL). Una solución acuosa de CuSO₄ (0.3 M, 0.1 eq., 0.033 mL) y una solución acuosa de ascorbato de sodio (1 M, 0.3 eq., 0.029 mL) fueron agregadas y la mezcla fue agitada vigorosamente sin luz durante 48 horas. Los análisis de TLC (tolueno: EtOAc, 1:1) mostraron la finalización de la reacción con la aparición de un producto más polar que la azida de partida. La mezcla fue diluida con DCM (100 mL), lavada con una solución NaHCO₃ sat. (3 X 50 mL). La fase acuosa fue reextraída con DCM (3 X 20 mL), los extractos orgánicos fueron combinados, lavados con salmuera (50 mL), secados (Na₂SO₄) y concentrados al vacío para proporcionar el producto crudo como una espuma color amarilla (279 mg). El producto crudo fue purificado en una columna de gel de sílice (30 x 5 cm, tolueno – EtOAc, 7:1 → 5:1 → 3:1) para proporcionar el triazolo 68 como una espuma ligeramente amarilla (153 mg, 63%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.05-8.24 (m, 65 H, 13 x Bz), 6.14 (d, IH, J_{H1-H2} = 8.9, H1^I), 6.11 (dd, IH, J_{H2-H3} = 10.6, J_{H3-H4} 9.8, H3^{III}), 6.00 (dd, IH, J_{H2-H3} = 10.1, J_{H3-H4} = 8.6, H3^{III}), 5.86 (m, 2H, H3^I, H1^{III}), 5.76 (d, IH, J_{H1-H2} = 3.8, H1^{III}), 5.64- 5.71 (m, 3H, H1^{III}, H2^I, H4^{III}), 5.63 (d, IH, J_{H1-H2} = 3.8, H1^{II}), 5.26 (dd, IH, H2^{III}), 5.12 (dd, IH, J_{H1-H2} = 3.8, H2^{III}), 5.08 (dd, IH, J_{H2-H3} = 9.8, H2^{II}), 4.98 (dd, IH, J_{H6b-H5} = 1.7, J_{H6b-H6a} = -12.5, H6b), 4.87 (dd, IH, H6b), 4.69-4.77 (m, 2H, H6a, H6b), 4.53-4.66 (m, 4H, 2 x H6, OCH₂, H4^I), 4.29-4.50 (m, 7H, 2 x H4, 2H6, 3 x H-5), 4.18 (m, IH, H5), 4.10-4.21 (m, 2H, 2 x H5), 3.26 (m, IH, H-3 Choi), 0.52-2.00 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.90 (d, 3H, J = 6.5, colestanil-CH₃), 0.869 (d, 3H, J = 6.7, colestanil-CH₃), 0.864 (d, 3H, J = 6.6, colestanil-CH₃), 0.77 (s, 3H, colestanil-CH₃), 0.65 (s, 3H, colestanil-CH₃).

α-D-Glucopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-1-deoxi-β-D-glucopiranosido de 4-(colestan-3β-il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (69)

El perbenzoato 68 (95 mg, 0.038 mmol) fue disuelto en la mezcla de MeOH /THF (4:1 (p/p), 7.5 mL) posteriormente a una temperatura de 0°C, una solución de NaOMe en MeOH (11 M, 0.040 mL) fue agregada y la agitación continuó a temperatura ambiente. Tras 16 horas, aún había compuestos parcialmente benzoilados (TLC: MeOH: EtOAc, 3:1), de modo que se agregó más NaOMe en MeOH (11 M, 0.040 mL) y la agitación continuó durante otras 3 horas. La solución fue neutralizada agregando una resina de intercambio de catión fuertemente ácida (BioRad AG-X8, H⁺) para ajustar el pH a 7, antes la solución fue filtrada, lavada con MeOH (5 X 20 mL) y concentrada al vacío. El residuo fue purificado en una columna de gel de sílice (15 x 1 cm, EtOAc, → MeOH – EtOAc, 3:1 → MeOH, con 0.2% Et₃N) para producir el polioliol 69 como un sólido color blanco (47 mg, 100 %).

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-1-deoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-β-D-glucopiranosido de 4-(colestan-3β-il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (70)

El polioliol 69 (45 mg, 0.040 mmol) fue disuelto en DMF seco (2 mL, 0.02 M) y el complejo de piridina SO₃ recién lavado y seco (428 mg, 3 ep por grupo OH, 1.56 mmol) fue agregado y la mezcla fue agitada durante 16 horas a una temperatura de 60°C. La mezcla de reacción fue enfriada a una temperatura de 0°C durante 10 minutos, posteriormente neutralizada agregando una solución de NaOH acuosa helada (5 M, 2.1 eq/SO₃, 0.656 mL, 3.28 mmol) a una temperatura de 0°C en una porción (a pH 12). La suspensión fue agitada durante 15 minutos a una temperatura de 0°C, diluida con agua (20 mL) y concentrada al vacío a una temperatura de 40°C. El sólido fue disuelto en agua (11 mL) obteniendo una solución con un pH 10.5. La solución fue establecida a un pH 12 agregando una solución acuosa de NaOH (5M, 5 gotas) y dializada contra agua (4 L) utilizando un cassette Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 4.12 mL) durante 16 horas a temperatura ambiente. La diálisis fue continuada a una temperatura de 0°C contra agua (4 L) durante 3 días, en donde el agua (4 L) fue cambiada cada 24 horas así como una solución acuosa NH₄HCO₃ (3 M, 0.6 mL) fue agregada al agua para establecer un pH~6.0-6.5. La solución desalada fue posteriormente liofilizada para producir el persulfato 70 como un polvo esponjoso blanco (80 mg, 82%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 8.31 (s, IH, =CH), 6.25 (d, 1 H, J_{H1-H2} = 6.9, IH, H1^I), 5.70 (m, 2 H, 2 x HI), 5.65 (d, IH, J_{H1-H2} = 3.6, HI), 4.72-5.03 (m, 1 IH, 4 x H2, 4x H3, H4^{III}, OCH₂), 4.13-4.69 (m, 15 H, 3 x H4, 4 x H5, 8 x H6), 3.58 (m, 1 H, H-3 Col.), 0.63-2.05 (m, 33 H, 12 CH₂, 9 CH), 0.95 (d, 3H, J = 6.3, colestanil-CH₃), 0.87 (d, 6H, 2 x colestanil-CH₃), 0.84 (s, 3H, colestanil-CH₃), 0.70 (s, 3H, colestanil-CH₃).

Ejemplo 16. Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosilo (72)

Al peracetato de maltotriosa (71)³⁶ (200 mg, 207 μL) se le añadió DCM (1 mL) y 33% HBr/HOAc (0.7 mL) a una

temperatura de 0°C. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante cuatro horas. La solución fue diluida con DCM y lavada con agua-hielo (x2), NaHCO₃ (sat) (x2) y salmuera (x1), antes de ser secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado para producir el bromuro 72 como un sólido blanco el cual se hizo reaccionar sin una purificación adicional o caracterización.

5

Azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosilo (73)

10

El bromuro 72 (~200 mg) fue agregado en una mezcla de EtOAc (5 mL) y NaHCO₃ (sat.) (5 mL). Se agregó NaN₃ (500 mg), seguido por Bu₄NBr (cat.). La mezcla fue agitada vigorosamente durante la noche a temperatura ambiente. La solución fue diluida con EtOAc y lavada con NaHCO₃ (sat.) (x2) y salmuera (x1), antes de ser secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado para producir la azida 73 como un sólido color blanco (198.9 mg, 100%, dos pasos) el cual se hizo reaccionar sin una purificación adicional o caracterización.

15

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil-1-deoxi- β -D-glucopiranosido de 4-(coleston-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (74)

20

La azida 73 (200 mg, 211 μ L), 3-(prop-2-iniloxi)colestonol (3 equiv., 267 mg), CHCl₃ (2 mL), t-BuOH (2 mL), CuSO₄ (50 μ L de un solución acuosa de 0.3 M) y ascorbato de sodio (62.5 μ L de 1M solución acuosa) fueron agitados vigorosamente durante la noche a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado y el residuo purificado por cromatografía de columna (SiO₂:Hexano a 2:3 Hexano:EtOAc) para producir el triazol 74 (197 mg, 68%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (s, 1H, triazol-H), 5.85 (d, 1H, J_{1,2} = 9.3, H-1^I), 5.46-5.27 (m, 6H, H-1^{II}, H-1^{III}, H-2^I, H-4^{III}, H-3^{II}, H-3^{III}), 5.03 (dd, 1H, J_{3,2} = 9.8, J_{3,4} = 9.8, H-3^I), 4.82 (dd, 1H, J_{2,1} = 4.1, J_{2,3} = 10.3, H-2), 4.72 (dd, 1H, H-2), 4.63 (s, 2H, CH₂O), 4.47-4.41 (m, 2H), 4.32-3.88 (m, 9H), 3.31 (m, 1H, CHO), 2.12 (s, 6H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.96 (s, 3H, OAc), 1.96-0.83 (m, 31H), 1.82 (s, 3H, OAc), 0.85 (d, 3H, J = 6.7, CH₃), 0.82 (m, 6H, CH₃), 0.76 (s, 3H, CH₃), 0.60 (s, 3H, CH₃).

25

α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 4) - α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-deoxi - β -D-glucopiranosido de 4-(coleston-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (75)

30

El peracetato 74 (197.2 mg) fue desacetilado de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar el poliol 75 como un sólido blanco (131 mg, 96%) el cual se hizo reaccionar sin una purificación adicional o caracterización.

35

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-deoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(coleston-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (76)

40

El poliol 75 (131.2 mg, 137 mmol) fue disuelto en DMF (0.02M, 6.9 mL). Se agregó SO₃.piridina (3 equiv. por grupo hidroxilo, 4.12 mmol, 655 mg) y la solución fue agitada durante la noche a una temperatura de 60°C. La solución fue enfriada en agua-hielo antes de que fuera neutralizada con 5 M NaOH (2:1 equiv./SO₃.piridina, 1.73 mL). El solvente fue evaporado y el producto crudo fue purificado en un cartucho C18 SPE (cartuchos 2 X 1g) seguido por diálisis (48 h, cartuchos 2000 MWCO). La solución color blanquecina fue secada por congelación para producir el persulfato 76 como un sólido color blanquecino (156 mg, 58%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 8.32 (s, 1H, triazol-H), 6.22 (d, 1H, J_{1,2} = 7.5, H-1^I), 5.69 (d, 1H, J_{1,2} = 3.4, H-1), 5.63 (d, 1H, H-1), 5.04-4.17 (m, 18H), 3.58 (m, 1H, CHO), 2.03-0.85 (m, 31H), 0.95 (d, 3H, J = 6.2, CH₃), 0.88 (d, 6H, CH₃), 0.85 (s, 3H, CH₃), 0.71 (s, 3H, CH₃).

45

Ejemplo 17. 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosido de 3 β -colestonilo (77)

50

Se disolvió tricloroacetimidato 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-manopiranosida (0.372 g, 0.502 mmol) y 3 β -colestonol (0.390 g, 1.004 mmol, 2 eq) en DCM anhidro (5 mL, 0.1 M). Se agregó MS 3Å en forma de polvo (120 mg recién activado). La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C durante 30 minutos. Una solución de TMSOTf (0.018 mL, 0.100 mmol, 0.2 eq) en DCM (0.3 mL) fue agregada en forma de gotas a través de una jeringa. La mezcla fue agitada a una temperatura de 0°C mientras la reacción fue monitoreada por TLC (hexano-EtOAc = 83:17). Después de 1,5 horas, la conversión fue completada y Et₃N (0.2 mL) fue agregado. La mezcla cruda fue filtrada y el sólido fue lavado con DCM (5 x 1.5 mL). El filtrado y los lavados combinados fueron evaporados en gel de sílice y purificados por cromatografía de columna (gel de sílice 2.5 x 22 cm, elución gradiente con hexano-EtOAc 200:20, 210:30, 400:80) para proporcionar el glucósido 77 como una espuma incolora (368 mg, 76%).

55

α -D-Manopiranosido de 3 β -colestonilo (78)

60

La espuma descrita anteriormente incolora (358 mg, 0.370 mg) fue disuelta en THF anhidro (5 mL) y MeOH (3 mL) y una solución de 11 M NaOMe en MeOH (0.4 mL) fue agregada. Se formó un precipitado blanco inmediatamente. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente o/n. más THF (3 mL) fue agregado y la suspensión espesa fue agitada a temperatura ambiente por otro día. La mezcla fue neutralizada por la adición de la resina AG50WX8 (forma H⁺) resultando en que la suspensión se convirtiera en una solución transparente. La resina fue removida por filtración y lavada con MeOH (4 x 1.5 mL). El filtrado y los lavados combinados se convirtieron en un gel dentro de 5 minutos (semitransparente). La mezcla fue evaporada a un volumen pequeño y cristalizada a partir de EtOH (10 mL). La mezcla

65

entera se convirtió en un gel a temperatura ambiente, la cual fue filtrada y prensada para escurrir el líquido. El residuo fue lavado con EtOH (1.5 mL), secado con aire, y secado bajo P₂O₅ bajo vacío o/n para proporcionar tetrol 78 como un polvo blanco (131 mg). El filtrado proporcionó un precipitado y fue calentado a reflujo. La solución transparente resultante fue evaporada en gel de sílice y purificada por cromatografía de columna de sílice (3 x 8 cm, elución gradiente con CHCl₃ 200 mL y MeOH-CHCl₃ 20:200, 20:160, 30:150). Las fracciones del producto fueron juntadas, evaporadas y secadas sobre P₂O₅ bajo vacío durante 3 días para proporcionar una segunda cosecha del producto como un polvo color blanco (79 mg). ¹H RMN (DMSO-d₆, 300 MHz) δ 4.73 (d, 1H, J= 1.5, HI), 4.64 (d, intercambiable con D₂O, 1H, J= 4.6, OH), 4.61 (d a, intercambiable con D₂O, 1H, J= 4.1, OH), 4.48 (d, intercambiable con D₂O, 1H, J= 5.7, OH), 4.37 (t, intercambiable con D₂O, 1H, J= 6.0, OH), 3.62 (dd, 1H, J= 10.3, 5.7), 3.56-3.29 (m, 6H, azúcar 5 x H y H3 para el colestaniil), 1.95-0.56 (m, 46H, colestaniil).

Sal de tetrasodio de 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato-α-D-manopiranosido de 3β-colestaniilo (79)

El tetrol 78 (102.8 mg, 0.187 mmol) fue disuelto en DMF anhidro (4.67 mL, 0.04 M). Se agregó el complejo SO₃.piridina (357 mg, 2.244 mmol, 3 eq por hidroxilo, recién lavado con agua, tolueno, EtOH, DCM y secado bajo P₂O₅ en un disecador de vacío durante 1 hora). La mezcla fue agitada a una temperatura de 60°C durante 18 horas y enfriada a una temperatura de 0°C. Se agregó 5M NaOH (3 x 0.45 mL). El color de la mezcla (pH > 10) se tornó a amarillo-naranja. La mezcla fue evaporada a sequedad. El residuo (polvo amarillo pálido) fue disuelto en 4 mL de agua (pH > 10) y purificado por el carucho SPE-C18 (800 mg, precondicionado eluyendo con MeCN, MeCM-agua 1:1, 1:9, 1:99, 4 mL cada uno). Después de la carga, el SPE fue eluido con un derrochador (12 mL), 1% MeCN en agua (4.04 mL), 5% (4.2 mL), 10% (4.4 mL), 20% (4.8 mL), 30% (5.2 mL), 40% (5.6 mL), 50% (6 mL), 60% (4.8 mL) y 70% (5,1 mL). Las fracciones fueron verificadas mediante MBT, análisis de Char, CE y posteriormente fueron juntadas y liofilizadas. Una pequeña cantidad del producto 79 (25 mg de polvo color café) fue obtenido de 1%~5% MeCN-agua. La mayoría del producto fue eluido con 10%, 20% y 30% de MeCN en agua (polvo amarillo pálido, 120 mg, 67%). Otra pequeña cantidad de producto eluido con 40% de MeCN en agua (polvo amarillo pálido, 4 mg). ¹H RMN (D₂O, 400 MHz) δ 5.16 (s a, 1H, HI), 4.70 (s a, 1H, H2), 4.6 (superpuesto con HOD, 1H, H3), 4.35 (m a, 1H, H4), 4.22 (m a, 1H, H6), 4.14 (m a, 1H, H6), 3.96 (m a, 1H, H5), 3.54 (m a, 1H, colestaniil-H3), 1.90-0.50 (m, 46H, colestaniil).

Ejemplo 18. 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosilamina (80)

La azida 67 (201 mg, 0.098 mmol) fue disuelta en EtOAc (10 mL) y agitada con Pd-C (10%, (p/p), 100 mg) bajo una atmósfera de H₂ durante 3 horas (TLC: tolueno :EtOAc, 7:1). H₂ fue reemplazado por Ar, posteriormente la mezcla fue filtrada a través de celite (prelavada con MeOH y EtOAc, 5 mL), lavada con EtOAc (5 x 20 mL, + sonicación) y finalmente concentrada al vacío a temperatura ambiente para obtener la amina 80 como un sólido blanco (200 mg, 100%), utilizada sin una purificación adicional o caracterización en el siguiente paso.

N-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosil)-4-((3R, 10S, 12S, 13R)-3,12-di-O-acetil-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[aj]fenantreno-17-il) pentanamida (81)

Se disolvió ácido diacetildeoxicólico³⁷ (53 mg, 0.111 mmol) y DMAP (cat.) en DCM seco (3 mL) y posteriormente a una temperatura de 0°C una solución de DCC en DCM (1 M, 1 eq, 0.111 mL) y HOBt (17 mg, 0.111 mmol) fue agregada y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos. La solución fue basificada por la adición de Et₃N (2 gotas) para establecer el pH a 8 y posteriormente a una temperatura de 0°C una solución de amina 80 (150 mg, 0.074 mmol) en una mezcla de DCM / DMF (5:1, (p/p), 2.5 mL) fue agregada y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 16 horas (pH 8). TLC (tolueno: EtOAc, 3:1) no mostró progreso, de modo que el ácido diacetildeoxicólico (53 mg, 0.111 mmol), DCC en DCM (1 M, 1 eq, 0.111 mL), HOBt (17 mg, 0.111 mmol) y Et₃N (3 gotas) fueron agregados y la agitación continuó durante 56 horas. La TLC indicó la finalización de la reacción, de modo que la solución fue filtrada a través de celite (prelavada, 2 mm) y lavada con DCM (3 x 40 mL). La solución transparente fue lavada con una solución de NaHCO₃ sat. (4 x 30 mL). La fase acuosa fue reextraída con DCM (2 x 20 mL), los extractos orgánicos fueron combinados, lavados con HCl acuoso (3%, 5 x 30 mL), una solución de NaHCO₃ sat. (20 mL), secados (NaSO₄) y concentrados al vacío. El residuo fue purificado en una columna de gel de sílice (30 x 5 cm, tolueno – EtOAc, 7:1→5:1→1:1) para producir la amida 81 como un sólido ligeramente amarillo (58 mg, 32%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.01-8.28 (m, 65 H, 13 x Bz), 6.31 (d, 1H, J_{H1-NH} = 9.3, NH), 6.10 (dd, 1H, J_{H2-H3} = J_{H3-H4} 10.1, H3^{III}), 6.00 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 10.2, J_{H3-H4} = 8.9, H3^I), 5.82 (m, 2H, H3^{II}, H3^{III}), 5.74 (d, 1H, J_{H1-H2} = 3.9, H1^{II}), 5.67 (t, 1H, H4^{III}), 5.61 (d, 1H, J_{H1-H2} = 4.0, H1^I), 5.57 (d, 1H, J_{H1-H2} = 4.0, H1^I), 5.48 (t, 1H, J_{H1-H2} = 9.4H1^I), 5.25 (dd, 1H, J_{H2-H3} = 10.6, H2^{III}), 4.99-5.15 (m, 4H, 3 x H2, H3-Desoxicólico), 4.92 (dd, 1H, J_{H6b-H5} = 1.7, J_{H6bH6a} = -12.4, H6b), 4.63-4.81 (m, 4H, 3 x H6, H12-Desoxicólico), 4.56 (dd, 1H, J_{H6b-H5} = 1.7, J_{H6bH6a} = -12.6, H6b), 4.08-4.52 (m, 10H, 3 x H4, 4 x H5, 3 H6), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 0.8-2.15 (m, 26H, 10x CH₂, 6 x CH), 0.89 (s, 3H, CH₃), 0.70 (d, 3H, J= 6.4, CH-CH₃), 0.63 (s, 3H, CH₃).

N-(α-D-glucopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-α-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-glucopiranosil)-4-((3R, 10S, 12S, 13R)-12-O-acetil-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[aj]fenantreno-17-il) pentanamida (82)

El compuesto 81 (53 mg, 0.021 mmol) fue disuelto en una mezcla de MeOH /THF (7:1 (p/p), 4 mL) posteriormente a una temperatura de 0°C una solución de NaOMe en MeOH (11 M, 0.040 mL) se agregó y la agitación continuó a

temperatura ambiente. Después de 16 horas, aún 10% de un compuesto apolar parcialmente benzoilado estaba presente (TLC: MeOH: EtOAc, 2:1) de modo que más NaOMe en MeOH (11 M, 0.050 mL) fue agregado y la agitación continuó durante 1 hora (pH 12). La solución fue neutralizada agregando una resina de intercambio de catión fuertemente ácida (BioRad AG-X8, H⁺) para ajustar el pH a 7, antes la solución fue filtrada, lavada con MeOH (3 X 30 mL, + sonicación) y concentrada al vacío. El residuo, con un olor aromático fuerte, fue purificado en una columna de gel de sílice (10 x 1 cm, EtOAc, → MeOH-EtOAc, 2:1→MeOH, con 0.2% de Et₃N) para producir el poliol 82 como un sólido color blanco (23 mg, 100%).

N-(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1→4))-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosil)-4-((3R, 10S, 12S, 13R)-3-O-sulfonato de sodio-O-acetil-10,13-dimetilhexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno-17-il) pentanamida (83)

El poliol 82 (22 mg, 0.020 mmol) fue disuelto en DMF seco (0.02 M, 1.05 mL) y complejo de SO₃.piridina recién lavado y secado (3 eq por grupo OH, 150 mg, 0.945 mmol) fue agregado y la mezcla fue agitada durante 16 horas a una temperatura de 60°C. La reacción fue desactivada agregando una solución NaOH acuosa (5M, 2.1 eq SO₃, 0.397 mL, 1.985 mmol) en una porción a 0°C (pH 12) y agitada durante 15 minutos a una temperatura de 0°C. La suspensión fue concentrada al vacío a una temperatura de 40°C para producir un polvo color amarillo. El polvo fue disuelto en agua (11 mL) (pH 11.5) y dializado contra agua (4 L) utilizando un cassette Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 4-12 mL) durante 2 horas a temperatura ambiente. La diálisis contra agua (4 L, con 0.6 mL de 3 M NH₄HCO₃ aq. pH 6) fue continuada a temperatura ambiente durante 16 horas. La diálisis fue continuada a una temperatura de 0°C durante 46 horas, en donde el agua (4 L) fue cambiada cada 24 horas así como una solución acuosa de NH₄HCO₃ (3M, 0.6 mL) fue agregada al agua para establecer el pH a ~6.0-6.5. La solución desalada fue posteriormente liofilizada para producir un polvo esponjoso blanco. El análisis de CE mostró la aparición de 3 compuestos, correspondiendo a 1 pico mayor a 5.228 min (80%) y 2 picos menores a 5.121 (5%) y 5.278 min (10%). La mezcla (~54 mg) fue purificada en una columna de HPLC C18: solvente A: 100% agua, solvente B: 100% acetonitrilo, velocidad de flujo: 10 mL/min; tamaño de fracción: 5 mL; detector: ELS; gradiente: 5% B. El producto se unió solo débilmente a la matriz C18 pero fracciones puras de 83 fueron recolectadas y analizadas por CE. La liofilización produjo persulfato 83 como un polvo esponjoso blanco (12.1 mg, 24%, 98% puro por CE). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 5.96 (d, 1H, NH), 5.79 (d, 2H, 2 x H^{III}, H^I), 5.68 (d, 1H, H^I), 5.19 (s, 1H, H³-Desoxicólico), 5.00-5.10 (m, 3H, 3 x H³), 4.67- 4.98 (m, 6H, H¹, 4 x H², H³), 4.18-4.60 (m, 16 H, 3 x H⁴, 4 x H⁵, 8 x H⁶, H¹²-Desoxicólico), 2.46 (m, 2H, OCH₂), 2.28 (s, 3H, 12-O Ac-desoxicólico), 1.08-2.13 (m, 24H, 9 x CH₂, 6 x CH), 1.05 (s, 3H, CH₃), 0.93 (d, 3H, J= 6.2, CH-CH₃), 0.88 (s, 3H, CH₃).

Bromuro de (2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosilo) (84)

Se colocó perbenzoato de maltotriosa (200 mg, 207 μ mol) en DCM (1 mL) y HBr/HOAc (0.7 mL) a una temperatura de 0°C. La mezcla se agitó a una temperatura de 0°C durante 6 horas. La solución se diluyó con DCM y se lavó con hielo-agua (x2), NaHCO₃(sat.) (x2) y salmuera (x1), antes de secarse (Na₂SO₄) y el solvente se evaporó para producir el producto sólido color blanco (cuantitativo) el cual se hizo reaccionar sin purificación adicional. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.19 (m, 2H, Ar), 8.05 (m, 2H, Ar), 7.95 (m, 2H, Ar), 7.88-7.85 (m, 4H, Ar), 7.74-7.70 (m, 4H, Ar), 7.63-7.09 (m, 36H, Ar), 6.73 (d, 1H, J_{1,2} = 3.4, H-1^I), 6.13-6.08 (m, 2H, H-3^{III}, H-3^I), 5.95 (m, 1H, H-3^{II}), 5.76 (d, 1H, J_{1,2} = 4.1, H-1^{III}), 5.67 (m, 1H, H-4^{III}), 5.65 (d, 1H, J_{1,2} = 3.4, H-1^{II}), 5.27 (dd, 1H, H-2^{III}), 5.11 (dd, 1H, H-2^{II}), 5.03 (dd, 1H, H-2^I), 4.99 (dd, 1H, H-6^I), 4.76-4.72 (m, 2H, H-6^{II}, H-6^I), 4.66-4.58 (m, 2H, H-6^{II}, H-5^I), 4.55-4.35 (m, 5H, H-4^I, H-4^{II}, H-5^{II}, H-5^{III}, H-6^{III}), 4.23 (dd, 1H, H-6^{III}).

Ejemplo 19. 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestano (85)

Se colocaron bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosilo 84 (200 mg, 124 μ mol),³⁸ tamices moleculares (~50 mg) y colestano (3 equiv., 370 μ mol, 145 mg) en DCM seco bajo Ar y se enfriaron hasta una temperatura de 0°C. Se agregó AgOTf (1.5 equiv., 187 μ mol, 48 mg), y la solución se agitó a una temperatura de 0°C durante 2 horas. Se agregó trietilamina (600 μ L) y la solución se templó a temperatura ambiente. La mezcla se pasó a través de un lecho corto de sílice (utilizando 1:1 EtOAc:Hex con 0.5% (v/v) de trietilamina como el solvente de elución). El solvente se evaporó (se mantuvo a temperatura ambiente, la temperatura del baño de agua). La mezcla resultante se colocó en DMC seco bajo DCM bajo Ar con tamices moleculares, posteriormente se enfrió a una temperatura de 0°C antes de que se agregara lentamente TMSOTf (1.24 mL de una solución 0.1 M en DCM) durante 20 minutos. La solución se agitó a una temperatura de 0°C durante 1 hora, posteriormente a temperatura ambiente con 0.5 equivalentes extra de TMSOTf agregados durante 15 minutos. Después de 30 minutos adicionales, se agregó trietilamina (1 mL) y la solución se filtró y el solvente se evaporó. El producto crudo se purificó mediante cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 35% EtO Ac/Hex) para proporcionar el glucósido puro 85 en la forma de un sólido color blanco (91 mg, 38 %). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (m, 2H, Ar), 8.06 (m, 2H, Ar), 7.96 (m, 2H, Ar), 7.88 (m, 2H, Ar), 7.82 (m, 2H, Ar), 7.72 (m, 4H, Ar), 7.57 (m, 4H, Ar), 7.52-7.09 (m, 32H, Ar), 6.10 (t, 1H, J= 9.7, H-3^{III}), 5.92 (t, 1H, H-3^{II}), 5.75 (d, 1H, J_{1,2} = 3.8, H-1^{III}), 5.71-5.64 (m, 2H, H-4^{III}, H-3^I), 5.58 (d, 1H, J_{1,2} = 3.8, H-1^{II}), 5.30-5.19 (m, 2H, H-2^{III}, H-2^I), 5.10 (dd, 1H, H-2^{II}), 4.95 (m, 1H, H-6^{II}), 4.84 (d, 1H,

$J_{1,2} = 7.7$, H-1^l), 4.77-4.61 (m, 3H, H-6^l, H-6^l, H-6^{ll}), 4.49-4.34 (m, 5H, H-6^{lll}, H-5^l, H-5^{ll}, H-4^l, H-4^{ll}), 4.25 (m, 1H, H-6^{lll}), 4.06 (m, 1H, H-5^{ll}), 3.53 (m, 1H, CHO), 1.99-0.47 (m, 31H), 0.91 (d, 3H, CH₃), 0.87 (m, 6H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃), 0.62 (s, 3H, CH₃).

5 α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestano (86)

Se colocó el glucósido 85 (91 mg, 47.5 μ mol) en 1:1 MeOH:THF y se desacetiló de acuerdo con el procedimiento general para proporcionar polioliol 86 (48 mg) en la forma de un sólido color blanco (que contiene residuos de benzoato de metilo) el cual se hizo reaccionar sin purificación o caracterización adicional.

10

2,3,4,6-Tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestano (87)

15

Se disolvió polioliol 86 (47.8 mg, 54.6 μ mol) en DMF (0.02M, 2.73 mL). Se agregó SO₃.piridina (3 equiv. por hidroxilo, 1.64 mmol, 261 mg) y la solución se agitó a una temperatura de 60°C durante la noche. La solución se enfrió en hielo-agua y se neutralizó con 5 M NaOH (700 μ L) antes de que el solvente se evaporara. El residuo se colocó en agua y se purificó en un cartucho C18 SPE utilizando MeOH/agua como la fase móvil. Las fracciones que contenían el producto se reunieron y dializaron durante 48 horas con un cartucho de diálisis 2000 MWCO antes de filtrarse utilizando un filtro de jeringa de 40 micras y se liofilizaron para proporcionar el persulfato 87 en la forma de un sólido color blanquecino (43 mg, 48% en dos pasos). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ 5.68 (d, 1H, H-1), 5.58 (d, 1H, H-1), 5.05-4.03 (m, 19H), 3.82 (m, 1H, Colestano H-3), 2.05-0.65 (m, 31H), 0.96 (d, 3H, J = 5.6, CH₃), 0.90 (d, 6H, J = 6.4, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃), 0.71 (s, 3H, CH₃).

20

Ejemplo 20. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-((1 \rightarrow 4)-1,2,3,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosido (88)

25

Se suspendió lactosa (5.0221 g, 13.88 mmol) en piridina seca (40 mL) y se agregó DMAP (50 mg). Se agregó en forma de gotas anhídrido acético (26.24 mL, 277.6 mmol) a la suspensión a una temperatura de 0°C durante 15 minutos y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se extinguió con la adición en forma de gotas de metanol anhidro a una temperatura de 0°C y la solución se agitó. El solvente se evaporó seguido de elución junto con tolueno anhidro (3 x 50 mL) y el solvente restante se redujo durante la noche bajo vacío para producir un sólido color blanco (9 g, 13.26 mmol, 95%) el cual se hizo reaccionar sin purificación o caracterización adicional.

30

Bromuro de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosilo (89)

35

Se disolvió peracetato 88 (510.3 mg, 0.75 mmol) en DCM anhidro (1.5 mL) y HBr/ácido acético (30%, 1 mL) fue agregado en forma de gotas a una temperatura de 0°C. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas posteriormente se diluyó con DCM (30 mL), se lavo con hielo-agua (2 x 40 mL), una solución de NaHCO₃ saturada enfriada con hielo (3 x 30 mL) y salmuera (2 x 30 mL). La solución se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró bajo vacío para producir el bromuro crudo. La siguiente reacción procedió inmediatamente después de la concentración.

40

Azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-((1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosilo (90)

45

Se disolvió bromuro de glucosilo crudo 89 (0.75 mmol) en CHCl₃ (4 mL) y se agregaron Bu₄NHBr (193.42 mg, 0.6 mmol), NaN₃ (195.03 mg, 3.0 mmol) y una solución NaHCO₃ saturada (7 mL). La reacción se agitó vigorosamente durante la noche a temperatura ambiente. Se redujo la reacción, se diluyó en EtOAc y se lavó con una solución NaHCO₃ saturada (3 x 30 mL) y salmuera (3 x 30 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío y se purificó mediante cromatografía flash utilizando EtOAc/Hexano (1:1) con 0.2% Et₃N para producir la azida (348 mg, 70% en 2 pasos). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.33 (dd, 1H, J_{H4',H3'} = 3.4 Hz, J_{H4',H5'} = 1.1 Hz, H-4'), 5.19 (dd, 1H, J_{H3',H4'} = 9.4 Hz, J_{H2',H3'} = 9.0 Hz, H-3'), 5.09 (dd, 1H, J_{H2',H3'} = 10.4 Hz, J_{H2',H1'} = 7.8 Hz, H-2'), 4.94 (dd, 1H, J_{H2',H3'} = 10.4 Hz, J_{H3',H4'} = 3.4 Hz, H-3'), 4.84 (dd, 1H, J_{H2',H3'} = 9.5 Hz, J_{H2',H1'} = 8.8 Hz, H-2'), 4.61 (d, 1H, J_{H2',H1'} = 8.8 Hz, H-1'), 4.49 (dd, 1H, J_{H6a,H6b} = 11.9 Hz, J_{H6a,H5'} = 2.2 Hz, H-6a), 4.46 (d, 1H, J_{H1',H2'} = 7.8 Hz, H-1'), 4.14-4.03 (m, 3H, H-6b, H-6a', H-6b'), 3.87 (dd, 1H, J_{H5',H4'} = 1.1 Hz, H-5'), 3.80 (t, 1H, J_{H4',H5'} y H_{4',H3'} = 9.4 Hz, H-4), 3.68 (ddd, 1H, J_{H6a,H5'} = 2.0 Hz, J_{H6b,H5'} = 5.0 Hz, J_{H4',H5'} = 9.9 Hz, H-5), 2.13 (s, 3H, OAc), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc).

55

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (91)

60

Se disolvieron azida seca 90 (100 mg, 0.15 mmol) y colestano 3 β -(prop-2-inilo) (129 mg, 0.302 mmol, 2eq) en DCM/t-BuOH (3:2, 0.21M). Se agregó una solución acuosa de CuSO₄ (0.3M, 0.1 eq, 0.015 mmol, 50 μ L) a la mezcla seguido de una solución acuosa de Na-ascorbato (1M, 0.3 eq, 0.045 mmol, 45.3 μ L). La reacción se cubrió de la luz y se agitó vigorosamente. La mezcla se diluyó en DCM (100 mL) y se lavó con una solución de NaHCO₃ saturada (3 x 30 mL). La fase acuosa se volvió a extraer con DCM (20 mL) y las capas orgánicas combinadas posteriormente se lavaron con salmuera (2 x 30 mL) y se secaron sobre Na₂SO₄. El solvente se evaporó al vacío para producir el producto crudo. El

65

producto en la forma de un sólido color blanco (135.3 mg, 82%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (s, 1H, CH-N), 5.79 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 9.2$, H-1), 5.43-5.37 (m, 2H, H-2, H-3), 5.35 (dd, 1H, $J_{\text{H}_3', \text{H}_4'} = 3.4$, $J_{\text{H}_4', \text{H}_5'} = 0.8$, H-4'), 5.11 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 10.4$, $J_{\text{H}_2', \text{H}_1'} = 7.8$, H-2'), 4.95 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 10.4$, $J_{\text{H}_3', \text{H}_4'} = 3.4$, H-3'), 4.64 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$), 4.50 (d, 1H, $J_{\text{H}_1', \text{H}_2'} = 7.9$, H-1'), 4.46 (dd, 1H, $J_{\text{H}_6\text{a}', \text{H}_6\text{b}'} = 12.4$, $J_{\text{H}_6\text{a}', \text{H}_5'} = 1.6$, H-6a'), 4.16-4.04 (m, 3H, H-6b', H-6a, H-6b), 3.96-3.85 (m, 3H, H-4, H-5, H-5'), 3.39-3.28 (m, 1H, H-Chol), 2.14 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.06 (s, 3H, OAc), 2.05 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 1.88-1.80 (m, 31H), 1.85 (s, 3H, OAc), 0.88-0.80 (m, 3H, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 0.85 (d, 3H, $J = 1.3$, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 0.83 (d, 3H, $J = 1.2$, $\text{CH}_3\text{-CH}$), 0.77 (s, 3H, CH_3), 0.62 (s, 3H, CH_3).

β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido de 4-(coleston-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (92)

Se disolvió N-glucósido seco 91 (100 mg, 0.092 mmol) en CH_3OH anhidro y se agregó en forma de gotas a la mezcla una solución de $\text{NaOMe}/\text{CH}_3\text{OH}$ (11M, 30 μL) a una temperatura de 0°C bajo argón. La solución se dejó en agitación durante la noche a TA. Después de monitorear mediante TLC, se agregó más CH_3OH anhidro (2 mL) y $\text{NaOMe}/\text{CH}_3\text{OH}$ (11M, 50 μL) y la mezcla de reacción se encontró con un pH de 11. Al término, la reacción fue neutralizada a un pH de 6 mediante la adición de resina de intercambio de iones Dowex H^+ , y la suspensión resultante se disolvió en $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) a una temperatura de 40°C . La solución se filtró, se concentró y secó sobre P_2O_5 para producir el producto crudo.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 4-(coleston-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo, sal de heptasodio (93)

Se agregó $\text{SO}_3\text{-Pyr}$ (124.89 mg, 0.785 mmol, 3eq/OH, lavado previamente y secado) en una parte a poliol seco 92 (29.7 mg, 0.037 mmol) en DMF anhidro (0.02M, 1.85 mL) a una temperatura de 0°C . La reacción se dejó en agitación durante la noche. La reacción se enfrió a una temperatura de 0°C y se agregó una solución enfriada de 5M NaOH (329.7 μL , 1.65 mmol, 2.1 eq de $\text{SO}_3\text{-Pyr}$) en una parte con agitación. El pH se revisó inmediatamente y se encontró únicamente ligeramente básico. Se agregó una solución adicional de NaOH 5M frío (50 μL) a la reacción y se encontró un pH de aproximadamente 13. La suspensión se agitó a una temperatura de 0°C durante 15 minutos, posteriormente se diluyó con H_2O grado HPLC (100 mL) y el solvente se evaporó lentamente. El producto se desaló C18 (WatersSepPak, 1g) mediante un gradiente de elución de H_2O grado HPLC al 100% a $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Las fracciones fueron mantenidas básicas por la agregación de 0.1 M NH_4HCO_3 , y una prueba de quemado fue llevada a cabo en todas las fracciones. Las fracciones positivas quemadas fueron analizadas por CE y las fracciones que contenían JR254_33 combinadas y separadas en una Cromatografía Líquida C18 que utiliza un gradiente de elución de 5 a 50% de ACN en H_2O durante 35 minutos. Se analizó el contenido de azúcar de todas las fracciones utilizando 10 μL de la muestra con 40 μL de una solución acuosa azul de 1,9-dimetilmetileno, las fracciones de azúcar positivas fueron analizadas por CE. Las fracciones puras fueron recolectadas y liofilizadas para obtener el producto como un polvo blanquecino (21.1 mg, 37% de rendimiento) 98% puro por CE. ^1H RMN (300 MHz, D_2O) δ : 8.29 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$ -), 6.27 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 8.1$ Hz, H-1), 5.14 (d, 1H, $J_{\text{H}_3', \text{H}_4'} = 3.0$ Hz, H-4'), 4.98 (t, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7.8$ Hz, H-2), 4.91-4.82 (m, 1H, H-3), 4.89 (d, 1H, $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 7.5$ Hz, H-1'), 4.74 (s, 2H, CH_2), 4.57 (dd, 2H, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 10.2$ Hz, $J_{\text{H}_3', \text{H}_4'} = 3.0$ Hz, H-3, H-5'), 4.46 (dd, 1H, $J_{\text{H}_2', \text{H}_3'} = 9.9$, $J_{\text{H}_1', \text{H}_2'} = 7.5$, H-2'), 4.36 (m, 5H, H-4, H-5, H-6a, H-6a', H-6b'), 4.18-4.14 (m, 1H, H-6b), 3.63-3.49 (m, 1H, Chol-H), 2.04-0.98 (m, 3 1H, Choi), 0.97-0.83 (m, 12H, CH_3), 0.70 (s, 3H, CH_3).

Ejemplo 21. Azida de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosilo (94)

Peracetato de maltosa (200 mg, 295 μmol) fue colocado en DCM (1 mL) y HBr/HOAc (0.7 mL) a 0°C . La mezcla fue agitada a 0°C durante 4 horas. La solución fue diluida con DCM y lavada con agua-hielo (x 2), NaHCO_3 (saturado) (x 2) y salmuera (x 1), antes de ser secada (Na_2SO_4) y el solvente evaporado para obtener el producto de bromuro sólido blanco el cual se colocó en una mezcla de EtOAc (5 mL) y NaHCO_3 (saturado) (5 mL). NaN_3 (2.0 g) fue agregado, seguido por $\text{BuNBr}_4(\text{cat.})$. La mezcla fue agitada de forma vigorosa durante la noche a temperatura ambiente. La solución fue diluida con EtOAc y lavada con NaHCO_3 (saturado) (x 2) y salmuera (x 1), antes de ser secada (Na_2SO_4) y el solvente evaporado para obtener el producto sin procesar el cual fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO_2 : Hexano a 50% $\text{EtOAc}/\text{Hexano}$, cargado con tolueno) para obtener 170.6 mg del producto sólido blanco (87%, dos pasos), el cual fue reaccionado sin una caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosido de 4-(coleston-3 β -il-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (95)

Azida 94 (170 mg, 257 μmol), 3 β -(prop-2-iniloxi)colestonol (2 equivalente, 219 mg), CHCl_3 (2 mL) de $t\text{-BuOH}$ (2 mL), CuSO_4 (50 μL de una solución acuosa 0.3 M) y ascorbato de sodio (62.5 μL de una solución acuosa 1M) fueron agitados de forma vigorosa durante la noche a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado y el residuo fue cargado sobre una columna de sílice (SiO_2 : Hexano a 50% de $\text{EtOAc}/\text{Hexano}$) para obtener 190 mg del material puro 95 (68%). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.67 (s, 1H, Triazol-H), 5.85 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.3$, H-1'), 5.46-5.29 (m, 4H, H-1¹¹, H-2¹, H-4¹¹, H-3¹¹), 5.04 (t, 1H, $J_{2,3} = 10.3$, $J_{3,4} = 10.3$, H-3'), 4.85 (dd, 1H, $J_{1,2} = 4.1$, $J_{2,3} = 10.8$, H-2'), 4.63 (s, 2H, CH_2), 4.45 (ddd, 1H, H-6¹), 4.25-4.19 (m, 2H, H-5¹, H-6¹¹), 4.14-3.92 (m, 4H, H-5¹¹, H-6¹, H-6¹¹, H-4¹), 3.32 (m, 1H, CHO), 2.31-0.53 (m, 31H), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.08 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 6H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.82 (s, 3H, OAc), 0.83 (d, 3H, $J = 1.0$, CH_3), 0.81 (d, 3H, $J = 1.5$, CH_3), 0.76 (s, 3H, CH_3), 0.61 (s, 3H, CH_3).

α -D-Glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3 β -iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (96)

El peracetato 95 (190 mg) se disolvió en THF/MeOH (1:1). Se añadió NaOMe en MeOH (11 M, 20 μ L) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se neutralizó con una resina H⁺, se filtró y se evaporó el disolvente para proporcionar 125 mg (90%) del producto sólido blanquecino que se hizo reaccionar sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3 β -iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo, sal de heptasodio (97)

El poliol 96 (124.5 mg, 157 μ mol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 7.84 mL). SO₃-piridina (3 equivalente/OH, 3.3 mmol, 525 mg) fue agregado y la solución agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 5M NaOH (2.1 equivalente/SO₃ piridina, 1.4 mL). La mezcla fue transferida a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporada y dializada (cartucho 2000 MWCO, Pierce) contra agua purificada (5 L, el agua se cambia cada 12 horas) durante 24 horas. La solución fue liofilizada y colocada en agua antes de ser purificada en un sistema de C18 RP-HPLC prep. (5% a 95% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de una purificación por HPLC. Fracciones con una pureza mayor al 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el producto como un sólido blanco (55 mg, 23%). ¹H RMN (300MHz, D₂O) δ : 8.25 (s, 1H, triazol), 6.20 (d, 1H, J_{1,2} = 6.0, H-1^I), 5.65 (d, 1H, H-1^{II}), 5.04-4.94 (m, 3H, H-3^I, H-3^{II}, H-2^I), 4.80 (s, 2H, CH₂), 4.73 (m, 1H, H-2^{II}), 4.58 (dd, 1H, H-4^{II}), 4.49-4.23 (m, 7H, H-4^I, H-5^I, H-5^{II}, 4 x H-6), 3.57 (m, 1H, CHO), 2.09-0.56 (m, 46H).

Ejemplo 22 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)1,2,3,6,-tetra-O-benzoil-D-glucopiranosida (98)

Maltosa (2.0 g, 5.84 mmol) fue disuelta en piridina seca (40 mL) a 0°C. DMAP (cat.) fue agregado. Cloruro de benzoilo (2.5 equivalente, 14.6 mmol, 16.4 g, 13.6 ml) fue agregado en forma de gotas y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La solución fue vertida sobre una mezcla de agua-hielo y DCM. La capa orgánica fue lavada con NaHCO₃ (saturado) (x 7), salmuera, H₂SO₄ (5%) (x 2), seguido por salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado. El producto fue pasado mediante un lecho de sílice corto para remover el cloruro de benzoilo restante y el solvente fue evaporado para obtener 3.5 g (51%) del producto sólido blanco, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)2,3,6-tri-O-benzoil-D-glucopiranosilo (99)

Perbenzoato 98 (0.5 g) fue disuelto en piridina (5 mL). Dimetilamina (3.5 mL, 5.6 M en EtOH) fue agregada. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. Tolueno (10 mL) fue agregado y la solución fue lavada con salmuera, H₂SO₄ (5%) (x 2), salmuera, NaHCO₃ (saturado) y salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente fue evaporado. El hemiacetal sin procesar fue colocado en DCM seco con tamices moleculares, carbonato de potasio (200 mg) y carbonato de cesio (70 mg). La solución fue enfriada a 0°C antes de que fuera agregado tricloroacetimidato (120 μ L). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla fue filtrada y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂:Hexano a 50% de EtOAc/Hexano) para obtener el producto como un sólido blanco (336 mg, 66% en dos pasos) el cual fue reaccionado sin una caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoil (100)

Tricloroacetimidato 99 (336.2 mg, 280 μ mol) colestanol (3 equivalente, 326 mmol) y tamices moleculares fueron colocados en DCM seco bajo Ar. La solución fue agitada durante 15 minutos antes de que TMSOTf (0.1 M solución en DCM, 0.33 equivalente, 924 μ L) fue agregado lentamente. Después de 30 minutos un equivalente adicional de TMSOTf (2.77 mL de una solución 0.1 M en DCM) fue agregado lentamente y la solución se dejó en agitación durante 40 minutos adicionales. Trietilamina (200 μ L) fue agregada y el solvente fue evaporado. El producto sin procesar fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 15% de EtOAc/Hexano) pero eluido cerca al material de partida del colestanol en exceso. Además, la mezcla fue desbenzoilada, acetilada y repurificada para proporcionar la separación adecuada. El compuesto fue colocado en MeOH/THF (1:1). 11M NaOMe en MeOH (50 μ L) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 5 horas. La solución fue neutralizada con una resina H⁺, filtrada y el solvente evaporado. El producto poliol sin procesar se colocó en piridina (5 mL) y anhídrido acético (5 mL). DMAP (cat.) fue agregado y la solución fue agitada durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla fue agregada a agua-hielo y extraída con DCM antes de ser lavada con 5% de H₂SO₄, seguido por salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado, antes de que la muestra sin procesar haya sido purificada utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 50% de EtOAc/Hexano) para obtener 118 mg del producto sólido blanco peracetilado (42%) ¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ : 5.40 (d, 1H, J_{1,2} = 4.1, H-1^I), 5.35 (dd, 1H, J_{3,2} = 10.6, J_{3,4} = 9.5, H-3^I), 5.23 (dd, 1H, J_{3,2} = 9.0, J_{3,4} = 9.0, H-3^{II}), 5.03 (dd, 1H, J_{4,3} = 10.0, J_{4,5} = 10.0, H-4^I), 4.83 (dd, 1H, J_{2,1} = 3.9, J_{2,3} = 10.3, H-2^I), 4.76 (dd, 1H, J_{2,1} = 8.0, J_{2,3} = 9.3, H-2^{II}), 4.60 (d, 1H, J_{1,2} = 8.0, H-1^{II}), 4.42 (dd, 1H, H-6^I), 4.26-4.20 (m, 2H, H-6^I, H-6^{II}), 4.04-3.92 (m, 3H, H-4^I, H-5^I, H-6^{II}), 3.64 (ddd, 1H, H-5^{II}), 3.53 (m, 1H, CHO), 2.12 (s, 3H, OAc), 2.09 (s, 3H, OAc), 2.03 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.99 (s, 3H, OAc), 1.98 (s, 3H, OAc), 1.96-0.52 (m, 31H), 0.87 (d, 3H, J = 6.4, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 1.5, CH₃), 0.83 (d, 3H, J = 1.3, CH₃), 0.76 (s, 3H, CH₃), 0.63 (s, 3H, CH₃).

α -D-Glucopiranosil-(1-4)- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoil (101)

5 Glucósido 100 (118 mg) fue disuelto en THF/MeOH (1:1). NaOMe en MeOH (11 M, 30 μ L) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución fue neutralizada con una resina H⁺, filtrada y el solvente evaporado para proporcionar un rendimiento cuantitativo de un sólido blanquecino, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo, sal de heptasodio (102)

10 Poliol 101 (99.5 mg, 140 μ mol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 7 mL). SO₃-piridina (3 equivalente/OH, 2.9 mmol, 467 mg) fue agregado y la solución fue agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 5M NaOH (2.1 equivalente/SO₃.piridina, 1.23 mL). La mezcla fue transferida a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporada y dializada (cartucho 2000 MWCO, Pierce) con agua purificada (5 L, el agua cambia cada 12 horas) durante 48 horas. La solución fue liofilizada y colocada en agua antes de ser purificada en un sistema de C18 RP-HPLC
15 prep. (5% a 95% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de la purificación por HPLC. Las fracciones con una pureza mayor a 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el compuesto como un sólido blanco (27 mg, 14%). ¹H RMN (400MHz, D₂O) δ : 5.59 (d, IH, J_{1,2} = 3.4, H-1¹¹), 5.09 (d, IH, J_{1,2} = 5.0, H-1¹), 4.89 (m, IH, H-3¹¹), 4.73 (m, IH, H-3¹), 4.61 (dd, IH, H-2¹¹), 4.53-4.42 (m, 3H, H-2¹, H-4¹¹, H-6¹¹), 4.37-4.14 (m, 6H, H-4¹, H-5¹¹, H-5¹, 3 x H-6), 3.85 (m, IH, CHO), 2.08-0.64 (m, 46H).

20 Ejemplo 23 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- β -D-glucopiranosil-(1-4)-1,2,3,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranososa (103)

25 Celobiosa (1.0 g, 2.92 mmol) fue disuelto en piridina seca (20 mL) a 0°C. DMAP (cat.) fue agregada. Cloruro de benzoilo (2.5 equivalente, 58 mmol, 6.8 mL) fue agregado en forma de gotas y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La solución fue vertida sobre una mezcla de agua-hielo y DCM. La capa orgánica fue lavada con NaHCO₃ (saturado) (x 7), salmuera, H₂SO₄ (5%) (x 2), seguido por salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado. El producto se pasó mediante un lecho de sílice corto para remover el cloruro de benzoilo restante y el solvente fue evaporado para obtener 740 mg (22%) del producto sólido blanco, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

30 Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil- β -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-d-glucopiranosilo (104)

35 Perbenzoato 103 (740 mg, 0.63 mmol) fue disuelto en piridina (5 mL). La solución fue enfriada a 0°C, antes de que dimetilamina (3.1 mL, 5.6 M en EtOH) fuese agregada. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. Tolueno (20 mL) fue agregado y la solución fue lavada con salmuera, H₂SO₄ (5%) (x 2), salmuera, NaHCO₃ (saturado) y salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente fue evaporado. El hemiacetal sin procesar fue colocado en DCM seco (5 mL) con tamices moleculares y carbonato de potasio (1.17 g). La solución fue enfriada a 0°C antes de que tricloacetronitrilo (782 μ L) fuera agregado. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla fue filtrada y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: Tolueno: EtOAc (5:1) a 100% de EtOAc) para obtener el producto como una espuma
40 blanca (566 mg, 75% durante 2 pasos) el cual fue reaccionado sin una caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- β -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo (105)

45 Tricloroacetamidato 104 (250 mg, 210 μ mol), colestanol (2 equivalente, 163 mg) y tamices moleculares fueron colocados en DCM seco bajo Ar. La solución fue agitada durante 30 minutos a 0°C antes de que TMSOTf (solución de 0.4 M DMC, 0.5 equivalente, 260 μ L) fuera agregado lentamente. Después de 30 minutos un equivalente adicional de TMSOTf (130 μ L de una solución de 0.4M en DCM) fue agregado lentamente y la solución se dejó en agitación durante 20 minutos. Trietilamina (15 μ L) fue agregado y la solución filtrada antes de que el solvente fuera evaporado. El
50 producto sin procesar fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: Tolueno: EtOAc, 10:1 a 5:1) para obtener 208 mg del producto sólido blanco (69%). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ : 7.99-7.16 (m, 35H, Ar), 5.73 (m, 2H, H-3¹, H-3¹¹), 5.51 (dd, IH, J_{2,1} = 7.9, J_{2,3} = 9.8, H-2¹¹), 5.37 (m, 2H, H-4¹¹, H-2¹), 4.93 (d, IH, J_{1,2} = 7.9, H-1¹¹), 4.76 (d, IH, J_{1,2} = 7.9, H-1¹), 4.59 (dd, IH, H-6), 4.45 (dd, IH, H-6), 4.19 (dd, IH, J_{4,3} = 9.5, J_{4,5} = 9.5, H-4¹), 4.07 (dd, IH, H-6), 3.84-3.79 (m, 2H, 2 x H-5), 3.72 (dd, IH, H-6), 3.46 (m, IH, CHO), 1.95-0.45 (m, 31H), 0.88 (d, 3H, J = 7.3, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 1.4, CH₃),
55 0.84 (d, 3H, J = 1.4, CH₃), 0.62 (s, 3H, CH₃), 0.60 (s, 3H, CH₃).

β -D-Glucopiranosil-(1-4)- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo (106)

60 Glicósido 105 (152 mg) fue disuelto en THF/MeOH (1:1). NaOMe en MeOH (11M, 30 μ L) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución fue neutralizada con una resina H⁺, filtrada y el solvente evaporado para proporcionar 23 mg (30%) del sólido blanquecino, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

65 2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- β -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo, sal de heptasodio (107)

Poliol 106 (23 mg, 32 μ mol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 1.6 mL). SO₃-piridina (3 equivalente/OH, 672 μ mol, 107 mg)

fue agregado y la solución agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada hasta 0°C y neutralizada con 5M NaOH (2.1 equivalente/SO₃-piridina, 0.282 mL). La mezcla fue transferida a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporada y dializada (cartucho 2000 MWCO, Pierce) contra agua purificada (5 L, el agua se cambia cada 12 horas) durante 48 horas. La solución fue liofilizada y colocada en agua antes de ser purificada por un sistema de C18 RP-HPLC prep. (5 a 95% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de una purificación por HPLC. Las fracciones con una pureza mayor a 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el producto como un sólido blanco (11.6 mg, 25%). ¹H RMN (400MHz, D₂O) δ: 5.06 (d, 1H, J_{1,2} = 6.3, H-1¹¹), 4.86 (d, 1H, J_{1,2} = 6.3, H-1¹), 4.72-4.66 (m, 2H, H-3¹, H-3¹¹), 4.57-4.48 (m, 2H, H-4¹¹, H-6), 4.40-4.35 (m, 3H, H-2¹, H-2¹¹, H-6), 4.30 (dd, 1H, H-6), 4.24-4.20 (m, 2H, H-4¹, H-6), 4.08 (m, 2H, H-5¹, H-5¹¹), 3.62 (m, 1H, CHO), 2.00-0.67 (m, 31H), 0.93 (d, 3H, CH₃), 0.87 (d, 3H, CH₃), 0.86 (d, 3H, CH₃), 0.83 (s, 3H, CH₃), 0.68 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 24 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1-4)-1,2,3,6-tetra-O-benzoil-D-glucopiranososa (108)

Lactosa (1.0 g, 2.92 mmol) fue disuelta en piridina seca (20 mL) a 0°C. DMAP (cat.) fue agregada. Cloruro de benzoilo (2.5 equivalente, 58 mmol, 6.8 mL) fue agregado en forma de gotas y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La solución fue vertida sobre una mezcla de agua-hielo y DCM. La capa orgánica fue lavada con NaHCO₃ (saturado) (x 7), salmuera, H₂SO₄ (5%), seguido por salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado. El producto fue pasado mediante un lecho de sílice corto para remover el cloruro de benzoilo restante y el solvente fue evaporado para obtener 3.67 (cuantitativo) del producto sólido blanco, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-D-glucopiranosilo (109)

Perbenzoato 108 (500 mg, 0.43 mmol) fue disuelto en piridina (3.5 mL) La solución fue enfriada a 0°C, antes de que dimetilamina (2.1 mL, 5.6 M en EtOH) fuese agregado. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. Tolueno (20 mL) fue agregado y la solución lavada con salmuera, H₂SO₄ (5%) (x2), salmuera, NaHCO₃ (saturado) y salmuera. La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente fue evaporado. Al hemiacetal sin procesar se añadió DCM seco (5 mL) con tamices moleculares y carbonato de potasio (871 mg). La solución fue enfriada a 0°C antes de que tricloroacetitrilo (582 μL) fuese agregado. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla fue filtrada y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂; Tolueno: EtOAc (5:1) a 100% de EtOAc) para obtener el producto como una espuma blanca (152 mg, 29% en dos pasos) el cual se hizo reaccionar sin una caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-β-D-galactopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosido de 3'-colestano (110)

Tricloroacetimidato 109 (250 mg, 210 μmol), colestanol (2 equivalente, 163 mg) y los tamices moleculares fueron colocados en DCM seco bajo Ar. La solución fue agitada durante 30 minutos a 0°C antes de que TMSOFTf (solución 0.4 M en DCM, 0.5 equivalente, 260 μL) fuera agregado lentamente. Después de 30 minutos un equivalente adicional de TMSOFTf (130 μL de solución 0.4 M en DCM) fue agregado lentamente y la solución se dejó enfriar para agitarse por otros 20 minutos. Trietilamina (12 μL) fue agregada y la solución filtrada antes de que el solvente fuera evaporado. El producto sin procesar fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂; Tolueno: EtOAc, 15:1 a 7:1) para obtener 237 mg del producto sólido blanco (78%). ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ: 8.02-7.11 (m, 35H, Ar), 5.77 (dd, 1H, J_{3,2} = 9.6, J_{3,4} = 9.6, H-3¹), 5.74-5.69 (m, 2H, H-2¹¹, H-4¹¹), 5.43-5.35 (m, 2H, H-2¹, H-3¹¹), 4.86 (d, 1H, J_{1,2} = 7.9, H-1¹¹), 4.78 (d, 1H, J_{1,2} = 7.9, H-1¹), 4.57 (dd, 1H, H-6¹), 4.47 (dd, 1H, H-6¹), 4.20 (dd, 1H, J_{4,3} = 9.6, J_{4,5} = 9.6, H-4¹), 3.89 (ddd, 1H, H-5¹¹), 3.83 (ddd, 1H, H-5¹), 3.75 (dd, 1H, H-6¹¹), 3.65 (dd, 1H, H-6¹¹), 3.49 (m, 1H, CHO), 1.94-0.47 (m, 31H), 0.88 (d, 3H, J = 6.5, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 1.7, CH₃), 0.84 (d, 3H, J = 1.9, CH₃), 0.63 (s, 3H, CH₃), 0.60 (s, 3H, CH₃).

β-D-Galactopiranosil-(1-4)-β-glucopiranosido de 3'-colestano (111)

Glicósido 110 (231 mg) fue disuelto en THF/MeOH (1:1). NaOMe en MeOH (11M, 150 μL) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. La solución fue neutralizada con una resina H+, filtrada y el solvente evaporado para proporcionar 61 mg (54%) del sólido blanco, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo-β-D-galactopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo-β-D-glucopiranosido de 3'-colestano, sal de heptasodio (112)

Poliol 111 (30 mg, 42 μmol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 2.1 mL). SO₃.piridina (3 equivalente/OH, 882 μmol, 140 mg) fue agregado y la solución fue agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 5M NaOH (2.5 equivalente/SO₃.piridina, 0.442 mL). La mezcla fue transferida a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporada y dializada (cartucho 2000 MWCO, Pierce) con agua purificada (5 L, el agua se cambia cada 12 horas) durante 48 horas. La solución fue liofilizada y fue añadida agua antes de ser purificada en un sistema de C18 RP-HPLC prep. (5 a 95% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de una purificación por HPLC. Las fracciones con una pureza mayor a 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el producto como un sólido blanquecino (13 mg, 22%). ¹H RMN (300 MHz,

D₂O) δ: 5.15 (d, IH, H-I), 4.70 (d, IH, H-I), 4.55-3.88 (m, 12H), 3.50 (m, IH, CHO), 1.88-0.44 (m, 46H).
Ejemplo 25 1,2,3,4-Tetra-O-benzoil-α-D-manopiranososa (113)

5 6-O-Tritil-1,2,3,4-tetra-O-benzoil-α-D-manopiranososa (5 g, 6.0 mmol), fue disuelto en MeOH. H₂SO₄ (concentrado) (150 μL) fue agregado lentamente, y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La solución fue vertida en agua-hielo (300 mL) y extraída con EtOAc (80 mL). La capa orgánica fue separada y lavada con salmuera (80 mL), seguido por NaHCO₃ (saturado). La solución fue secada (Na₂SO₄), filtrada y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂, Hex:EtOAc, 500:50 a 200:200) para obtener 1.79 g del producto sólido blanco (50%). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 8.20-8.12 (m, 4H, Ar), 8.02-7.98 (m, 2H, Ar), 7.87-7.84 (m, 2H, Ar), 7.70-7.26 (m, 27H, Ar), 6.63 (d, IH, J_{1,2} = 2.1, H-I), 6.12 (dd, IH, J_{3,2} = 3.3, J_{3,4} = 10.2, H-3), 6.02 (dd, IH, J_{4,3} = 10.0, J_{4,5} = 10.0, H-4), 5.89 (dd, IH, J_{2,1} = 1.8, J_{2,3} = 3.1, H-2), 4.25 (ddd, IH, H-5), 3.90-3.76 (m, 2H, H-6).

15 Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-D-glucopiranosilo (114)

20 Perbenzoato de maltotriosa (400 mg) fue disuelto en THF (3 mL) a 0°C. Una solución saturada de NH₃ en MeOH (6 mL) fue agregada y la solución agitada a 0°C durante 4 horas. La solución fue diluida con DCM, lavada con 0.5 M HCl frío, luego lavada con salmuera antes de que el solvente fuera evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: 10 a 50% de EtOAc/Hexano) para obtener 211 mg del hemiacetal puro, al cual fue añadido DCM seco con tamices moleculares, carbonato de potasio (129 mg) y carbonato de cesio (45 mg). La mezcla fue agitada a 0°C, antes tricloroacetronitrilo (93 μL) fue agregado. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y fue agitada durante 5 horas. La solución fue filtrada y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂ Hexano a 50% de EtOAc/Hexano) para obtener 149.2 mg del producto sólido blanco (36%, dos pasos) el cual fue reaccionado sin una caracterización adicional.

25 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosil-(1-6)-1,2,3,4-tetra-O-benzoil-D-manopiranososa (115)

30 Tricloroacetimidato 114 (279 μmol, 435 mg), 1,2,3,4-tetra-O-benzoil manopiranososa 113 (1.2 equivalente, 200 mg, 335 μmol) y tamices moleculares fueron colocados en DCM y agitados a 0°C durante 30 minutos antes de que TMSOft (1.1 equivalente, 68.2 mg, 56 μL en 600 μL DCM) fuera agregado lentamente en forma de gotas. La mezcla fue agitada a 0°C durante 90 minutos, antes de ser neutralizada con trietilamina (200 μL), filtrada y el solvente fue evaporado para obtener el producto sin procesar, el cual fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 50% de EtOAc) para obtener 312.8 mg del producto sólido sin procesar (53%) el cual fue reaccionado sin una caracterización adicional.

35 Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosil-(1-6)-2,3,4-tri-O-benzoil-D-manopiranosilo (116)

40 Perbenzoato 115 (312.8 mg) fue disuelto en piridina (4.5 mL). Dimetilamina (3 mL, 5.6 M en EtOH) fue agregado. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. DCM (10 mL) fue agregado y la solución fue lavada con salmuera, H₂SO₄ (5%) (x 2), salmuera y NaHCO₃ (saturado). La solución fue secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado. Al hemiacetal sin procesar fue añadido DCM seco con tamices moleculares, carbonato de potasio (600 mg) y carbonato de cesio (100 mg). La solución fue enfriada a 0°C antes de que tricloroacetronitrilo (200 μL) fuera agregado. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 4 horas. La mezcla fue filtrada y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 60% de EtOAc/Hexano) para obtener el producto como un sólido blanco (153.9 mg, 48% en dos pasos) el cual fue reaccionado sin una caracterización adicional.

50 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosil-(1-6)-2,3,4-tri-O-benzoil-α-D-manopiranosido de 3'-colestaniilo (117)

55 Tricloroacetimidato 116 (153.9 mg, 71.1 μmol), colestanol (3 equivalente, 83 mg) y tamices moleculares fueron colocados en DCM seco bajo Ar. La solución fue agitada a 0°C durante 15 minutos antes de que TMSOTf (1.1 equivalente, 17.4 μL en 200 μL DCM) fuera agregado lentamente. La solución se dejó agitar durante 90 minutos a 0°C. Trietilamina (20 μL) fue agregada y el solvente fue evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 40% de EtOAc/Hexano; cargado con tolueno) para obtener 71.4 mg del producto sólido blanco (42%). ¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ: 8.00-6.94 (m, 65H, Ar), 5.94 (dd, IH, J_{3,2} = 9.7, J_{3,4} = 9.7, H-3^{IV}), 5.76 (dd, IH, J_{3,2} = 10.0, J_{3,4} = 7.9, H-3^{III}), 5.68 (dd, IH, J_{3,2} = 3.3, J_{3,4} = 10.0, H-3^I), 5.59 (d, IH, J_{1,2} = 3.8, H-1^{IV}), 5.57-5.49 (m, 3H, H-3^{II}, H-4^{IV}, H-4^I), 5.42 (d, IH, J_{1,2} = 3.8, H-1^{III}), 5.35 (dd, IH, J_{2,1} = 1.8, J_{2,3} = 3.3, H-2^I), 5.16 (dd, IH, J_{2,1} = 7.4, J_{2,3} = 9.5, H-2^{II}), 5.12 (dd, IH, J_{2,1} = 3.8, J_{2,3} = 10.5, H-2^{IV}), 4.93 (dd, IH, J_{2,1} = 3.8, J_{2,3} = 10.0, H-2^{III}), 4.76 (dd, IH, H-6^{III}), 4.73 (d, IH, J_{1,2} = 1.8, H-1^I), 4.71 (d, IH, J_{1,2} = 7.7, H-1^{II}), 4.53 (dd, IH, H-6^{II}), 4.48-4.41 (m, 2H, H-6^{II}, H-6^{III}), 4.32-4.16 (m, 6H, H-5^{IV}, H-5^{II}, H-5^I, H-4^{II}, H-4^{III}, H-6^{IV}), 4.11-4.03 (m, 2H, H-6^I, H-6^{IV}), 3.88 (ddd, IH, H-5^{III}), 3.60 (dd, IH, H-6^I), 3.23 (m, IH, CHO), 1.87-0.38 (m, 31H), 0.77 (d, 3H, J = 6.4, CH₃), 0.74 (d, 3H, J = 1.3, CH₃), 0.72 (d, 3H, J = 1.5, CH₃), 0.61 (s, 3H, CH₃), 0.51 (s, 3H, CH₃).

α -D-Glucopiranosil-(1-4)- α -D-glucopiranosil-(1-4)- β -D-glucopiranosil-(1-6)- α -D-manopiranosido de 3'-colestanoil (118)
 Glucósido 117 (80 mg) fue disuelto en MeOH/THF 1:1. NaOMe (200 μ L de una solución 11M) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla fue neutralizada con resina ácida y la solución filtrada antes de que el solvente fuera evaporado para obtener el producto sólido blanco, el cual fue triturado con EtOAc y el solvente decantado (x3). El sólido fue secado bajo un vacío para obtener una cantidad cuantitativa de producto sólido blanco, el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosil-(1-6)-2,3,4-tri-O-sulfo- α -D-manopiranosido de 3'-colestanoil, sal tridecasodio (119)

Poliol 118 (72.8 mg, 70.2 μ mol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 3.5 mL), SO₃.piridina (3 equivalentes/OH, 2.7 mmol 463 mg) fue agregado y la solución agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 5M NaOH (2.1 equivalentes/SO₃.piridina, 1.15 mL). La mezcla fue transferida a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporado y dializado (cartucho 2000 MWCO, Pierce) con agua purificada (5 L, el agua se cambia cada 12 horas) durante 24 horas. La solución fue liofilizada y se añadió agua antes de ser purificada en un sistema de C18 RP-HPLC prep. (5% a 95% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de la purificación por HPLC. Las fracciones con una pureza mayor a 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el producto como un sólido blanco (25 mg, 15%). ¹H RMN (300MHz, D₂O) δ : 5.70 (d, 1H, J_{1,2} = 3.5, H-1), 5.55 (d, 1H, H-1), 5.36 (m, 2H, H2 x H-1), 5.03-4.05 (m, 24H), 3.88 (m, 1H, CHO), 2.00-0.70 (m, 31H), 0.94 (d, 3H, J = 6.4, CH₃), 0.89 (d, 3H, J = 1.3, CH₃), 0.86 (s, 3H, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 1.3, CH₃), 0.70 (s, 3H, CH₃).

Ejemplo 26 2,3,4-Tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido de 3-azidopropilo (120)

Tricloroacetamida 114 (2 g, 1.3 mmol) 3-azidopropanol (2 equivalentes, 260 mg) y tamices moleculares fueron colocados en DCM (10 mL) y enfriados a 0°C. TMSOft (1.1 equivalente., 318 mg, 260 μ L) fue agregado en forma de gotas (1/3 por vez cada 30 minutos, en forma de gotas, en 2.6 mL de DCM). La solución fue agitada durante 90 minutos a 0°C, antes de ser neutralizada con trietilamina (300 μ L), filtrada, lavada con agua, secada (Na₂SO₄), y el solvente fue evaporado para proporcionar el producto sin procesar. Esto fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: tolueno a 5% de EtOAc/tolueno, cargado con tolueno) para obtener 2.06 g del producto como un aceite transparente 120 (97%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.18 (m, 2H, Ar), 8.04 (m, 2H, Ar), 7.95 (m, 2H, Ar), 7.87 (m, 2H, Ar), 7.84 (m, 2H, Ar), 7.74-7.70 (m, 4H, Ar), 7.61-7.10 (m, 36H, Ar), 6.09 (t, 1H, J_{3,2} = 10.2, J_{3,4} = 10.2, H-3^{III}), 5.92 (dd, 1H, J_{3,2} = 9.9, J_{3,4} = 8.2, H-3^{II}), 5.75 (d, 1H, J_{1,2} = 3.8, H-1^{II}), 5.70-5.64 (m, 2H, H-3^I, H-4^{III}), 5.60 (d, 1H, J_{1,2} = 4.1, H-1^I), 5.30-5.23 (m, 2H, H-2^{III}, H-2^I), 5.08 (dd, 1H, J_{2,1} = 3.8, J_{2,3} = 9.9, H-2^{II}), 4.99 (dd, 1H, H-6^I), 4.75-4.59 (m, 3H, H2 x H-6^{II}, H-6^I), 4.74 (d, 1H, J_{1,2} = 7.5, H-1^I), 4.48-4.36 (m, 5H, H-5^{III}, H-5^{II}, H-4^I, H-4^{II}, H-6^{III}), 4.23 (dd, 1H, H-6^{III}), 4.05 (ddd, 1H, H-5^I), 3.92 (m, 1H, CH₂O), 3.57 (m, 1H, CH₂O), 3.19 (m, 2H, CH₂N₃), 1.74 (m, 2H, CH₂).

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo (121)

Glucósido 120 (2 g, 1.23 mmol) fue disuelto en THF (10 mL). Trifenilfosfina (3 equivalentes, 966 mg) fue agregada y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora bajo Ar. Agua (30 equivalentes, 665 μ L) fue agregada y la solución fue agitada a 50°C durante 4.5 horas. El solvente fue evaporado y a la amina sin procesar se añadió DCM. Cloruro de estearoilo (3 equivalentes, 1.18 g, 1.25 mL) fue agregado, seguido por trietilamina (3.1 equivalentes, 386 mg, 532 μ L) y la solución fue agitada durante la noche a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado y el producto sin procesar fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: tolueno a 8:1 tolueno: EtOAc, cargado con tolueno) para obtener 1.65 g del producto como un aceite transparente 121 (72%, en 2 pasos). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.16 (m, 2H, Ar), 8.05 (m, 2H, Ar), 7.95 (m, 2H, Ar), 7.86 (m, 2H, Ar), 7.82 (m, 2H, Ar), 7.74-7.70 (m, 4H, Ar), 7.63-7.10 (m, 36H, Ar), 6.10 (t, 1H, J_{3,2} = 10.2, J_{3,4} = 10.2, H-3^{III}), 5.98-5.91 (m, 2H, H-3^{II}, NH), 5.76 (d, 1H, J_{1,2} = 4.1, H-1^{II}), 5.73-5.65 (m, 2H, H-3^I, H-4^{III}), 5.61 (d, 1H, J_{1,2} = 4.1, H-1^I), 5.29-5.20 (m, 2H, H-2^{III}, H-2^I), 5.11-5.05 (m, 2H, H-2^{II}, H-6^I), 4.79 (dd, 1H, H-6^{II}), 4.71 (d, 1H, J_{1,2} = 7.5, H-1^I), 4.68-4.61 (m, 2H, H-6^{II}, H-6^I), 4.49-4.38 (m, 5H, H-5^{III}, H-5^{II}, H-4^I, H-4^{II}, H-6^{III}), 4.23 (dd, 1H, H-6^{III}), 4.04 (ddd, 1H, H-5^I), 3.92 (m, 1H, CH₂O), 3.57 (m, 1H, CH₂O), 3.27 (m, 1H, CH₂N), 3.13 (m, 1H, CH₂N), 2.11 (t, 2H, CH₂CO), 1.72 (m, 2H, CH₂), 1.56 (m, 2H, CH₂), 1.30-1.24 (m, 28H, 14 x CH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃).

α -D-Glucopiranosil-(1-4)- α -D-glucopiranosil-(1-4)- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo (122)

Glucósido 121 (1.61 mg, 861 μ mol) fue disuelto en MeOH/THF 1:1 (40 mL). NaOMe (1 mL de una solución 6M) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla fue neutralizada con una resina ácida y la solución fue filtrada antes de que el solvente fuera evaporado para obtener el producto sólido blanco, el cual fue triturado con EtOAc y el solvente decantado (x 3). El sólido fue secado bajo vacío para obtener 651 mg del producto sólido blanco (91%), el cual fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de decasodio (123)

Poliol 122 (200 mg, 242 μ mol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 12.1 mL). SO₃-piridina (3 equivalentes/OH, 7.26 mmol, 1.16

g) fue agregado y la solución fue agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 5M NaOH (3 equivalentes/SO₃.piridina, 4.4 mL). La mezcla fue enfriada a -20°C durante 1 hora. El sobrenadante fue decantado y desechado. El precipitado fue transferido a un matraz de fondo redondo grande con agua, evaporado y dializado (cartucho 2000 MWCO, Pierce) contra agua purificada (5 L, que contiene 1 mL de 1.7 M NH₄HCO₃) durante 72 horas. La solución fue liofilizada para proporcionar el producto como un sólido amarillo (177 mg, 40%). ¹H RMN (D₂O, 400 MHz) δ 5.69 (d, IH, J_{1,2} = 3.4, H-I), 5.59 (d, IH, J_{1,2} = 2.7, H-I), 4.99-4.92 (m, 2H), 4.85-4.08 (m, 17H), 4.01 (ddd, IH, CH₂O), 3.75 (ddd, IH, CH₂O), 3.32 (t, 2H, J = 6.7, CH₂N), 2.27 (t, 2H, CH₂CO), 1.87 (m, 2H, CH₂), 1.61 (m, 2H, CH₂), 1.37-1.29 (m, 28H, CH₂), 0.91 (t, 3H, CH₃).

10 Ejemplo 27. Tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosilo (124)

15 Perbenzoato de maltotetraosa 66 (12.4 g) fue disuelto en piridina (47 mL) a 0°C. Dimetilamina (5.6 M en EtOH) (28.3 mL) fue agregada y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución fue vertida sobre 0.5 M HCl enfriado con hielo y el precipitado resultante fue filtrado y lavado con agua antes de ser secado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂, 5 a 70% de EtOAc/Hexano) para obtener 6.7 g de hemiacetal puro, al cual fue añadido DCM seco con tamices moleculares y carbonato de potasio (6.6 g). La mezcla fue agitada a 0°C, antes fue agregado tricloroacetnitrilo (4.4 mL). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y fue agitada durante 2 horas. La solución fue filtrada y el solvente fue evaporado. El producto sin procesar (7.2 g, 57%) fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosido de 3-azidopropilo (125)

25 A tricloroacetamida 124 (1.476 g, 0.682 mmol), 3-azidopropanol (2 equivalentes, 137 mg) y tamices moleculares fue añadido DCM (10 mL) y enfriados a 0°C. TMSOTf (0.5 equivalente, 62 µL en 850 µL DCM) fue agregado en forma de gotas. La solución fue agitada durante 90 minutos a 0°C, antes de ser neutralizada con trietilamina (300 µL), filtrada, lavada con agua, secada (Na₂SO₄) y el solvente fue evaporado para proporcionar el producto sin procesar. Este fue purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: tolueno a 24:3 tolueno: EtOAc, cargado con tolueno) para obtener 30 600 mg del producto sólido blanco (46%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.25-7.05 (m, 35H, Ar), 6.12 (dd, IH, J_{3,2} = 9.9, J_{3,4} = 9.9, H-3^{IV}), 6.00 (dd, IH, H-3), 5.87 (dd, IH, H-3), 5.76 (d, IH, J_{1,2} = 3.7, H-1^{IV}), 5.71-5.64 (m, 3H, H-I, H-3^I, H-4^{IV}), 5.60 (d, IH, J_{1,2} = 3.7, H-I), 5.29-5.23 (m, 2H, H-2^I, H-2^{IV}), 5.14-5.05 (m, 2H, 2 x H-2), 5.01 (dd, IH, H-6), 4.85 (dd, IH, H-6), 4.76-4.69 (m, 2H, 2 x H-6), 4.75 (d, IH, J_{1,2} = 7.5, H-1^I), 4.59 (m, 2H, 2 x H-6), 4.47-4.33 (m, 7H, 3 x H-4, 3 x H-5, H-6), 4.19 (dd, IH, H-6), 4.05 (ddd, IH, H-5^I), 3.91 (m, IH, CH₂O), 3.57 (m, IH, CH₂O), 3.19 (m, 2H, CH₂N), 1.74 (m, 2H, CH₂).

2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-2)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo (126)

40 Glicósido 125 (660 mg, 0.314 mmol) fue disuelto en ACN (21 mL). Trifenilfosfina (3 equivalentes, 247 mg) fue agregada y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora bajo Ar. Agua (30 equivalentes, 169 µL) fue agregada y la solución fue agitada a 50°C durante 7 horas. El solvente fue evaporado y a la amina sin procesar fue añadido DCM. Cloruro de estearilo (3 equivalentes, 317 µL) fue agregado, seguido por trietilamina (3 equivalente, 131 µL) y la solución fue agitada durante 3 días a temperatura ambiente. El solvente fue evaporado y el producto sin procesar fue purificado mediante una cromatografía de columna (SiO₂: tolueno a 15:3 tolueno: EtOAc, cargado con tolueno) para obtener 45 403 mg del producto como un aceite transparente. (55% , en dos pasos). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.21-7.05 (m, 35H, Ar), 6.09 (dd, IH, J_{3,2} = 9.8, J_{3,4} = 9.8, H-3^{IV}), 6.02 (t, IH, NH), 5.97 (dd, IH, H-3), 5.90 (dd, IH, H-6), 5.86 (dd, IH, H-3), 5.75 (d, IH, J_{1,2} = 3.9, H-1^{IV}), 5.71-5.63 (m, 3H, H-I, H-3^I, H-4^{IV}), 5.59 (d, IH, J_{1,2} = 3.9, H-I), 5.27-5.18 (m, 2H, H-2^I, H-2^{IV}), 5.12-5.04 (m, 3H, H-6^I, 2 x H-2), 4.72-4.66 (m, 2H, 2 x H-6), 4.70 (d, IH, J_{1,2} = 7.8, H-1^I), 4.58 (m, 2H, H-2 x H-6), 4.45-4.31 (m, 6H, 3 x H-4, 3 x H-5, H-6), 4.17 (dd, IH, H-6), 4.02 (ddd, IH, H-5^I), 3.91 (m, IH, CH₂O), 3.56 (m, IH, CH₂O), 3.28 (m, IH, CH₂N), 3.13 (m, IH, CH₂N), 2.13 (m, 2H, CH₂CO), 1.76-1.58 (m, 4H, CH₂), 1.26-1.24 (m, 28H, CH₂), 0.88 (t, 3H, CH₃).

55 α-D-Glucopiranosil-(1-4)-α-D-glucopiranosil-(1-4)-α-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo (127)

60 Glicósido 126 (377 mg, 161 µmol) fue disuelto en MeOH/THF 1:1 (10 mL). NaOMe (60 µL de una solución 11M) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla fue neutralizada con una resina acídica y la solución fue filtrada antes de que el solvente fuera evaporado para obtener el producto sólido blanco, el cual fue triturado con EtOAc y el solvente decantado (x3). El sólido fue secado bajo vacío para obtener 159 mg del producto sólido blanco (cuantitativo), el cual fue reaccionado sin una purificación adicional o caracterización.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo-β-D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de tridecasodio (128)

65 Polioliol 127 (159 mg, 161 µmol) fue disuelto en DMF (0.02 M, 8.1 mL). SO₃.piridina (3 equivalentes/OH, 6.3 mmol, 1.0 g)

fue agregado y la solución fue agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada hasta 0°C y neutralizada con 5M NaOH (3 equivalentes/SO₃.piridina, 3.8 mL). La mezcla fue enfriada a -20°C durante 1 hora. El sobrenadante fue decantado y descartado. El precipitado fue transferido a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporado y dializado (cartucho 2000 MWCO, Pierce) con agua purificada (5 L, que contiene 1 mL de 1.7 M NH₄HCO₃) durante 72 horas. La solución fue liofilizada para proporcionar el producto como un sólido amarillo (227 mg, 61%). H RMN (D₂O, 400 MHz) δ 5.89 (d, IH, J_{1,2} = 3.4, H-I), 5.72 (d, IH, J_{1,2} = 2.7, H-I), 5.67 (d, IH, H-I), 5.06-4.09 (m, 18H), 4.01 (ddd, IH, CH₂O), 3.75 (ddd, IH, CH₂O), 3.33 (t, 2H, J = 6.1, CH₂N), 2.28 (t, 2H, J = 7.4, CH₂CO), 1.87 (m, 2H, CH₂), 1.62 (m, 2H, CH₂), 1.37-1.29 (m, 28H, CH₂), 0.91 (t, 3H, CH₃).

10 Ejemplo 28 2-(Colestan-3-iloxi)acetato de *tert*-butilo (129)

Colestanol (0.662 g, 1.703 mmol) fue disuelto en tolueno (13 mL). *Tert*-butóxido de potasio (573 mg, 5.11 mmol) fue agregado en una parte. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. Bromoacetato de *tert*-butilo (503 μL, 3.406 mmol) fue agregado en forma de gotas, y la mezcla fue agitada durante la noche a temperatura ambiente. Tolueno (20 mL) fue agregado y la solución fue lavada con salmuera (50 mL). La fase acuosa fue extraída con tolueno (30 mL) antes de que todas las fases orgánicas fuesen combinadas, secadas (Na₂SO₄) y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano:EtOAc, 200:1 a 200:20) para obtener el producto sólido blanco (0.65 g, 76% de rendimiento). H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.98 (s, 2H, CH₂O), 3.30 (m, IH, CHO), 1.97-0.56 (m, 31H), 1.46 (s, 9H, CH₃), 0.89 (d, 3H, J = 6.1, CH₃), 0.85 (d, 3H, J = 2.0, CH₃), 0.84 (d, 3H, J = 1.4, CH₃), 0.79 (s, 3H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃).

Ácido 2-(Colestan-3-iloxi)acético (130)

A *tert*-butil 2-(coleston-3-iloxi)acetato 129 (634 mg, 1.26 mmol) fue añadido DCM (4 mL) antes de que TFA (1 mL) fuera agregado. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 90 minutos. El solvente fue evaporado y el residuo purificado utilizando un lecho de sílice corto (SiO₂: DCM a 100:5 DCM:MeOH) antes de ser recrystalizado a partir del hexano para obtener 439 mg del producto sólido blanco (78%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 4.25 (s, 2H, CH₂O), 3.37 (m, IH, CHO), 1.99-0.58 (m, 31H), 0.89 (d, 3H, J = 6.6, CH₃), 0.85 (d, 3H, J = 2.0, CH₃), 0.84 (d, 3H, J = 1.4, CH₃), 0.80 (s, 3H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃).

30 Isotiocianato de 2,3,4,6-tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosilo (131)

A bromuro 84 (1.8 g, 1.12 mmol), KSCN (3 equivalentes, 326 mg), tamices moleculares y Bu₄NI (Cat.) fue añadido acetonitrilo seco y agitado a 75°C durante la noche. El solvente fue evaporado y el residuo fue tomado en DCM y lavado con NaHCO₃ (sat) antes de ser secado (Na₂SO₄) y el solvente evaporado. El producto sin procesar fue purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂: Hexano a 35% de EtOAc/Hexano, cargado con tolueno) para obtener 1.15 g del producto sólido blanco (65%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.23-7.12 (m, 5OH, Ar), 6.16 (dd, IH, J_{3,2} = 9.6, J_{3,4} = 9.6, H-3^{III}), 5.96 (dd, IH, J_{3,2} = 9.6, J_{3,4} = 8.2, H-3^{II}), 5.81 (d, IH, J_{1,2} = 4.1, H-1^{III}), 5.75-5.68 (m, 2H, H-3^I, H-4^{III}), 5.65 (d, IH, J_{1,2} = 4.1, H-1^I), 5.40 (dd, IH, J_{2,1} = 8.2, J_{2,3} = 8.2, H-2^I), 5.32 (dd, IH, J_{2,1} = 4.1, J_{2,3} = 10.2, H-2^{III}), 5.28 (d, IH, J_{1,2} = 8.2, H-1^I), 5.13 (dd, IH, J_{2,1} = 4.1, J_{2,3} = 10.2, H-2^{II}), 5.00 (dd, IH, H-6^I), 4.77 (dd, IH, H-6^{II}), 4.72-4.65 (m, 2H, H-6^I, H-6^{II}), 4.53-4.41 (m, 5H, H-5^{II}, H-5^{III}, H-4^I, H-4^{II}, H-6^{III}), 4.30 (dd, IH, H-6^{III}), 4.13 (ddd, IH, H-5^I).

45 2,3,4,6-Tetra-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-α-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil-β-D-glucopiranosido de 2-coleston-3-iloxi)acetamido (132)

Isotiocianato 131 (0.5 g, 215 μmol) y ácido 2-(coleston-3-iloxi)acético 130 (141 mg, 315 μmol) fueron disueltos en tolueno (6.3 mL). Trietilamina (20 μL) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 4 días. El solvente fue evaporado y el residuo purificado por una cromatografía de columna (SiO₂: Tolueno a 10% de EtOAc/tolueno) para obtener 358 mg del producto sólido blanco (58%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8.23-7.09 (m, 5OH, Ar), 7.50 (d, IH, NH), 6.09 (dd, IH, J_{3,2} = 10.2, J_{3,4} = 9.9, H-3^{III}), 5.91 (dd, IH, J_{3,2} = 9.9, J_{3,4} = 7.8, H-3^{II}), 5.82 (dd, IH, J_{3,2} = 9.5, J_{3,4} = 9.2, H-3^I), 5.74 (d, IH, J_{1,2} = 4.1, H-1^{III}), 5.67 (dd, IH, J_{4,3} = 9.9, J_{4,5} = 9.9, H-4^{III}), 5.60 (d, 1H, J_{1,2} = 4.1, H-1^{II}), 5.51 (dd, 1H, J_{1,2} = 9.5, J_{1,NH} = 8.5, H-1^I), 5.27 (dd, IH, J_{2,1} = 4.1, J_{2,3} = 10.6, H-2^{III}), 5.24 (dd, IH, J_{2,1} = 9.5, J_{2,3} = 9.5, H-2^I), 5.08 (dd, IH, J_{2,1} = 4.1, J_{2,3} = 10.2, H-2^{II}), 4.92 (dd, IH, H-6), 4.70-4.64 (m, 2H, H2 x H-6), 4.56 (dd, IH, H-6), 4.46-4.31 (m, 5H, H-5^{II}, H-4^I, H-4^{II}, 2 x H-6), 4.22 (ddd, IH, H-5^I), 4.15 (ddd, IH, H-5^I), 3.95 (dd, IH, CH₂O), 3.73 (dd, IH, CH₂O), 3.11 (m, IH, CHO), 1.47-0.50 (31H), 0.90 (d, 3H, J = 6.8, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 6.8, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 6.8, CH₃), 0.77 (s, 3H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃).

60 α-D-Glucopiranosil-(1-4)-α-D-glucopiranosil-(1-4)-β-D-glucopiranosido de 2-(coleston-3-iloxi)acetamido (133)

Amida 132 (345 mg, 175 μmol) fue disuelta en MeOH/THF 1:1 (16 mL). NaOMe (500 μL de una solución 6M) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla fue neutralizada con una resina acídica y la solución filtrada antes de que el solvente fuera evaporado para obtener el producto sólido blanco, el cual fue triturado con EtOAc y el solvente decantado (x3). El sólido fue secado bajo vacío para obtener 124 mg del producto sólido blanco (76%), el cual fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 2-(coleston-3-iloxi)acetamido, sal de decasodio (134)

5 Poliol 133 (118 mg, 127 μ mol) fue disuelto en DMF (0.04 M, 4.4 mL). SO₃.piridinda (3 equivalentes/OH, 5.3 mmol, 838 mg) fue agregado y la solución agitada a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 5M NaOH (3 equivalente/SO₃.piridina). La mezcla fue enfriada a -20°C durante 1 hora. El sobrenadante fue decantado y descartado. El precipitado fue transferido a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporado y dializado (cartucho 2000 MWCO, Pierce) con agua purificada (5 L, que contiene 1 mL de 1.7 M NH₄HCO₃) durante 72 horas. La solución fue liofilizada para proporcionar el producto como un sólido amarillo (195 mg, 79%). ¹H RMN (D₂O, 400MHz) δ : 5.67 (d, IH, J_{1,2} = 2.9, H-I), 5.57 (d, IH, J_{1,2} = 1.2, H-I), 5.35 (d, IH, J_{1,2} = 7.3, H-I¹), 5.06-4.06 (m, 20H), 3.48 (m, IH, CHO), 2.07-0.68 (m, 46H).

Ejemplo 29. 3-(Coleston-3-iloxi)propanonitrilo (135)

15 Colestanol (1.554 g, 3.998 mmol) fue disuelto en DCM (6 mL). A esta solución fue agregado KOH (40% p/p en agua, 1.2 mL) y acetonitrilo (0.8 mL) seguido por 18-corona-6 (104 mg). La mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante la noche. La capa orgánica fue lavada con salmuera y secada (Na₂SO₄) antes de que el solvente fuera evaporado. El residuo fue recristalizado a partir de MeOH caliente para obtener el producto puro como un sólido cristalino sin color (1.42 g, 80% de rendimiento). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 3.68 (t, 2H, CH₂O), 3.29 (m, IH, CHO), 2.57 (t, 2H, CH₂CN), 20 1.98-0.58 (m, 31H), 0.89 (d, 3H, J = 6.6, CH₃), 0.87 (d, 3H, J = 1.8, CH₃), 0.85 (d, 3H, J = 2.0, CH₃), 0.79 (s, 3H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃).

1-Amino-3-(coleston-3-iloxi)-propano (136)

25 A 3-(coleston-3-iloxi)propanonitrilo 135 (442 mg, 1 mmol) fue añadido una mezcla de tolueno (1 mL), cloroformo (1.5 mL) EtOH (1 mL) y HCl concentrado (200 μ L). Hidrato de óxido de platino (46 mg) fue agregado. La mezcla fue agitada bajo nitrógeno (80 psi) a temperatura ambiente durante 48 horas. El solvente fue evaporado y al residuo fue añadido DCM (40 mL) y NaHCO₃ (saturado) (40 mL). La fase orgánica fue separada y lavada con NaHCO₃ (saturado) (30 mL), seguido por salmuera (20 mL), antes de ser secada (Na₂SO₄) y el solvente evaporado para obtener el producto como una espuma blanca, el cual fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

Tiourea de 1-[(coleston-3-iloxi)propil]-3-[2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosido] (137)

35 A 3-(coleston-3-iloxi)propan-1-amina 136 (0.5 mmol) fue añadido tolueno (3 mL). Isotiocianato 131 (403 mg, 0.254 mmol) fue agregado. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 3 días. El solvente fue evaporado y el producto sin procesar purificado utilizando una cromatografía de columna (SiO₂; tolueno a 180:30 tolueno: EtOAc) para obtener el producto puro como un sólido blanco (355 mg, 35%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.23-7.09 (m, 5OH, Ar), 6.90 (dd, IH, J = 4.9, J = 4.9, NH), 6.09 (dd, IH, J_{3,2} = 10.2, J_{3,4} = 9.8, H-3^{III}), 5.89 (m, 2H, H-3^{II}, H-3^I), 5.74 (d, IH, J_{1,2} = 3.9, H-I¹¹¹), 5.67 (dd, IH, J_{4,3} = 9.8, J_{4,5} = 9.8, H-4^{III}), 5.58 (d, IH, J_{1,2} = 3.9, H-I¹¹¹), 5.28 (dd, IH, J_{2,1} = 3.9, J_{2,3} = 10.7, H-2¹¹¹), 5.19 (dd, IH, J_{2,1} = 9.3, J_{2,3} = 9.3, H-2¹), 5.09 (dd, IH, J_{2,1} = 3.9, J_{2,3} = 10.2, H-2^{II}), 4.92 (dd, IH, H-6), 4.70 (dd, IH, H-6), 4.67 (dd, IH, H-6), 4.58 (dd, IH, H-6), 4.46-4.34 (m, 5H), 4.27-4.18 (m, 2H), 3.50 (dd, 2H, CH₂), 3.18 (m, IH, CHO), 1.98-0.56 (35H), 0.90 (d, 3H, J = 6.8, CH₃), 0.87 (d, 3H, J = 6.8, CH₃), 0.86 (d, 3H, J = 6.8, CH₃), 0.80 (s, 3H, CH₃), 0.64 (s, 3H, CH₃).

45 Tiourea de 1-[(coleston-3-iloxi)propil]-3-[α -D-glucopiranosil-(1-4)- α -D-glucopiranosil-(1-4)- β -D-glucopiranosido] (138)

50 Tiourea 137 (345 mg, 171 μ mol) fue disuelto en MeOH/THF 1:1 (16 mL). NaOMe (500 μ L de un solución 6M) fue agregado y la solución fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla fue neutralizada con una resina ácida y la solución fue filtrada antes de que el solvente fuera evaporado para obtener el producto sólido blanco, el cual fue triturado con EtOAc y el solvente decantado (x3). El sólido fue secado bajo vacío para obtener 169 mg del producto sólido blanco (cuantitativo) el cual fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

55 Tiourea de 1-[(coleston-3-iloxi)propil]-3-[2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido], sal de decasodio (139)

60 Poliol 138 (169 mg, 171 μ mol) fue disuelto en DMF (0.04 M, 4.4 mL). SO₃.piridina (3 equivalentes/OH, 5.13 mmol, 816 mg) fue agregado y el sodio agitado a 60°C durante la noche. La solución fue enfriada a 0° y neutralizada con 5M NaOH (3 equivalentes/SO₃.piridina). La mezcla fue enfriada a -20°C durante 1 hora. El sobrenadante fue decantado y descartado. El precipitado fue transferido a un matraz con fondo redondo grande con agua, evaporado y dializado (cartucho 2000 MWCO, Pierce) contra agua purificada (5 L, que contiene 1 mL de 1.7 M NH₄HCO₃) durante 72 horas. La solución fue liofilizada y se añadió agua antes de ser purificada en un sistema de C18 RP-HPLC prep. (5 a 95% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de una purificación por HPLC. Las fracciones con una pureza mayor al 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el producto como un sólido blanco (7 mg, 2%). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 6.00-5.56 (m, 3H, 3 x H-I), 4.98-3.14 (m, 21H), 2.04-0.72 (m, 50H).

Ejemplo 30 2,3,4,6-Tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1-4)-((1-piridinio-il)-2,3,5,6-tetra-O-sulfo-D-glucósido de 3'-colestanoil, sal de tridecasodio (140)

5 El poliol 64 (3.552) fue disuelto en DMF seco (46 mL) y lavado y el complejo de SO₃.piridina secado (21.24 g) agregado y la mezcla fue agitada durante 16 horas a 60°C. La mezcla de reacción fue enfriada a 0°C durante 10 minutos, luego neutralizada al agregar una solución de NaOH acuoso helado (5 M, 54 mL) a 0°C en una parte (un pH de 12). La suspensión fue agitada durante 15 minutos a 0°C, diluida con agua (10 mL) y concentrada bajo vacío a 40°C. Un polvo amarillo pálido fue conseguido, el cual fue disuelto en agua (10 mL) obteniendo una solución con un pH de 11.5. La solución fue ajustada a un pH de 12.5 al agregar una solución acuosa de NaOH (5 M, 5 gotas) y dializada con agua (4 L) utilizando cassettes 4 x Slide-A-Lyzer® (2000 MWCO, 4 a 12 mL) durante 16 horas a temperatura ambiente. La diálisis con agua (4 L) fue continuado a 0°C durante 3 días, donde el agua fue cambiada cada 24 horas, así como una solución acuosa de NH₄HCO₃ (3 M, 0.6 mL) fue agregada al agua para ajustar el pH a ~6.0 a 6.5. La solución desalada fue entonces liofilizada para proporcionar una mezcla de, principalmente 65 y 140, la cual fue purificada en un sistema de C18 RP-HPLC prep. (5 a 30% de acetonitrilo en agua durante 20 minutos). La CE fue utilizada para determinar la pureza de cada fracción recolectada después de una purificación por HPLC. Las fracciones con una pureza mayor al 90% fueron combinadas y liofilizadas para proporcionar el producto como un sólido blanco (30 mg, purificada a partir de aproximadamente 1 g del material sin procesar). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 9.09 (m, 2H, Ar), 8.39 (m, 1H, Ar), 7.93 (m, 2H, Ar), 6.40 (d, 1H, H-1^I), 5.56 (d, 1H, J_{1,2} = 3.4, H-1^{II}), 5.54 (d, 1H, J_{1,2} = 2.3, H-1^{III}), 5.45 (d, 1H, J_{1,2} = 3.3, H-1^{IV}), 5.00 (ddd, 1H, H-5^I), 4.86 (dd, 1H, H-3^{II}), 4.79 (dd, 1H, H-3^{III}), 4.77 (dd, 1H, H-2^I), 4.77 (dd, 1H, H-4^I), 4.64 (dd, 1H, H-2^{III}), 4.58 (dd, 1H, H-3^{IV}), 4.49 (dd, 1H, H-3^I), 4.40 (m, 1H, H-6^I), 4.32 (m, 1H, H-6^I), 4.31 (dd, 1H, H-4^{IV}), 4.29 (dd, 1H, H-2^{II}), 4.29 (dd, 1H, H-2^{IV}), 4.20-4.10 (m, 6H, H₆ x H-6), 4.13 (ddd, 1H, H-5^{II}), 4.12 (dd, 1H, H-4^{II}), 4.10 (dd, 1H, H-4^{III}), 4.07 (ddd, 1H, H-5^{III}), 3.81 (ddd, 1H, H-5^{IV}), 2.00-0.67 (m, 31H), 0.93 (d, 3H, CH₃), 0.87 (d, 3H, CH₃), 0.86 (d, 3H, CH₃), 0.83 (s, 3H, CH₃), 0.68 (s, 3H, CH₃).

25 Ejemplo 31. 2,3,4,6-Tetra-O-acetil-D-glucopiranosido de 8-pentadecanilo (141)

30 A una solución de peracetato de D-glucosa (250 mg, 640 μ mol) en DCE (1 mL) fue agregado 8-pentadecanol (220 mg, 960 μ mol). BF₃.O(Et)₂ (134 μ L, 1.1 mmol) fue agregado y la mezcla agitada a temperatura ambiente durante la noche antes de ser vertida sobre un lecho de sílice corto y eluida con EtOAc. El solvente fue evaporado antes de que el material sin procesar fuera purificado por una cromatografía de columna (SiO₂, cargada con DCM, elución con DCM (100 mL), luego 20% de EtOAc/Hexano a 35% de EtOAc/Hexano) para proporcionar el glicósido 141 como un sólido blanco (179 mg, 50%). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.19 (dd, 1H, J_{2,3} = 9.5, J_{3,4} = 0.0, H-3), 5.06 (dd, 1H, J_{4,5} = 9.7, H-4), 4.96 (dd, 1H, J_{1,2} = 8.0, J_{2,3} = 9.6, H-2), 4.52 (d, 1H, H-1), 4.21 (dd, 1H, J_{5,6b} = 5.2, J_{6a,6b} = 12.1, H-6b), 4.12 (dd, 1H, J_{5,6a} = 2.6, H-6a), 3.66 (ddd, 1H, J_{4,5} = 10.0, H-5), 3.53 (m, 1H, CH₂CHOCH₂), 2.07 (s, 3H, OCOCH₃), 2.02 (s, 6H, OCOCH₃), 2.00 (s, 3H, OCOCH₃), 1.60-1.20 (m, ~24H, CH₂), 0.88 (t, 3H, J = 7.0, CH₃), 0.87 (t, 3H, J = 7.0, CH₃).

D-glucopiranosido de 8-pentadecanilo (142)

40 El glicósido 141 (70 mg) fue desacetilado de acuerdo con un procedimiento general para proporcionar el poliol 142 (59 mg, cuantitativo) como un sólido blanco que fue reaccionado sin una purificación o caracterización adicional.

2,3,4,6-tetra-O-sulfo-D-glucopiranosido de 8-pentadecanilo, sal de tetrasodio (143)

45 Poliol 142 (50 mg) fue disuelto en DMF (5 mL). SO₃.piridina (250 mg) fue agregado y la solución agitada a temperatura ambiente durante la noche. La solución fue enfriada a 0°C y neutralizada con 2M NaOH a un pH de 10. La solución fue evaporada hasta la sequedad. El residuo fue disuelto en 4 mL de agua y purificado por una cromatografía de columna Bio-Gel P-2 (eluida con 0.1 M NH₄HCO₃, a 196 mL/h, 6 minutos por recolección). Las fracciones del producto fueron identificadas por MBT y CE. La liofilización proporcionó el producto **143** como un polvo amarillo pálido (33 mg, 32 %). ¹H RMN (400 MHz, D₂O) δ : 4.79 (d, 1H, J_{1,2} = 5.3, H-1), 4.67 (br, 1H), 4.45 (br, 1H, H-2), 4.28 (m, 2H), 4.28 (m, 2H), 3.68 (s, 1H), 1.52-1.38 (m, 4H), 1.32-1.10 (m, ~24H), 0.76-0.71 (m, 6H).

Prueba Biológica de los Compuestos

55 Prueba de Unión al Factor de Crecimiento

60 Las afinidades de unión de los compuestos para los factores de crecimiento FGF-1, FGF-2 y VEGF fueron medidas utilizando un análisis de afinidad de la solución basado en una resonancia de plasmones de superficie (SPR).⁹ Los chips de sensor recubiertos con heparina utilizados para esta prueba fueron preparados mediante la inmovilización de heparina-BSA biotinilada en un chip de sensor recubierto con estreptavidina, o mediante un acoplamiento de aldehído que utiliza ya sea un ácido adipico dehidrazida o 1,4-diaminobutano.⁹ Para cada medición K_d, las soluciones se prepararon de forma tal que contuvieran una concentración fija de proteína y concentraciones varias del ligando en un amortiguador. Los ligandos que se unieron a FGF-1 y VEGF fueron medidos en un amortiguador HBS-EP (10 mM HEPES, pH de 7.4, 150 mM NaCl, 3.0 mM EDTA y 0.005% (v/v) polisorbato 20), mientras que la unión a FGF-2 fue medida en un amortiguador HBS-EP que contenía 0.3 M NaCl. Antes de la inyección, las muestras fueron mantenidas a 4°C para maximizar la estabilidad de la proteína. Para cada mezcla de la prueba, 50 a 200 μ L de la solución fueron

inyectados a 5 a 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ y la respuesta de unión relativa medida. Todos los experimentos de unión a la superficie fueron llevados a cabo a 25°C . La superficie fue regenerada por la inyección de 40 μL de 4M NaCl a 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, seguido por la inyección de 40 μL de amortiguador a 40 $\mu\text{L}/\text{min}$.

5 Los datos del sensograma fueron analizados utilizando el software de BIAevaluation (BIAcore) y los valores K_d determinados tal y como fue descrito previamente.⁹ Donde los valores K_d fueron medidos por duplicado, los valores representan el promedio de las mediciones por duplicado. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Prueba de Inhibición de Heparanasa

10

La actividad enzimática de la heparanasa puede ser detectada al medir la escisión del sustrato fondaparinux.^{39,40} El disacárido reductor recientemente formado puede ser detectado al reaccionarlo con la sal mono-tetrazolio WST-1 (Ausprep Pty Ltd, Melbourne, Australia) para producir un color azul que puede ser medido con un lector de microplaca a 583 nm. En presencia de un inhibidor, la actividad catalítica de la heparanasa es reducida, y la cantidad de disacárido producido y la densidad óptica de la solución son ambas disminuidas. El porcentaje de inhibición presente y la IC_{50} del inhibidor son determinados a partir de las mediciones de la densidad óptica (OD) sobre un rango de concentraciones de inhibidor.

15

20

Las pruebas fueron llevadas a cabo en un amortiguador de acetato de sodio 40 mM, pH de 5.0, de la siguiente forma. Fondaparinux (100 μM) y varias concentraciones del inhibidor y del amortiguador para proporcionar un volumen final de 100 μL fueron mezcladas en placas con 96 pocillos. (Costar EIZ/RIA, Corning) recubiertas previamente con BSA. La heparanasa humana recombinante purificada (2.55 nM) fue luego agregada para comenzar la prueba. La placa fue incubada a 37°C durante 24 horas y la prueba fue detenida mediante la adición de una solución WST-1 (100 μL). Un color azul fue desarrollado por la incubación de las placas a 60°C durante 60 minutos. La OD fue determinada a 583 nm con un lector de microplaca (Fluostar) y cuantificado utilizando una curva estándar construida con D-galactosa azúcar reductor estándar. El valor IC_{50} para cada compuesto fue evaluado y convertido a K_i (constante de inhibición) utilizando la expresión

25

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[\text{sustrato}]}{K_m}}$$

30

La K_m (concentración del sustrato que lleva a una velocidad media-máxima) para fondaparinux fue determinada como de $33 \pm 6 \mu\text{M}$. Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Prueba de Proliferación de Células Endoteliales Inducida por el Factor de Crecimiento

Cultivo de células endoteliales

35

Las células HUVEC fueron mantenidas y subcultivadas de acuerdo con los protocolos de cultivo celular estándar esencialmente descritos por Lonza. Brevemente, las células fueron mantenidas en el medio de crecimiento endotelial Lonza (EGM) con los suplementos y factores de crecimiento recomendados (VEGF, FGF2, EFG, IGF, hidrocortisona, suero bovino fetal (FBS), ácido ascórbico, heparina y gentamicina). Las células fueron subcultivadas cuando alcanzaron 70 a 80% de confluencia por tripsinación y replantación en un medio de cultivo fresco en nuevos recipientes de cultivo 2500 a 5000 células/ cm^2 del área de la superficie del recipiente. Los conteos celulares fueron llevados a cabo utilizando un hemocitómetro, y las células viables fueron visualizadas con azul de tripano.

40

45

El medio para los estudios de la proliferación fue preparado utilizando EGM con 2% de FBS y únicamente gentamicina. En un estudio posterior, el EGM completo fue utilizado para los grupos VEGF en un intento para mejorar el índice de proliferación de los grupos estimulados con VEGF. Para la prueba de formación de tubo, el medio completo fue utilizado, siendo únicamente omitida la heparina. Los compuestos en investigación fueron pesados a partir de reservas en polvo y diluidos en PBS para obtener soluciones patrón de 10 mM y almacenados a -80°C . Para los experimentos, los compuestos fueron subsecuentemente diluidos en un medio EBM-2 (suplementado con 2% de FBS y gentamicina) a varias concentraciones de trabajo, según fue necesario.

50

Prueba de Proliferación

55

La proliferación fue inducida por HUVECs utilizando varias concentraciones de los factores de crecimiento VEGF, FGF-1 o FGF-2 durante un período de 72 horas. En la primera serie de experimentos, la prueba fue optimizada de forma adicional al examinar la densidad celular y la concentración de factor de crecimiento requerida para inducir una proliferación máxima por parte de los factores de crecimiento. Brevemente, 100 μL de células fueron agregados a cada pocillo a concentraciones de entre $1,3 \times 10^3$ por pocillo. Los factores de crecimiento y los compuestos de prueba fueron luego agregados en volúmenes de 50 μL a concentraciones especificadas para obtener un volumen final de 200 μL . Luego de incubar durante 70 horas, 20 μL de la Prueba de Proliferación Celular en Una Solución Acuosa CellTrite 96@

60

(Promega) fue agregada durante 2 horas antes de leer la absorción a 490 nm para obtener valores de OD. Los datos se presentan en la Tabla 2.

Prueba de Formación de Microtúbulos Matrigel™

5 La prueba de formación de tubos fue llevada a cabo esencialmente tal y como es descrito por Malinda y otros, con modificaciones.⁴¹ HUVECs en el cuarto o quinto pasaje a una confluencia de 70 a 80% fueron cosechadas y resuspendidas en un medio de cultivo endotelial Lonza (EGM2) que contenía todos los suplementos indicados por el fabricante, excepto heparina, a una densidad celular de 4×10^5 células por mL. Para cada conjunto de pocillos triplicados, 200 μ L de células (4×10^5 /mL) fueron tratados con un volumen igual del compuesto para obtener las concentraciones finales de 10, 50 o 100 μ M (asegurándose de esta forma que hubiera 1 x 300 μ L disponible para cada condición). Una parte alícuota de células de 100 μ L fue luego colocada sobre placas de 96 pocillos recubiertos previamente con Matrigel™ reducido en factor de crecimiento (50 μ L durante 30 minutos seguido por unos 30 μ L adicionales durante 1 hora) e incubada durante 18 a 22 horas. La formación de tubos fue examinada por una microscopía de contraste de fases y las imágenes fueron recolectadas utilizando una cámara digital Olympus C5050. La inhibición de la formación de tubos fue cuantificada manualmente a partir de imágenes registrando el número total de nodos que se conectan a 3 o más túbulos. Los resultados son expresados como un porcentaje de inhibición comparado con el control, y se presentan en la Tabla 2. Las HUVECs no tratados fueron utilizados como un control para el crecimiento celular normal, y la formación de tubos en Matrigel.

Prueba de Migración de células endoteliales

25 El Sistema de Angiogénesis BioCoat™ BD fue utilizado como una plataforma de prueba de migración de células endoteliales cuantitativa *in vitro*. Está compuesto de una Placa de Inserción con 24-Multipocillos BD Falcon™ (y una placa receptora de 24 pocillos no tratada con TC y una tapa), que contiene una membrana PET microporosa que bloquea la fluorescencia (3.0 μ m tamaño de poro) (BD FluoroBlok™), recubierta uniformemente con fibronectina humana. La concentración de fibronectina y el procedimiento de recubrimiento está optimizado de forma que los poros de la membrana no sean ocluidos. Esto permite que las células endoteliales se adhieran a la membrana y migren libremente hacia un estímulo angiogénico en la cámara más baja de la placa. Un lector de placa fluorescente es utilizado para cuantificar las células que migran sin una manipulación adicional. En este caso, las células fueron marcadas con una tinta fluorescente después de la migración.

35 Brevemente, 200 μ L de HUVECs a una concentración de 2.5×10^5 /mL fueron colocadas en las cámaras superiores de cada pozo de la placa con 24 pocillos suministrada en el kit. Los compuestos fueron luego agregados con varias concentraciones (comúnmente 10 y/o 50 μ g/mL) con el medio solo (EBM-2) utilizado como el grupo de control no tratado. Debido a un desempeño de migración pobre de HUVEC estimuladas con FEG-2 o VEGF en nuestro laboratorio, 10% del suero de becerro fetal (FCS) fue utilizado ya que aumentó más de 6 veces la migración de HUVEC en comparación con HUVEC cultivadas en el medio sin FCS. Por lo tanto, 750 μ L del medio con 10% de FCS fue agregado a las cámaras inferiores para actuar como el estímulo migratorio y las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C/5% de CO₂ durante 18 horas. Tras el tiempo de incubación, la placa superior fue transferida a una placa nueva con 24 pocillos inferior y 500 μ L de calceína AM fue agregada para teñir las células migradas por debajo de la membrana porosa durante 90 minutos a 37°C. La fluorescencia fue medida utilizando un FLUOstar Optima (laboratorios BMG) con una excitación y filtro de emisión de 485 nm y 520 nm, respectivamente. Los datos son mostrados como el porcentaje de inhibición de migración en comparación con HUVEC inducidas por FCS (Tabla 3).

Prueba de Brote Angiogénico *Ex Vivo*

50 Los explantes de las aortas de rata fueron preparados mediante una modificación de los protocolos previamente descritos⁴²⁻⁴⁵. En este modelo, el endotelio de la aorta de la rata fue expuesto a una matriz tridimensional de proteínas derivadas de ECM (Matrigel™), cambia a un fenotipo microvascular, y genera redes de trabajo de ramificación de microvasos. La angiogénesis es generada por la lesión provocada por el procedimiento de disección, y no requiere de la estimulación de factores de crecimiento exógenos.

55 Brevemente, las aortas torácicas fueron separadas de ratas Spargue Dawley de 2 a 4 meses y se les quitó la grasa y el tejido conectivo restante. Se tuvo mucho cuidado en cada etapa para reducir el daño físico de la aorta. El tejido fue transferido para completar el medio EBM-2 (Cambrex) que contenía 2% de FCS y todos los reactivos (Cambrex singlequots™, excepto heparina. Mientras tanto, Matrigel™ (BD Biosciences) se dejó enfriar en hielo y una vez que se encontró en forma líquida, 180 μ L fue introducido dentro de placas de cultivo tisular de 48 pocillos (Nunc.). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos para permitir que el Matrigel™ se solidificara.

60 Las aortas fueron preparadas cortando secciones de anillo de 1 mm y luego diseccionando. Los segmentos aórticos fueron luego colocados cuidadosamente encima del Matrigel™ en el centro de cada pozo y una vez orientados tal y como fue requerido, 60 μ L de Matrigel™ extra fue colocado encima y la placa fue regresada al incubador por unos 20 minutos adicionales. Cada pozo fue a continuación suplementado con un medio de 1.0 mL en la ausencia (control) o presencia de los compuestos de prueba, normalmente a dos concentraciones dentro del rango de 1 a 50 μ M, dependiendo del compuesto/experimento particular. Los cultivos fueron rellenados de forma apropiada cada 48 horas y

la puntuación de los microvasos fue llevada a cabo en varios momentos de 8 a 10 días. El grado de brote de microvasos fue determinado empleando un sistema de puntuación de 0 a 5, donde 0 = sin microvasos a 5= angiogénesis difusa, tal y como fue previamente descrito ⁴⁵. El brote de los vasos fue fotografiado utilizando el objetivo 4x con una cámara Olympus C-7070 y un adaptador para el ocular.

En ciertos casos, para determinar la toxicidad potencial de los compuestos de esta prueba, la viabilidad del tejido fue evaluado retirando el compuesto/medio del cultivo en el día 6 o 7 y agregando un medio completo con VEGF (comúnmente 10ng/mL) durante hasta 7 días más. En la ausencia de toxicidad, el tejido viable deberá brotar microvasos en respuesta al factor de crecimiento exógeno.

El efecto de inhibición de los compuesto de la presente invención sobre la angiogénesis fue probado utilizando la prueba de brote angiogénico/formación de microvasos (aórtica de rata) descrita anteriormente. El incrustamiento del tejido aórtico de rata en MatrigelTM en ausencia de cualquier inhibidor (control) proporcionó un brote angiogénico extensivo (una puntuación de 5 indica una angiogénesis difusa), tal y como fue ilustrado por la Figura 1.

La agregación de PI-88 y PG524 (un análogo menos lipofílico) llevó a una respuesta de inhibición fuerte de 10 y 50 μ M. Sin embargo, los compuestos de la presente invención demostraron una potencia adicional el inhibir la angiogénesis hasta 100% a 10 μ M. Los resultados son presentados en la Tabla 4 a continuación.

Para examinar la viabilidad del tejido aórtico, siguiendo el tratamiento con los compuestos mencionados anteriormente, la remoción de estos compuestos en el día 6 o 7 (dependiendo del experimento individual) fue seguido por el tratamiento con VEGF durante hasta e 7 días más. La aparición de brotes de microvasos demostró que los compuestos de la presente invención ejercen sus efectos de inhibición mediante un mecanismo antiangiogénico en lugar de la inducción de un efecto tóxico en el tejido (Figura 2 a continuación).

Actividad Anticoagulante

La actividad anticoagulante de los compuestos de prueba fue determinada midiendo el efecto de varias concentraciones del compuesto (0 a 100 μ g/mL en PBS) en la elevación del tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) de plasma humano normal combinado. Las mediciones de APTT fueron llevadas a cabo en un Aalizador de Coagulación Compacto STA STAGO utilizando protocolos estándar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La heparina no fraccionada (UFH) fue utilizada como un control. El rango normal de APTT para el plasma humano normal combinado es de 26 a 36 segundos. Los resultados se presentan en la Tabla 5, que muestra que los nuevos compuestos poseen únicamente una actividad anticoagulante leve y son significativamente menos potentes que PI-88.

Modelo de Melanoma de Ratón *In Vivo*

El melanoma B16 es una línea celular comúnmente utilizada para la inducción de tumores en ratones singénicos C57/BL6. Es un tumor no metastásico de rápido crecimiento que no responde a la mayoría de los agentes contra el cáncer.

Las células B16F1 fueron cultivadas en un medio DMEM completo con 10% de FCS, penicilina/estreptomicina, L-glutamina, piruvato de sodio, 2-mercapoetanol. Las células fueron cultivadas para una inoculación de tumor, las células B16F1 mediante disrupción con Tripsin/EDTA, lavadas con HBSS y centrifugadas durante 5 minutos a 1500 rpm. Las células fueron luego resuspendidas en PBS para asegurar que 5×10^5 células fuesen inyectadas en un volumen de 50 μ L. El tumor fue implantado justo detrás del cuello. Tres días después de la inoculación del tumor, cada grupo de tratamiento fue inyectado de forma subcutánea en diferentes sitios cada día y con diferentes concentraciones en un volumen de inyección de 50 o 100 μ L. Las inyecciones continuaron hasta el día 15, proporcionando un período de tratamiento de 12 días. Los ratones fueron monitoreados diariamente desde el inicio de las inyecciones y los tumores palpables fueron medidos diariamente. El tamaño del tumor fue determinado a partir de la medición en dos dimensiones, $1 \times w$, donde 1= la dimensión más larga y w = la dimensión más corta. Para estimar el volumen del tumor, la fórmula $0.5 \times 1 \times (w^2)$ fue utilizada. Los datos son presentados tanto como mediana del crecimiento tumoral y como el porcentaje de la inhibición del crecimiento del tumor (%TGI). El cálculo de %TGI fue llevado a cabo para corregir las diferencias dentro de experimento.

Dado que se mostró que los compuestos de la presente invención inhiben la formación de brotes angiogénicos, y dado que la progresión del tumor depende de la angiogénesis, el efecto de estos compuestos en el crecimiento del tumor primario y la supervivencia general se analizaron tal y como fue descrito anteriormente. La Figura 3 proporciona una ilustración de la mediana de los volúmenes de tumor típicos a partir de varios estudios que examinaron los compuestos de la presente invención en el modelo de melanoma B16.

Para datos comparativos directos, los resultados mostrados en la Figura 4 indican el tamaño de tumor relativo disminuido de los ratones que tienen un tumor en comparación con el control relevante, y se muestra como un parámetro conocido como el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral (%TGI). Los valores de TGI fueron calculados utilizando la fórmula $TGI = [1 - (\Delta T/\Delta C)] \times 100$, donde ΔT y ΔC representan el cambio en la masa del tumor media entre el último día de terapia y el primer día de terapia en el grupo tratado con el compuesto de la muestra (T) y el

grupo de control de vehículo (C), respectivamente.
Modelo de Metástasis de Pulmón en Ratón *In Vivo*

5 Cuando las células B16F1, cultivadas tal y como fue descrito anteriormente para el modelo de melanoma de ratón de tumor sólido B16, son inyectadas mediante la vena de la cola dentro de los ratones, resulta la formación de nódulos metastásicos en los pulmones. Dado que las células de los tumores son negras, la observación de los nódulos metastásicos son fácilmente identificables. La Figura 5 muestra los pulmones de ratones de control y tratados con el compuesto, con obvias diferencias en la formación de colonias en el pulmón (manchas negras).

10 En el modelo de metástasis, las células B16 (2×10^5) fueron inyectadas mediante la vena de la cola de los ratones C57/BL6 en un volumen de 50 μ L en el día 0. El tratamiento con los compuestos de prueba comenzó en el día 0 y continuó diariamente durante 12 días. El número de metástasis de pulmón fue enumerado en el día 12 del experimento. Los resultados mostrados en la figura 6 indican que los compuestos seleccionados mantienen la inhibición potente de la metástasis de pulmón exhibida por PI-88. Los datos son mostrados como el porcentaje de nódulos metastásicos observados en comparación con el control salino.

Modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal HT29 *In vivo*

20 Las células de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 (Pasaje 4 de la pila de trabajo 4 VP-Pila 325) fueron cultivadas en el medio de cultivo celular RPMI1640, el cual fue suplementado con 10% de FBS y penicilina-estreptomicina (50 IU/mL de concentración final). Las células fueron cultivadas por la tripsinización, lavadas dos veces en HBSS y contadas. Las células fueron luego resuspendidas en HBSS y ajustadas a un volumen final que contenía 2×10^7 células/mL. Antes de la inoculación del sitio de inyección, el flanco derecho dorsal fue limpiado con abundante alcohol, y la aguja introducida a través de la piel dentro del espacio subcutáneo justo debajo del hombro derecho del animal, donde 100 μ L de células (2×10^6 células) fueron descargadas. El tratamiento de los ratones comenzó con un promedio de volumen de tumor de aproximadamente 155 mm^3 . Los tumores fueron medidos en dos dimensiones (longitud y diámetro) y el volumen del tumor fue calculado utilizando la ecuación:

$$V(\text{mm}^3) = \text{longitud} \times \text{diámetro}^2 \times \pi/6$$

30 El control de vehículo, PBS estéril, fue administrado s.c., a un volumen de dosis de 10 mL/kg, una vez al día durante 21 días. El peso corporal de cada animal fue medido inmediatamente antes de la dosis de cada día. El volumen real administrado a cada ratón fue calculado y ajustado con base en el peso corporal. Los resultados presentados en la Figura 7 demuestran que los compuestos seleccionados poseen una actividad contra el cáncer utilizando el modelo de tumor de ratón de cáncer colorrectal. Todos los compuestos mostraron una actividad mejorada en comparación con PI-88, el cual no fue particularmente efectivo en este modelo.

Actividad Antiviral

40 Los resultados de las pruebas antivirales son presentados en las Tablas 6 a 10.

Células y virus

45 Las células de riñón de mono verde africano⁴⁶ (GMK AH) fueron cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM) suplementado con 2% de suero de becerro, 0.05% de una sustancia de Primaton RL (Kraft Inc., Norwich, EUA) y antibióticos. Las células de carcinoma epidermoide humanas (HEp-2) fueron cultivadas en el EMEM modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero de becerro fetal y antibióticos. Las cepas de HSV utilizadas fueron HSV-1 KOS321, un aislado purificado en placa de la cepa de tipo salvaje KOS⁴⁷, HSV-1 KOS gC- variante nula de gC³⁹⁴⁸, y la cepa de HSV-2 333⁴⁹. La cepa RSV A-2⁵⁰ fue utilizada. La reserva de RSV fue preparada tal y como fue descrito por Hallak y otros⁵¹, y almacenado a -70°C en presencia de 40% de sacarosa⁵².

Purificación de virus y prueba de unión de virus a células

55 Los viriones de HSV extracelulares marcados con metil- ^3H timidina HSV fueron purificados por centrifugación mediante un gradiente de sacarosa discontinuo de tres pasos tal y como fue previamente descrito^{53,54}. El efecto del compuesto de prueba en la unión del virus marcado con metil- ^3H timidina purificado a las células GMK AH¹ a 4°C fue probado tal y como fue descrito anteriormente¹⁷. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS-A (PBS suplementado con 1mM CaCl_2 y 0.5 mM MgCl_2) y luego bloqueadas con PBS-A que contenía 1% de BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Diluciones seriales de cinco veces el compuesto de prueba en el PBS-A fueron mezcladas con viriones modificados e incubadas durante 15 minutos a 4°C . Las células fueron lavadas una vez con PBS-A, y la mezcla de compuesto-virus agregada e incubada con las células bajo una agitación moderada durante 2 horas a 4°C . Subsecuentemente las células fueron lavadas tres veces con PBS-A, lisadas con 0.2 mL de PBS-A que contenía 5% de SDS, y finalmente transferidas a frascos de centelleo para una cuantificación de radioactividad.

65 *Prueba de desactivación de virus*

Aproximadamente 10^5 unidades de formación de placa 10^5 de las manchas de HSV-1 KOS321 o HSV-2 333 y concentraciones específicas del compuesto de prueba en 200 μ L de EMEM libre de suero fueron mezcladas e incubadas a 37°C durante 15 minutos. Las mezclas fueron diluidas a las concentraciones no inhibitorias del compuesto de prueba, y luego fueron sometidas a la determinación de titulación infecciosa tal y como fue descrito en la prueba de reducción de número de placas virales. En el caso de RSV, la prueba fue llevada a cabo de forma similar utilizando DMEM suplementado con 2% de suero de becerro fetal desactivado por calor en lugar de EMEM. Para evaluar el efecto de un pH bajo o la presencia de secreciones cervicales, el virus (HSV-2 333) y los compuestos fueron diluidos en un amortiguador de pH bajo (4.5) o las secreciones cervicales fueron agregadas a las diluciones del compuesto antes de ser mezclados con el virus (HSV-2 333). Las secreciones cervicales fueron preparadas a partir de hisopados cervicales generados a partir de 3 individuos diferentes. Los hisopados se lavaron con agua destilada y centrifugados a 5000 x g durante 10 min. El sobrenadante fue mantenido a -20°C. En el caso de RSV, la prueba fue llevada a cabo de una forma similar utilizando DMEM suplementado con 2% de suero de becerro fetal desactivado por calor en lugar de EMEM.

15 *Pruebas de placas virales*

La prueba de infección viral (la reducción de número de placa) y la prueba de reducción de tamaño de placa fueron llevadas a cabo tal y como fue descrito anteriormente¹⁷. Brevemente, para la prueba de reducción de número de placa, las mezclas de compuesto-virus se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de la agregación a células y durante un período de 1 hora de infección de virus de células a 37°C. Subsecuentemente, las células fueron lavadas con 2 mL de EMEM y recubiertas con 1% de una solución de metilcelulosa en EMEM. Las placas fueron visualizadas al mancharlas con una solución de violeta cristal después de 2 días (HSV-2) o 3 días (HSV-1) de incubación a 37°C. La concentración del compuesto de prueba que inhibió el número de placas virales un 50% (IC_{50}) fue interpolada a partir de las curvas de respuesta a la dosis. Cuando los compuestos fueron evaluados para la actividad anti-HSV o anti-RSV, las mezclas de 200 PFU del virus y el compuesto de prueba (100 μ g/ml) en EMEM libre suero fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de la agregación a células y durante el período completo de infección viral de las células y el desarrollo de las placas virales. En la prueba de reducción de tamaño de placa, los compuestos fueron agregados a células (en un medio de revestimiento de metilcelulosa) después de un período de 2 horas de infección de virus de las células en ausencia del inhibidor. Después de 2 a 3 días de incubación a 37°C, las placas virales fueron visualizadas tiñendo las células con 1% de solución de violeta cristal. Para cada compuesto probado, las imágenes de veinte placas aledañas fueron capturadas utilizando una cámara digital Leica DC300 adherida al microscopio Leitz-Wetzlar Diavert. El área de cada placa fue determinada utilizando un software de imagen IM500 (Leica). Protocolos similares fueron utilizados para RSV, excepto que las pruebas fueron llevadas a cabo en células HEP-2 y DMEM suplementado con 2% de suero de becerro fetal desactivado por calor fue utilizado en lugar de EMEM.

35 *Prueba de citotoxicidad*

La prueba fue llevada a cabo en células GMK AH1 que habían sido plantadas en placas de grupos de 96 pocillos y que alcanzaron aproximadamente de 80 a 90% de confluencia en el día 2 de cultivo. Las células fueron lavadas con EMEM e incubadas durante 24 horas a 37°C con 100 μ L de diluciones de dos veces en serie del compuesto de prueba en un EMEM libre de suero. El efecto del compuesto de prueba en la viabilidad celular fue medido utilizando la prueba CellTiter96 basada en tetrazolio de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega, Masidos, WI, EUA).

Las realizaciones anteriores son ilustrativas únicamente de los principios de la presente invención, y varias modificaciones y cambios se les ocurrirán fácilmente a aquellos expertos en la técnica. La presente invención es capaz de ser practicada y llevada a cabo en varias formas y en otras realizaciones. Deberá ser también entendido que la terminología empleada en la presente invención es para el propósito de descripción y no deberá de ser reconocida como limitante.

El término "comprende" y variantes de los términos tales como "comprende" o "que comprende" son utilizados en la presente invención para denotar la inclusión de un número entero expresado o números enteros expresados, pero no excluyen cualquier otro número entero o cualesquiera otros números enteros, a no ser que el contexto o el uso de una interpretación exclusiva del término sea requerido.

55 Tabla 1. Los resultados de las pruebas de unión al factor de crecimiento y de inhibición de heparanasa tal y como fueron descritas en las secciones anteriores.

Compuesto	K_d VEGF (nM)	K_d FGF-1 (nM)	K_d FGF-2 (nM)	K_i Heparanasa (nM)
4	12 ± 3	6 ± 3	480 ± 70	4.2 ± 0.5
8	5.1 ± 1.8	2.3 ± 1.3	253 ± 25	3.5 ± 0.4
11	0.79 ± 0.24	0.19 ± 0.10	73 ± 23	4.8 ± 1.8
17	24 ± 6	3.2 ± 0.5	ND	ND
20	22 ± 6	0.60 ± 0.50	160 ± 40	5.8 ± 1.5
24	40 ± 17	0.44 ± 0.04	108 ± 11	6.0 ± 2.1
27	1.04 ± 0.19	0.24 ± 0.10	39 ± 6	5.5 ± 2.6
33	1300 ± 300	270 ± 30	1570 ± 150	22.3 ± 1.6
39	319 ± 19	18.5 ± 1.8	631 ± 4	6.4 ± 2.5
44	2.7 ± 0.5	0.17 ± 0.07	80 ± 40	4.4 ± 1.4
48	460 ± 30	22.6 ± 1.0	480 ± 40	8.50 ± 0.14
56	90 ± 30	16 ± 7	490 ± 40	10.5 ± 1.7
60	260 ± 130	14.3 ± 3.0	474.0 ± 1.4	8.4 ± 2.6
65	28.9 ± 2.3	8 ± 4	390 ± 80	6.1 ± 2.5
70	95 ± 8	9.7 ± 0.8	390 ± 90	3.7 ± 0.8
76	790 ± 230	50 ± 8	610 ± 60	16 ± 4
79	3000 ± 400	3600 ± 600	> 3000	111 ± 28
83	7.95 ± 0.07	1.25 ± 0.07	50 ± 4	20 ± 5
87	190 ± 60	24.8 ± 2.3	547 ± 50	9.1 ± 2.5

Compuesto	K_d VEGF (nM)	K_d FGF-1 (nM)	K_d FGF-2 (nM)	K_i Heparanasa (nM)
93	1600 ± 300	610 ± 210	1800 ± 300	30 ± 7
97	1930 ± 230	840 ± 130	3400 ± 300	ND
102	1200 ± 400	560 ± 30	2200 ± 400	ND
107	1350 ± 70	870 ± 60	2000 ± 400	ND
112	430 ± 140	900 ± 150	2100 ± 300	ND
119	7.9 ± 0.7	5.9 ± 1.6	286 ± 25	ND
123	380 ± 110	32.2 ± 2.3	530 ± 50	11.3 ± 0.4
128	14 ± 4	4.94 ± 0.08	311 ± 25	9.1 ± 0.3
134	1080 ± 200	13 ± 3	630 ± 30	ND
139	379 ± 13	72 ± 12	880 ± 110	ND
140	12 ± 2	1.3 ± 0.6	380 ± 40	ND

5 Tabla 2. Datos para los compuestos seleccionados en la prueba de proliferación de células endoteliales inducida por el factor de crecimiento y la prueba de formación de microtúbulos Matrigel™. a) valores de IC₅₀ (μM) para la inhibición de

la proliferación de HUVEC inducida por FGF-1, FGF-2 y VEGF; b) % de Inhibición de la formación de microtúbulos a 10 μM con relación a los controles.

Compuesto	FGF-1 (IC ₅₀ , μM)	FGF-2 (IC ₅₀ , μM)	VEGF (IC ₅₀ , μM)	% de Inhibición de formación de microtúbulos a 10 μM
PI-88	42	10	20	29%
4	25	10	6.54	ND
8	10.1	8.1	5.4	27%
11	33	17.0	19.5	ND
17	4.29	3.44	5.75	71%
20	1.29	0.847	1.18	73%
24	1.54	0.665	0.580	90%
27	0.990	0.390	0.220	74%
33	>10	2.22	1.85	14%
39	4.44	2.27	0.951	74%
44	3.79	0.349	1.18	95%
48	3.81	1.74	2.08	64%
56	2.52	1.80	1.72	67%
60	2.61	1.22	1.44	49%
65	1.2	0.65	0.50	53%
70	2.3	0.64	2.2	52%
76	2.1	1.2	1.8	22%
79	2.20	2.90	2.24	3% de mejoramiento
83	>50.0	>50.0	>50.0	ND
87	2.5	2.3	1.6	20%
93	2.69	2.43	2.62	ND
97	4.09	4.17	1.13	ND
102	3.95	>10	5.17	ND
107	5.75	5.59	5.56	ND
119	4.04	2.69	2.01	32%

Compuesto	FGF-1 (IC ₅₀ , μM)	FGF-2 (IC ₅₀ , μM)	VEGF (IC ₅₀ , μM)	% de Inhibición de formación de microtúbulos a 10 μM
123	1.69	1.7	1.1	33%
128	0.47	0.77	0.24	ND
134	1.47	1.28	2.14	63%
139	2.16	1.5	2.31	36%
140	0.56	0.005	1.1	37%

5 Tabla 3. Inhibición de la migración de HUVEC tal y como fue expresado por el porcentaje de inhibición del control por PI-88, un análogo menos lipofílico (PG254) y compuestos seleccionados con concentraciones de 10 y 50 μM .

Compuesto	% de Inhibición de Migración	
	10 μ M	50 μ M
PI-88	10	11
PG524	3	7
20	48	99
24	17	61
27	48	96

Tabla 4. Efecto de PI-88, un análogo menos lipofílico (PG524) y compuestos de prueba seleccionados en la formación de brotes angiogénicos en la prueba de angiogénesis aórtica de rata.

Compuesto	% de Inhibición de Angiogénesis (10 μ M)
PI-88	61
PG524	65
20	100
24	69
27	100
65	90
70	97
76	80
87	47
123	23
128	65
134	100
139	92
140	88

5 Tabla 5: Actividad anticoagulante de compuestos seleccionados. Tiempo que tarda el plasma humano combinado normal en coagular en las pruebas APTT y Heptest, después de la agregación de los compuestos de prueba a 0.1 mg/mL.

Compuesto	APTT (s)	Heptest (s)	Compuesto	APTT (s)	Heptest (s)
PI-88	>500.0	>500.0	76	61.2	30.2
4	125.9	64.2	79	36.1	23.9
20	94.0	28.0	83	41.0	26.8
24	68.1	24.5	87	51.6	29.2
27	63.3	29.6	93	39.6	25.3
33	40.6	25.5	97	40.3	26.7
39	50.7	27.3	102	38.6	23.9
44	217.0	58.5	107	38.8	25.3
48	73.3	33.1	112	38.9	25.4
56	58.5	24.2	119	57.1	28.6
60	71.4	26.4	123	51.1	24.9
65	71.9	28.6	128	65.8	32.2
70	104.0	45.5	Control de Plasma	35.0	24.4

Tabla 6. Actividad anti-HSV y anti-RSV de los compuestos encontrada en una prueba de detección sistemática

Compuesto	Infectividad residual (%) ^a		
	HSV-1	HSV-2	RSV
PI-88	5	3	19
4	2	0.7	0
8	7	0.2	3
11	0	0	0
20	0	0	0

^a Porcentaje de un número de placas virales encontradas con un virus tratado con fármaco (100 µg/mL) con relación a los controles tratados de forma simulada.

Tabla 7. Actividad antiviral y citotoxicidad de los compuestos de prueba

Compuesto	Citotoxicidad CC ₅₀ ^a		IC ₅₀ (Índice selectivo CC ₅₀ /IC ₅₀) ^b		
	GMK AH1	HEp-2	HSV-1	HSV-2	RSV
PI-88	>1000	> 400	7 (>143)	1.1 (>909)	9.9 (>40)
4	>400	>400	2.1 (>190)	0.9 (>444)	4.6 (>87)
11	>400	NT	1.8 (>222)	0.9 (>444)	5.7
20	110	113	2.1 (52)	1.1 (100)	1.7 (66)

^a Concentración del compuesto (µg/mL) que redujo la viabilidad de células GMK AH1 o la viabilidad celular HEp-2 a 50%.

5 ^b Concentración de un compuesto de prueba que redujo el número de placas HSV en células GMK AH1 o placas RSV en células HEp-2 un 50%. Entre paréntesis se encuentran los valores del índice de selectividad.

Tabla 8. Actividades de desactivación de virus de los compuestos de prueba^a

Virus	Concentración del Compuesto (µg/ml)	Compuesto		
		PI-88	4	20
HSV-1	100	100.3	83.8	0
	10	108.0	79.4	0
	1	99.8	83.9	88.6
HSV-2	100	107.7	68.1	0
	10	102.9	97.5	0.3
	1	95.1	98.6	120.3
RSV	100	94.0	47.3	13.3
	20	95.0	82.2	79.0
	4	105.8	85.2	102.2

10 ^a Aproximadamente 2 x 10⁵ PFU del virus respectivo fue coincubado con PI-88 (µg/mL), el compuesto de prueba o el medio de diluyente (control) durante 15 minutos a 37°C antes de la dilución de las mezclas 1:500 o 1:1000 y tritulación de placa viral. Los resultados son expresados como un porcentaje del número de placas virales detectadas con el virus tratado con el compuesto con relación a los controles tratados de forma simulada.

15 Tabla 9. Actividad Anti-HSV de los compuestos de prueba

Compuesto	HSV-2 IC ₅₀ (µg/ml) ^a	RSV IC ₅₀ (µg/ml) ^a
24	1.8	0.45
27	0.52	0.28
33	0.7	1.8
39	1.1	0.61
44	0.41	0.33
48	0.18	0.25
56	0.3	0.45
60	0.24	0.39
65	0.45	0.35
70	0.15 0.25 ^b	0.23
76	0.07 0.20 ^b	0.37
79	0.28	2.9
83	6.0	3.0
87	0.53	0.77
93	0.27	0.4
97	0.26	0.58
102	0.43	1.8
107	0.43	1.9
112	0.45	2.4
119	2.1	0.62
128	1.0	1.4

^a Concentración del compuesto de prueba que redujo el número de placas virales en células GMK AH1 un 50%

^b Concentración del compuesto de prueba que redujo el número de placas de la cepa HSV-1 HOS321 en células GMK AH1 un 50%

5

Tabla 10. Modulación de las actividades que desactivan el virus de PI-88 y el compuesto 20 a un pH bajo y en la presencia de secreciones cervicales humanas^a.

Virus	Concentración del compuesto (µg/ml)	Compuesto			
		PI-88		20	
		Bajo pH ^b	CS ^c	Bajo pH ^b	CS ^c
HSV-2	100	111.5	90,3	0.0	0,3
	10	110.8	98,3	6.8	78,5
	1	101.1	88,4	93.7	82,6

ES 2 584 927 T3

^a Aproximadamente 2×10^5 PFU del virus respectivo fueron coincubadas con PI-88 ($\mu\text{g/ml}$), el compuesto de prueba o el medio de dilución (control) durante 15 minutos a 37°C (baño de agua) antes de la dilución de las mezclas 1:500 a 1:1000 y tritulación de la placa viral. Los resultados son expresados como un porcentaje del número de placas virales detectadas con el virus tratado con el compuesto con relación a los controles tratados de forma simulada.

5

^b El valor de pH durante la incubación del compuesto-virus fue de 4.5.

^c Secreciones cervicales diluidas en una proporción 1:2.2 estuvieron presentes durante los 15 minutos del compuesto-virus.

10

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. *Patente Norteamericana* 6, 143, 730, 2000.
- 5 3. Iversen, P. O.; Sorenson, D. R.; Benestad, H. B. *Leukemia* 2002, 16, 2>16.
4. Joyce, J. A.; Freeman, C; Meyer-Morse, N.; Parish, C. R.; Hanahan, D. *Oncogene* 2005, 24, 4037.
5. Basche, M.; Gustafson, D. L.; Holden, S. N.; O'Bryant, C. L.; Gore, L.; Wirta, S.; Schultz, M. K.; Morrow, M.; Levin, A.; Creese, B. R.; Kangas, M.; Roberts, K.; Nguyen, T.; Davis, K.; Addison, R. S.; Moore, J. C; Eckhardt, S. G. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 5471.
- 10 6. Ferro, V.; Dredge, K.; Liu, L.; Hammond, E.; Bytheway, L; Li, C; Johnstone, K.; Karoli, T.; Davis, K.; Copeman, E.; Gautam, A. *Semin. Thromb. Hemost.* 2007, 33, 557.
7. Ferro, V.; Li, C; Fewings, K.; Palermo, M. C; Linhardt, R. J.; Toida, T. *Carbohydr. Res.* 2002, 337, 139.
8. 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.
- 15 9. Cochran, S.; Li, C; Fairweather, J. K.; Kett, W. C; Coombe, D. R.; Ferro, V. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 4601.
10. Vlodavsky, I.; Friedmann, Y. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 341.
11. Parish, C. R.; Freeman, C; Hulett, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1471, M99.
12. 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.
- 20 13. Wall, D.; Douglas, S.; Ferro, V.; Cowden, W.; Parish, C. *Thromb. Res.* 2001, 103, 325.
14. Hembrough, T. A.; Ruiz, J. F.; Papathanassiou, A. E.; Green, S. J.; Strickland, D. K. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 12241.
15. Amirkhosravi, A.; Meyer, T.; Chang, J. Y.; Amaya, M.; Siddiqui, F.; Desai, H.; Francis, J. L. *Thromb. Haemost.* 2002, 87, 930.
- 25 16. 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.
17. Nyberg, K.; Ekblad, M.; Bergstrom, T.; Freeman, C; Parish, C. R.; Ferro, V.; Trybala, E. *Antiviral Res.* 2004, 63, 15.
- 30 18. Lee, E.; Pavy, M.; Young, N.; Freeman, C; Lobigs, M. *Antiviral Res.* 2006, 69, 31.
19. Levidiotis, V.; Freeman, C; Punier, 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.
20. Adams, Y.; Freeman, C; Schwartz-Albiez, R.; Ferro, V.; Parish, C. R.; Andrews, K. T. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50, 2850.
- 35 21. Ferro, V.; Hammond, E.; Fairweather, J. K. *Mini-Rev. Med. Chem.* 2004, 4, 159.
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. *Patente Norteamericana* 5,739,115, 1998.
24. Gunay, N. S.; Linhardt, R. J. *Planta Med.* 1999, 65, 301.
- 40 25. Katsuraya, K.; Nakashima, H.; Yamamoto, N.; Uryu, T. *Carbohydr. Res.* 1999, 315, 234.
26. Wessel, H. P. *Topics Curr. Chem.* 1997, 187, 215.
27. Ferro, V.; Fairweather, J. K.; Karoli, T.; Liu, L. *PCT Solicitud Internacional. WO 2005/085264 A1*, 2005.
28. Karoli, T.; Liu, L.; Fairweather, J. K.; Hammond, E.; Li, C. P.; Cochran, S.; Bergefall, K.; Trybala, E.; Addison, R. S.; Ferro, V. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 8229.
- 45 29. Farndale, R. W.; Buttle, D. J.; Barrett, A. J. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 883, 173.
30. Ferro, V.; Fewings, K.; Palermo, M. C; Li, C. *Carbohydr. Res.* 2001, 332, 183.
31. Aucagne, V.; Hanni, K. D.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; Walker, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 725, 2186.
32. Dubber, M.; Lindhorst, T. K. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 5275.
33. Fairweather, J. K.; Karoli, T.; Ferro, V. *Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 6063.
- 50 34. Chen, L.; Kong, F. *J. Carbohydr. Chem.* 2002, 21, 341.
35. Narumi, A.; Miura, Y.; Otsuka, L.; Yamane, S.; Kitajyo, Y.; Satoh, T.; Hirao, A.; Kaneko, N.; Kaga, H.; Kakuchi, T. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2006, 44, 4864.
36. Pazur, J. H. *Methods Carbohydr. Chem.* 1962, 1, 337.
37. Ahmed, S.; Alauddin, M.; Caddy, B.; Martin-Smith, M.; Sidwell, W. T. L.; Watson, T. R. *Aust. J. Chem.* 1911, 24, 521.
- 55 38. Ferro, V.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1994, 2169.
39. Driguez, P. A.; Petitou, M. *PCT Solicitud Internacional. WO 2006/021653 A2*, 2006.
40. Bisio, A.; Mantegazza, A.; Urso, E.; Naggi, A.; Torri, G.; Viskov, C; Casu, B. *Semin. Thromb. Hemost.* 2007, 33, 488.
- 60 41. Malinda, K. M.; Nomizu, M.; Chung, M.; Delgado, M.; Kuratomi, Y.; Yamada, Y.; Kleinman, H. K.; Ponce, M. L. *FasebJ.* 1999, 13, 53.
42. Nicosia, R. F.; Ottinetti, A. *Lab. Invest.* 1990, 63, 115.
43. Dredge, K.; Marriott, J. B.; Macdonald, C. D.; Man, H. W.; Chen, R.; Muller, G. W.; Stirling, D.; Dagleish, A. G. *Br. J. Cancer* 2002, 87, 1166.
- 65 44. Ng, S. S. W.; MacPherson, G. R.; Gutschow, M.; Eger, K.; Figg, W. D. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 4192.

45. Min, J.-K.; Han, K.-Y.; Kim, E.-C; Kim, Y.-M.; Lee, S.-W.; Kim, O.-H.; Kim, K.-W.; Gho, Y. S.; Kwon, Y.-G. *Cancer Res.* 2004, 64, 644.
46. Gunalp, A. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965, 118, 185.
47. Holland, T. C; Homa, F. L.; Marlin, S. D.; Levine, M.; Glorioso, J. J. *Virology* 1984, 52, 566.
- 5 48. Holland, T. C; Marlin, S. D.; Levine, M.; Glorioso, J. J. *Virology* 1983, 45, 672.
49. Duff, R.; Rapp, F. *Nat. New Biol.* 1971, 233, 48.
50. Lewis, F. A.; Rae, M. L.; Lehmann, N. L; Ferris, A. A. *Med. J. Aust.* 1961, 2, 932.
51. Hallak, L. K.; Collins, P. L.; Knudson, W.; Peeples, M. E. *Virology* 2000, 271, 264.
52. Gupta, C. K.; Leszczynski, J.; Gupta, R. K.; Siber, G. R. *Vaccine* 1996, 14, 1417.
- 10 53. Karger, A.; Mettenleiter, T. C. *Virology* 1993, 194, 654.
54. Trybala, E.; Liljeqvist, J. A.; Svennerholm, B.; Bergstrom, T. J. *Virology* 2000, 74, 9106.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula general:



X e Y son cada uno una unidad monosacárida donde cada grupo hidroxilo no comprendido en un enlace glucosídico es sustituido independientemente por un grupo SO₃M o H, donde M es cualquier catión farmacéuticamente aceptable;

10 X e Y son cualquiera de D- o L-hexosa o pentosa;

Y es una forma abierta de anillo o cíclica;

15 Z es O, S, un estado de oxidación mayor de S, o un enlace, y está enlazado al carbono anomérico cuando Y es un monosacárido reductor;

R¹ es un conector seleccionado del grupo que incluye alquileo, alquencileno, alquinileno, arileno, heteroalquileo, heteroarileno, acileno, aroileno, alquilenamido, alquilentioamido, triazolileno, un conector de oximetil[1,2,3]-triazol-1-ilo o es un enlace;

R² es un resto lipofílico seleccionado del grupo que incluye, colestanilo, colato, desoxicolato, propilestearamida;

20 n es un número entero de 0 a 6;

25 el nivel de sulfatación de cada compuesto es de entre 70 y 100% de los grupos hidroxilo totales, donde

cuando X e Y son ribosa, y R¹ es un enlace, entonces R² no es un grupo C18.

30 2. El compuesto, tal y como fue descrito en la reivindicación 1, donde R² es colestanilo.

3. El compuesto, tal y como fue descrito en la reivindicación 1, donde R² es propilestearamida.

35 4. El compuesto, tal y como fue descrito en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, donde R¹ es un conector de oximetil[1,2,3]-triazol-1-ilo.

5. El compuesto tal y como fue descrito en la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-β-D-glucopiranosido de 3β-colestanilo (compuesto 65); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-β-D-glucopiranosido de 4-(colestan-3-ilo-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 70); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-β-D-glucopiranosido de 4-(colestan-3β-ilo-oximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 76); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio-β-D-glucopiranosido de 3β-colestanilo (compuesto 87); 2,3,4,6-tetra-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfo-β-D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de decasodio (compuesto 123); y 2,3,4,6-tetra-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfo-α-D-glucopiranosil-(1→4)-2,3,6-tri-O-sulfo-β-D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de tridecasodio (compuesto 128).

50 6. El compuesto tal y como fue descrito en la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:

2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3β-colestanilo (compuesto 20);

2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (compuesto 24);

60 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3β-colestanilo (compuesto 27);

65 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio-α-D-manopiranosido de 3β-colestanilo (compuesto 33);

- 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 39);
- 5 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3-estearamidopropilo (compuesto 44);
- 10 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-3,4,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-manopiranosido de 3'-colestanoilo (compuesto 56);
- 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 65);
- 15 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(colestanoil-3-iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 70);
- 20 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(colestanoil-3 β -iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 76);
- 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-manopiranosido de 3 β -colestanoilo, sal de tetrasodio (compuesto 79);
- 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 87);
- 25 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 4-(colestanoil-3 β -iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo, sal de heptasodio (compuesto 93);
- 30 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 4-(colestanoil-3 β -iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo, sal de heptasodio (compuesto 97);
- 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo, sal de heptasodio (compuesto 102);
- 35 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo, sal de heptasodio (compuesto 107);
- 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3'-colestanoilo, sal de heptasodio (compuesto 112);
- 40 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6)-2,3,4-tri-O-sulfo- α -D-manopiranosido de 3'-colestanoilo, sal de tridecasodio (compuesto 119);
- 45 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de decasodio (compuesto 123); y
- 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de tridecasodio (compuesto 128).
- 50 7. Una composición farmacéutica o veterinaria para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno que resulta del crecimiento tumoral, la angiogénesis tal como la proliferación o migración de células endoteliales, el esparcimiento de células tumorales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular,
- 55 cuya composición comprende al menos un compuesto, tal y como fue descrito en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, junto con un portador o diluyente farmacéutica o veterinariamente aceptable para al menos uno de dicho compuesto.
8. El uso de un compuesto, tal y como fue descrito en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4 y 6 en la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno que resulta del crecimiento tumoral, la angiogénesis tal como la proliferación o migración de células endoteliales, el esparcimiento de células tumorales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.
- 60 9. El uso de la reivindicación 8, donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-
- 65

5 sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 65); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3-
5 iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 70); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3-
10 iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 76); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 87); 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de deca sodio (compuesto 123); y 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de trideca sodio (compuesto 128).

10. Un compuesto tal y como fue descrito en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4 y la 6, para su uso en la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno resultado del crecimiento tumoral, angiogénesis tal como migración o proliferación de células endoteliales, esparcimiento de células tumorales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.

11. El compuesto para su uso tal como se ha definido en la reivindicación 10, seleccionado del grupo que consiste en 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 65); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3-
25 iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 70); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-1-desoxi-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 4-(colestano-3-
30 iloximetil)[1,2,3]triazol-1-ilo (compuesto 76); 2,3,4,6-tetra-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato de sodio- β -D-glucopiranosido de 3 β -colestanoilo (compuesto 87); 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de deca sodio (compuesto 123); y 2,3,4,6-tetra-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-sulfo- β -D-glucopiranosido de 3-estearamidopropilo, sal de trideca sodio (compuesto 128), para su uso en la prevención o tratamiento en un sujeto mamífero de melanoma, cáncer colorrectal o un trastorno resultado del crecimiento tumoral, angiogénesis tal como migración o proliferación de células endoteliales, esparcimiento de células tumorales (metástasis), inflamación, coagulación/trombosis, niveles de triglicéridos en sangre elevados, infección microbiana y/o enfermedad cardiovascular.

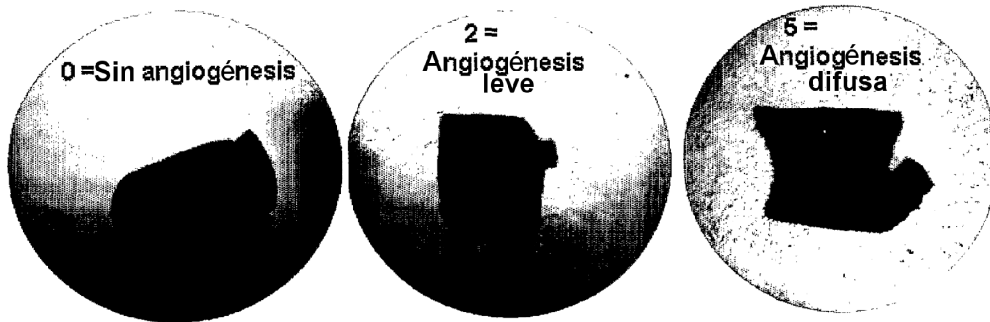


Figura 1: Ejemplos del grado de brote angiogénico en la prueba de angiogénesis aórtica de rata

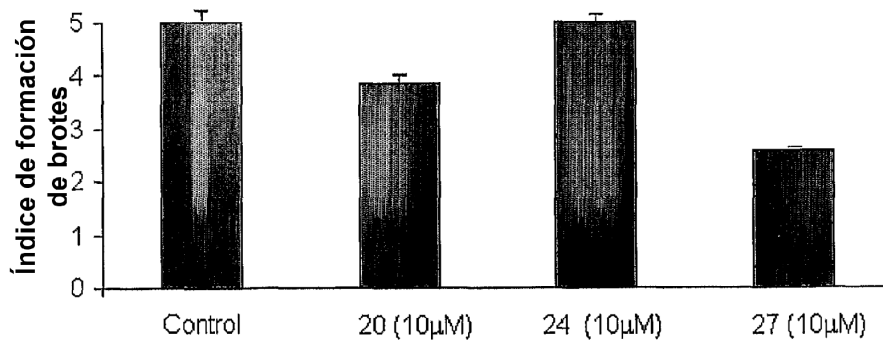


Figura 2: Grado de angiogénesis en cultivos aórticos

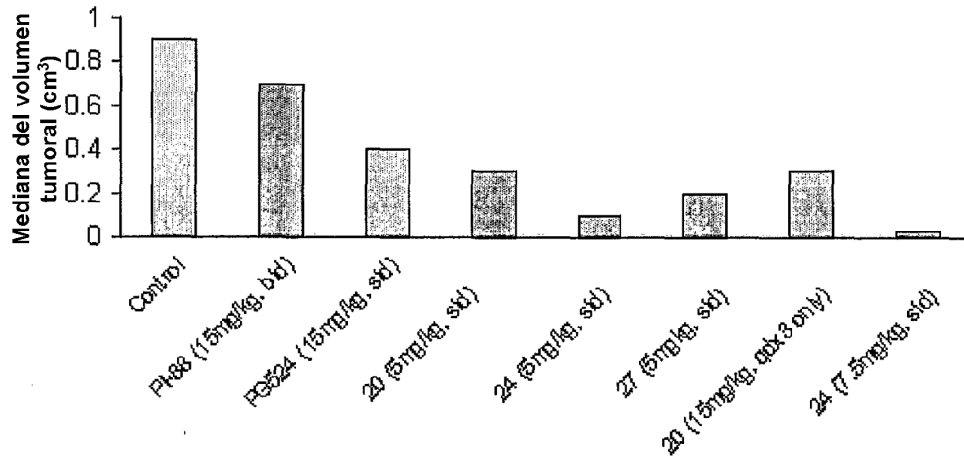


Figura 3: Mediana de volúmenes tumorales de controles sin tratar, PI-88, el análogo PG524 y compuestos de prueba seleccionados

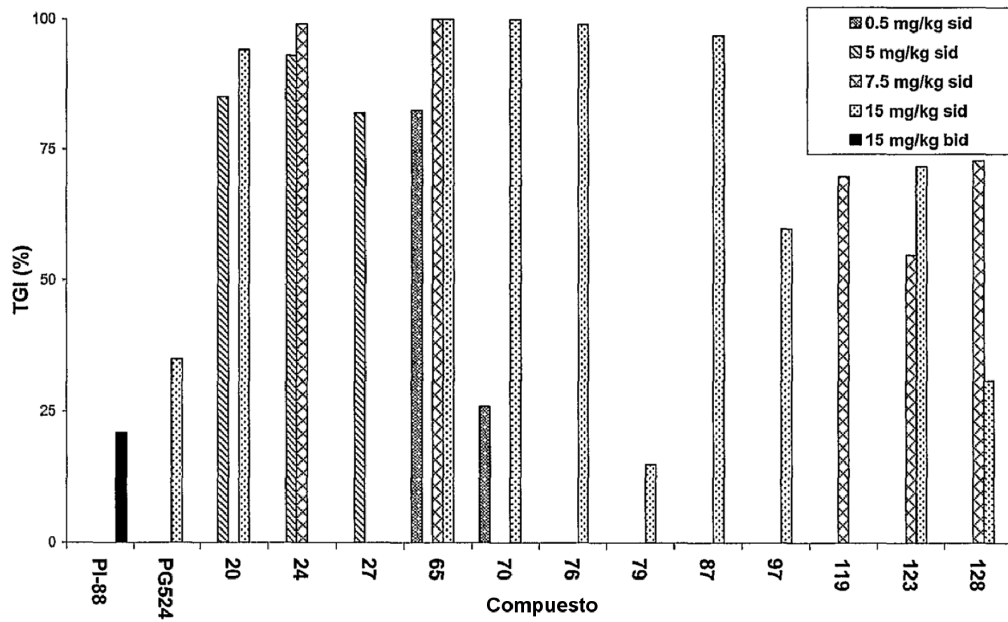


Figura 4: Datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) de ratones con tumores tratados con PI-88, el análogo PG524 y compuestos de prueba seleccionad

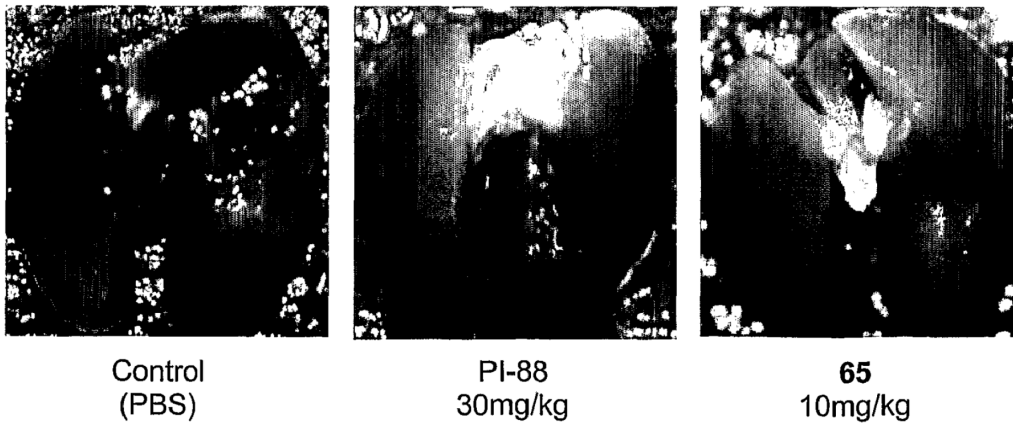


Figura 5: Ejemplos de compuesto de prueba bloqueando la formación de colonias pulmonares (manchas oscuras) de células de melanoma B16F1 en ratones

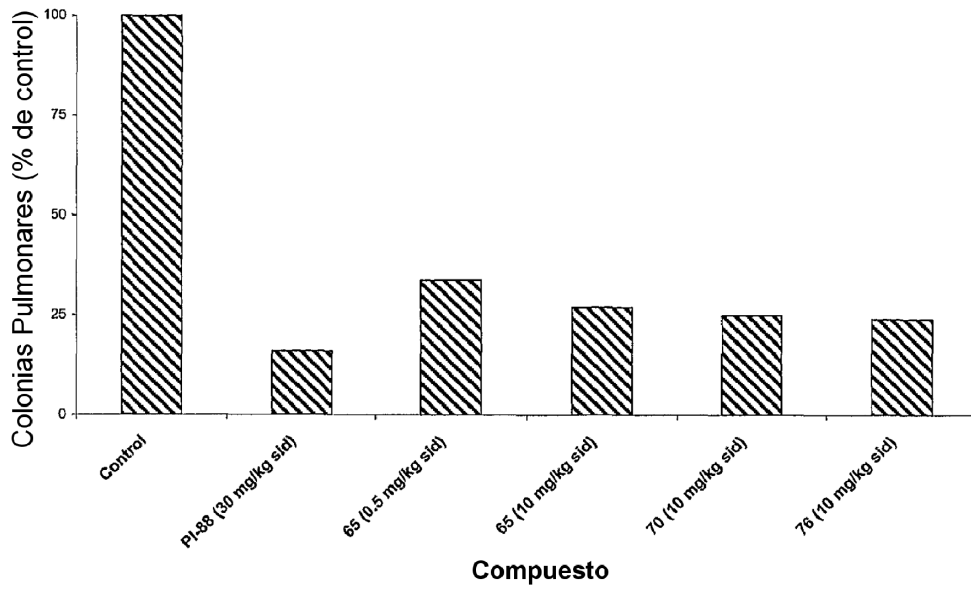


Figura 6: Módulo metastásico en ratones tratados con PI-88 y los compuestos seleccionados

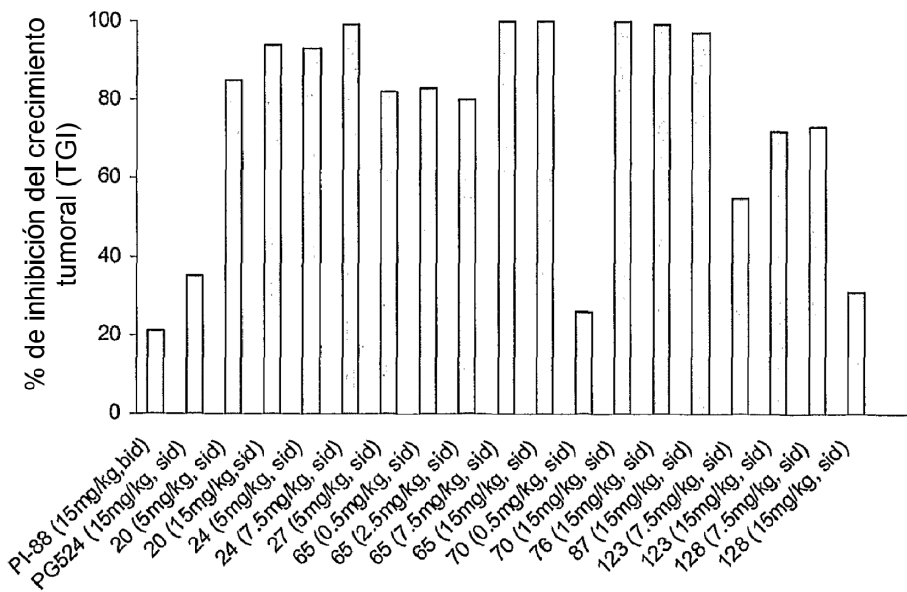


Figura 7: Datos del porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) del modelo de xenoinjerto de cáncer colorrectal HT29

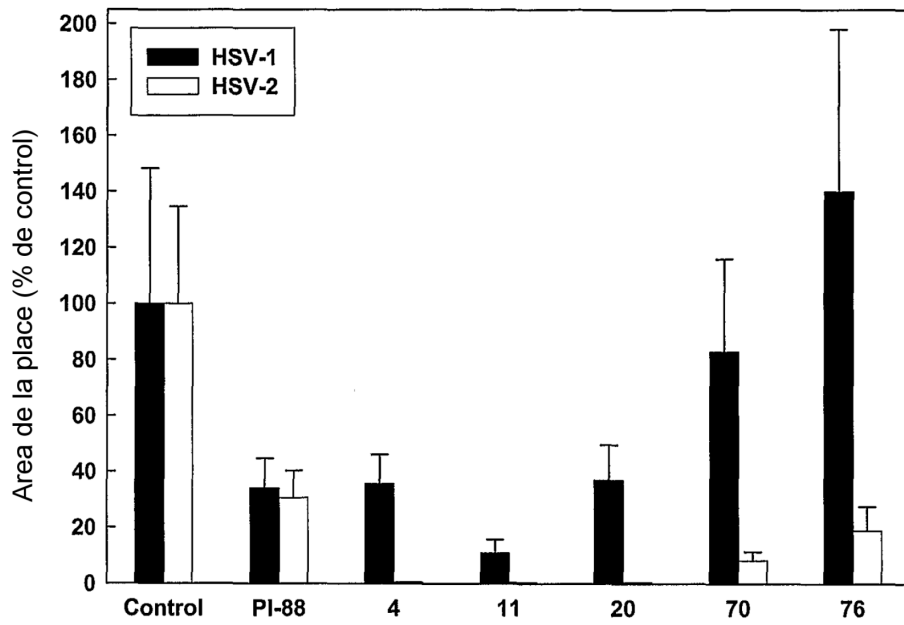


Figura 8: Efecto de los compuestos de prueba en la transmisión de célula a célula del HSV

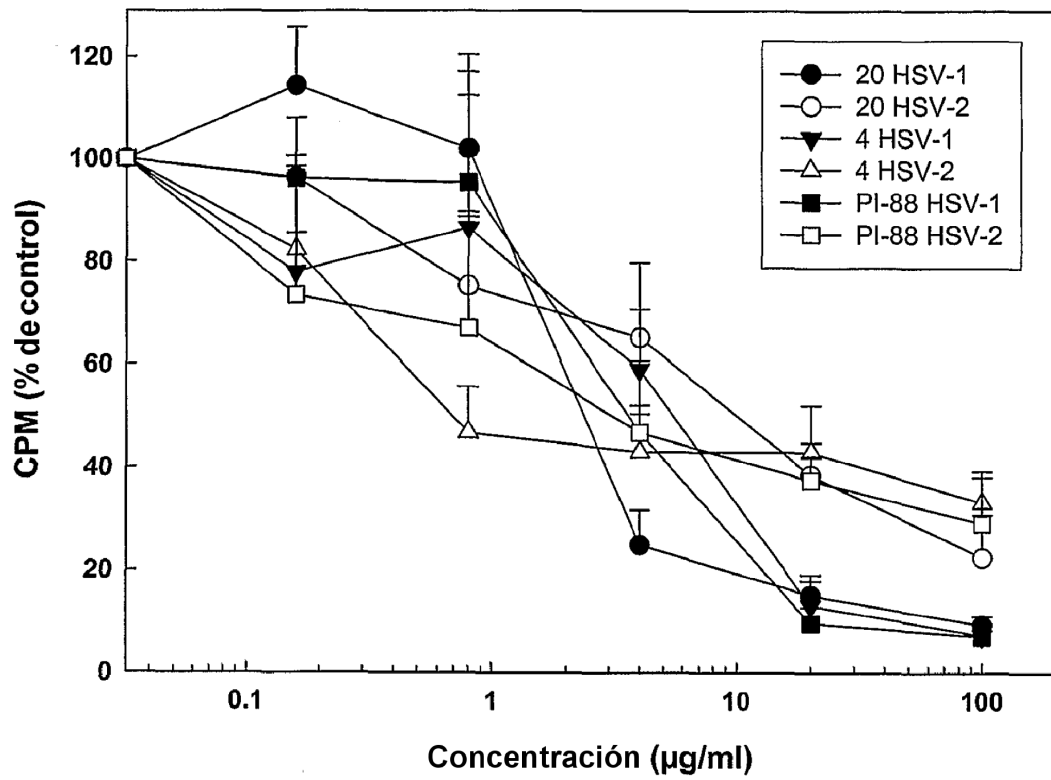
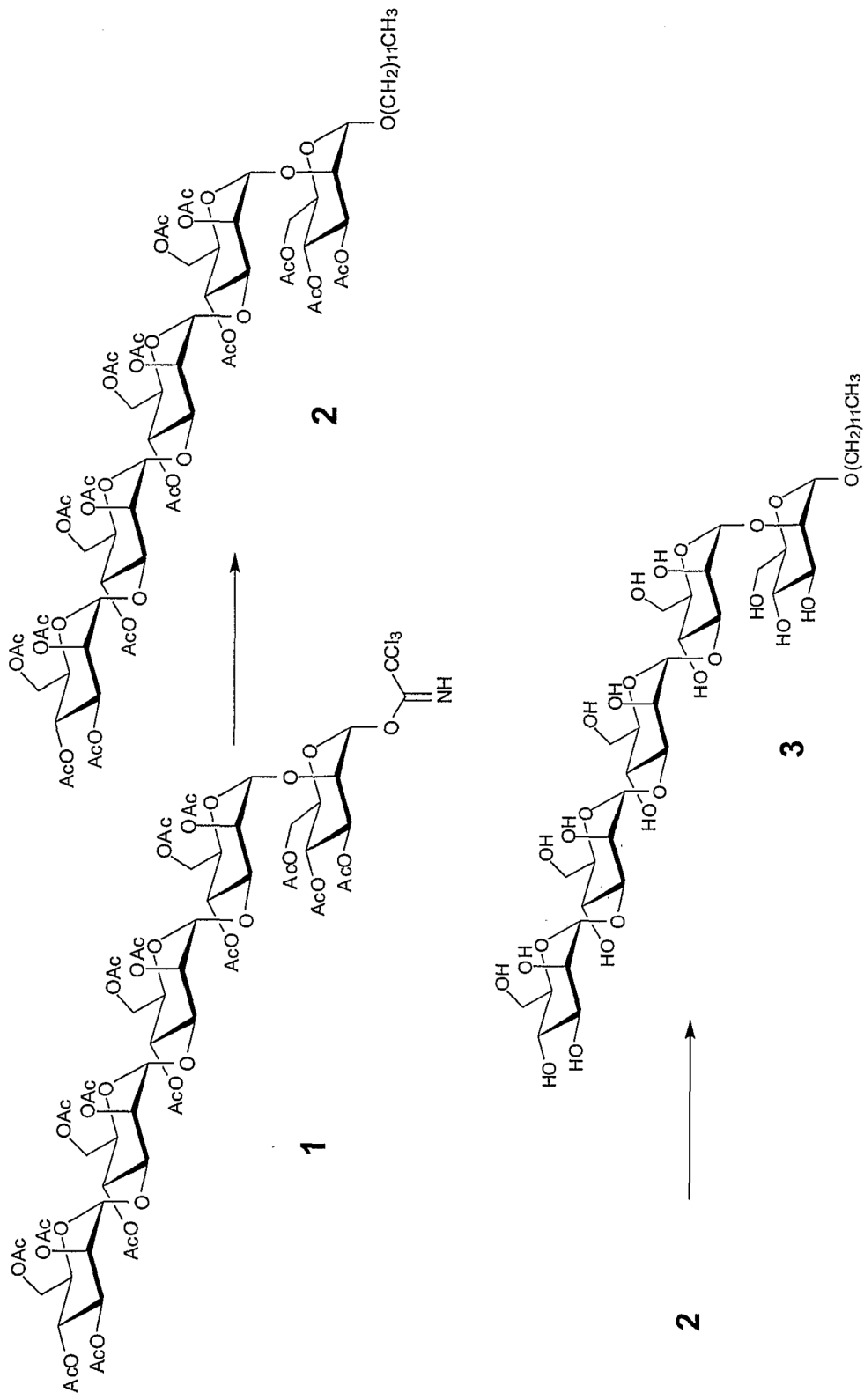


Figura 9: Efecto de los compuestos de prueba en la unión de viriones de HSV a las células

Figura 10:



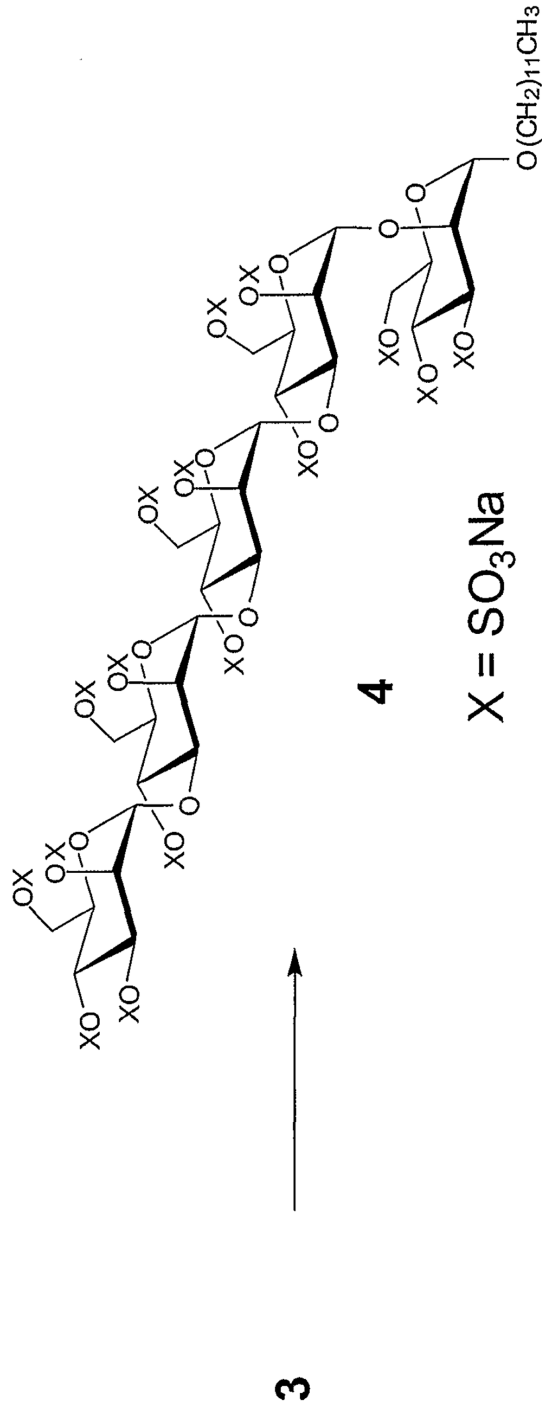
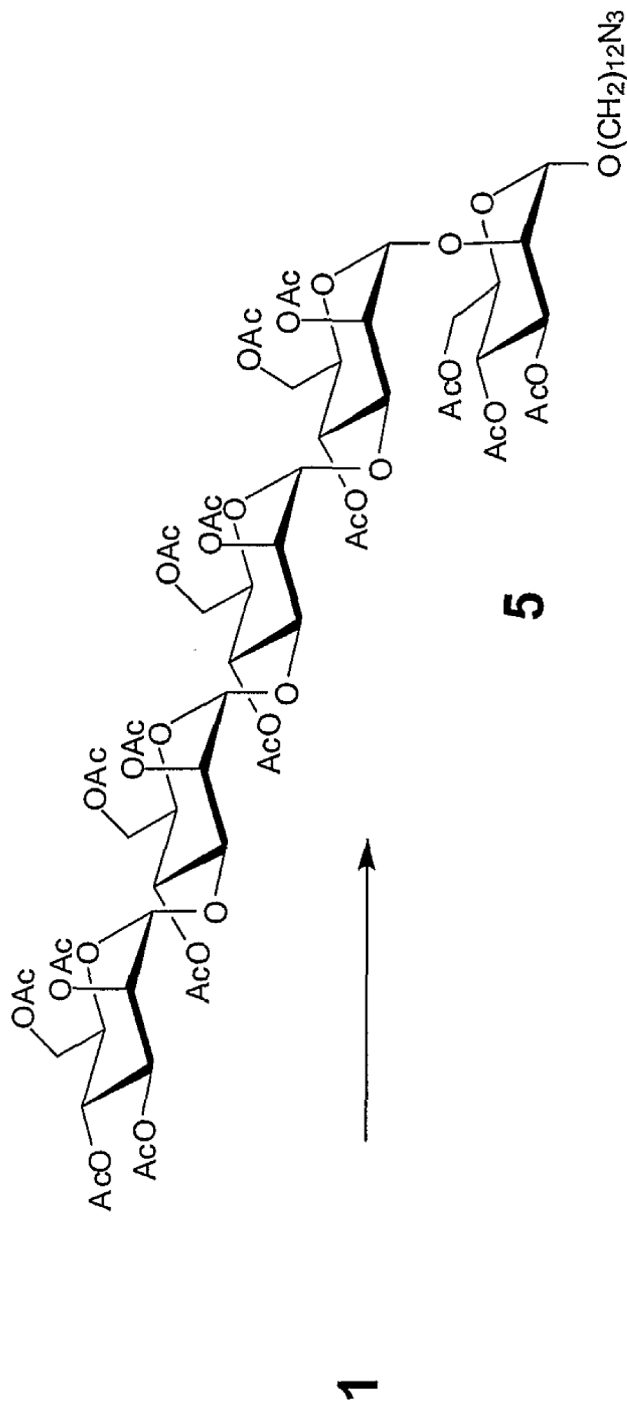
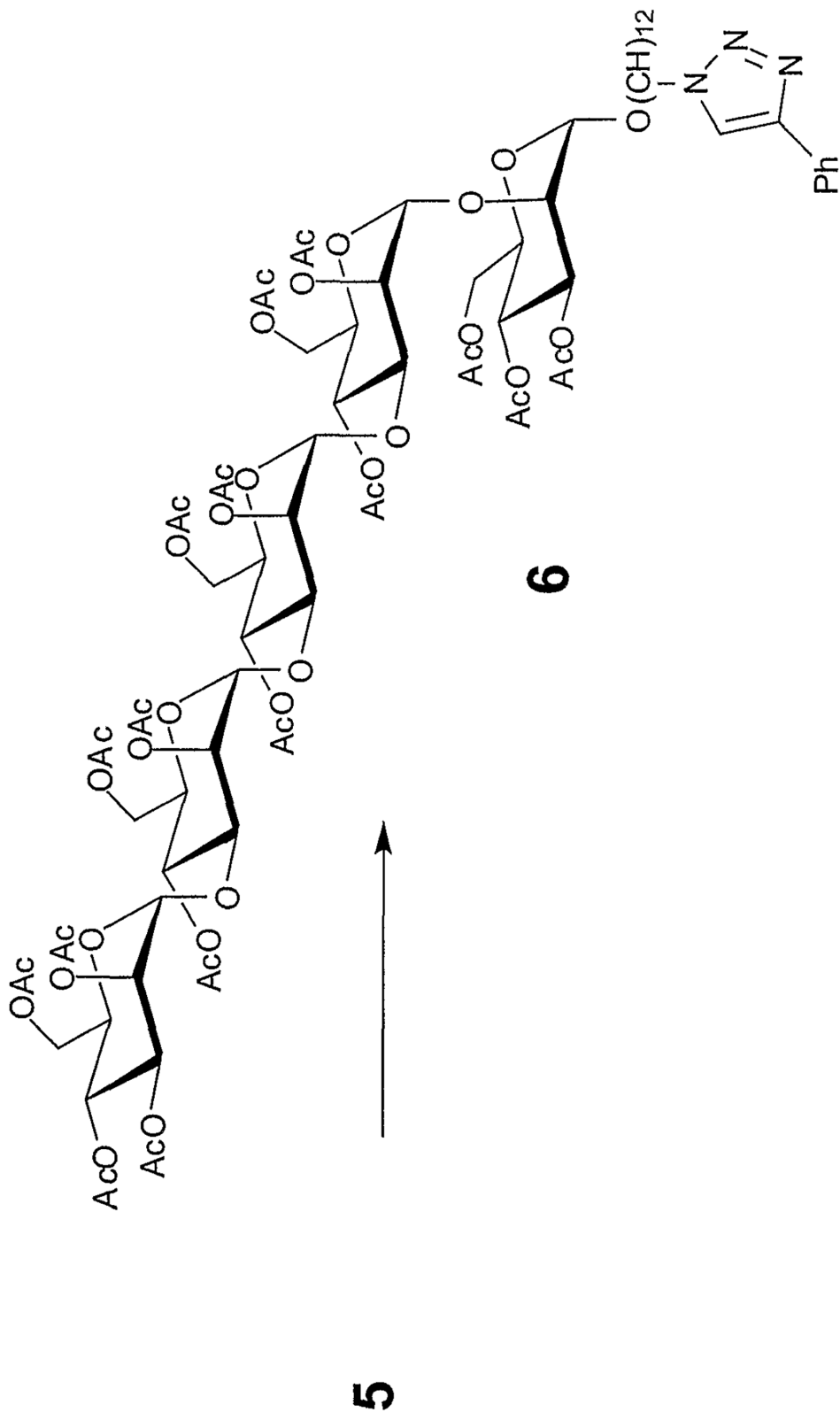


Figura 11:





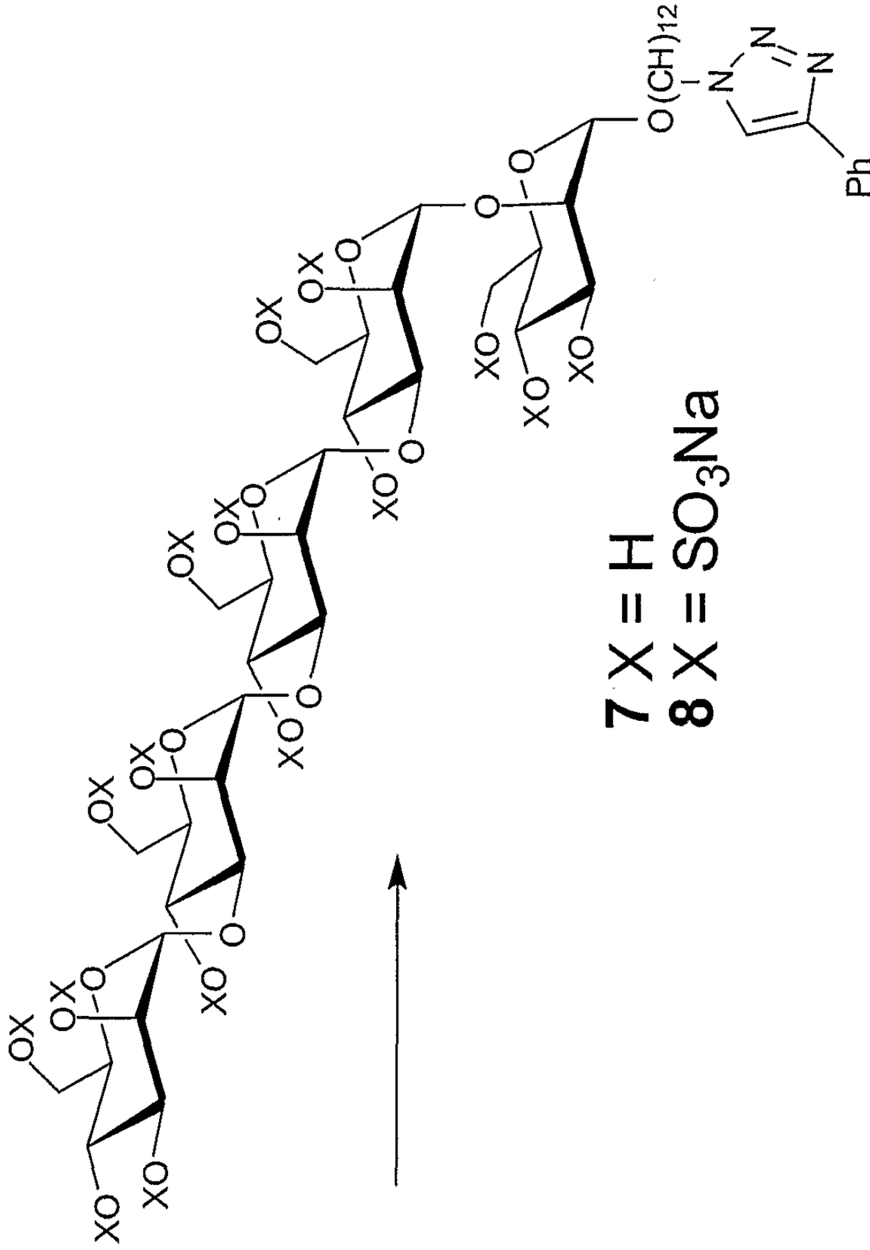
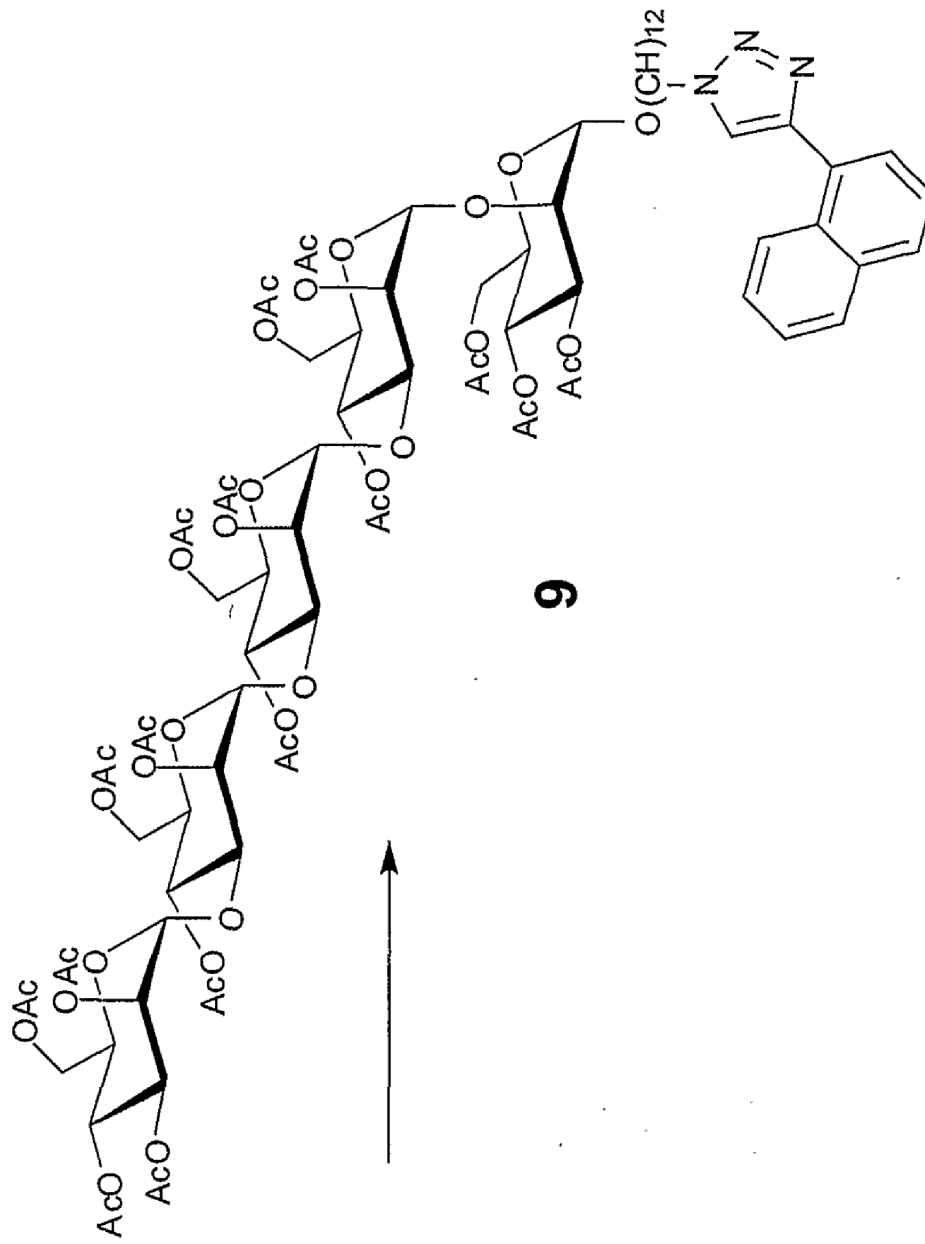
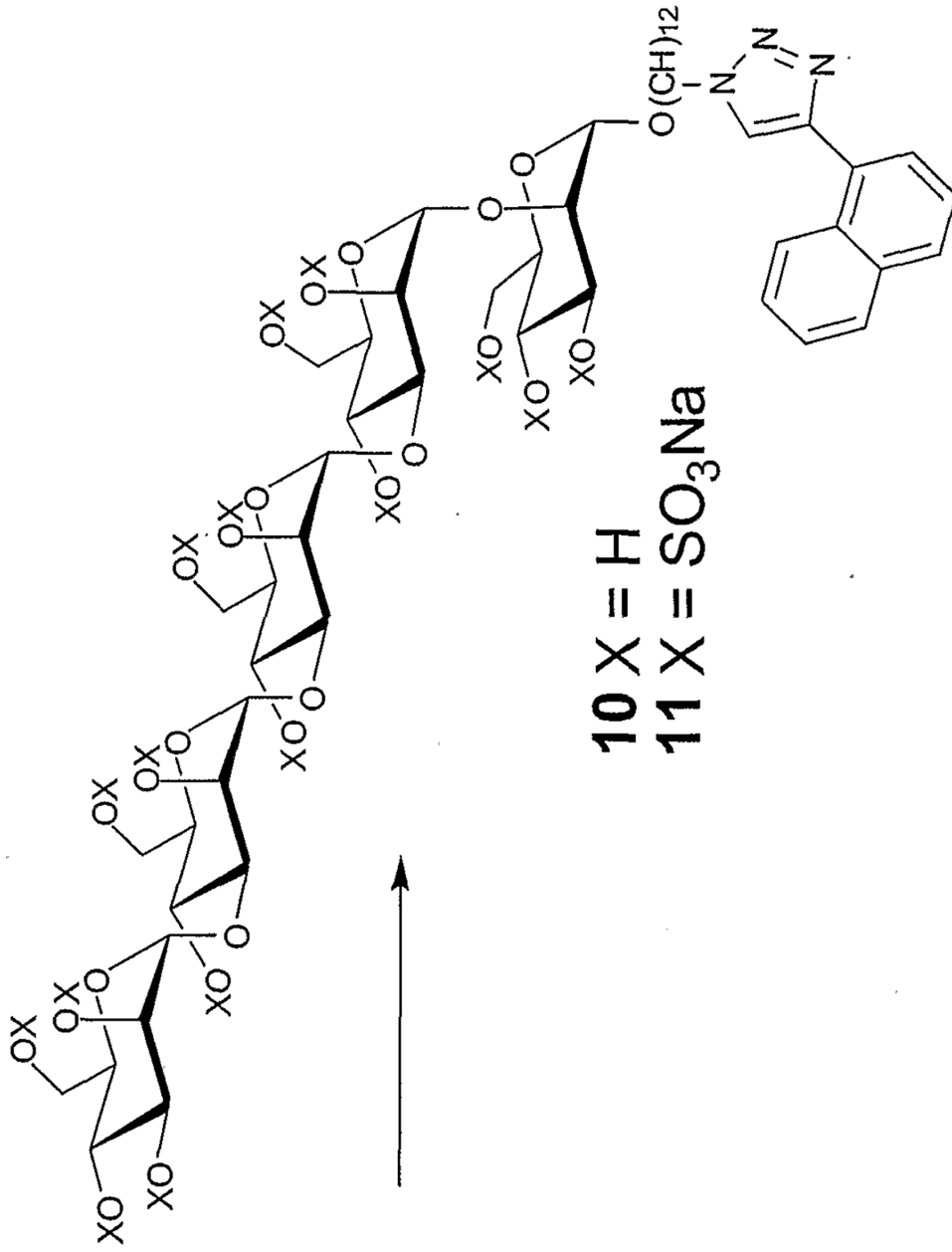
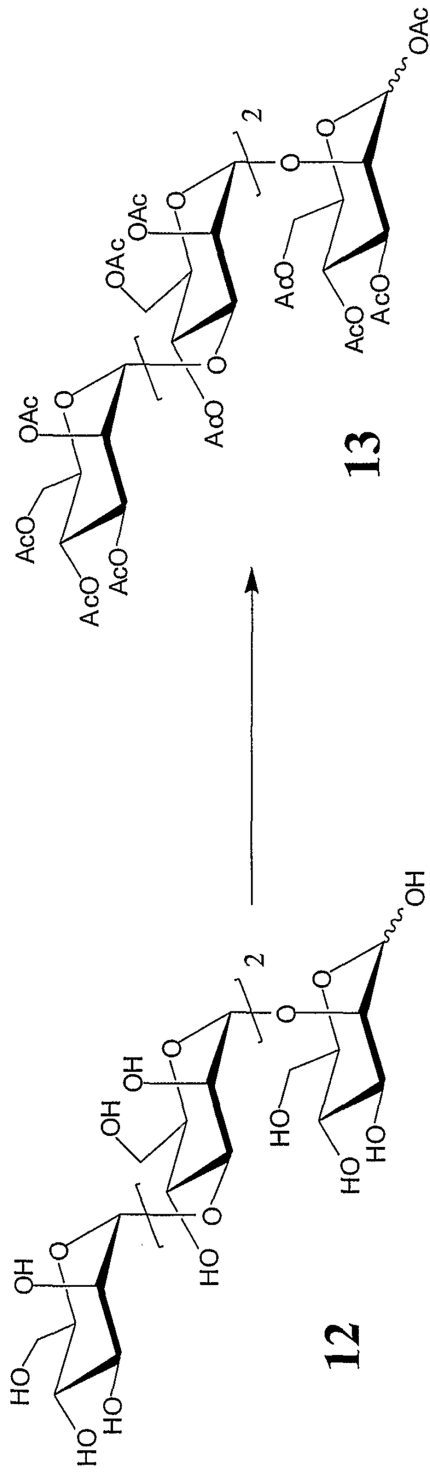


Figura 12:





9



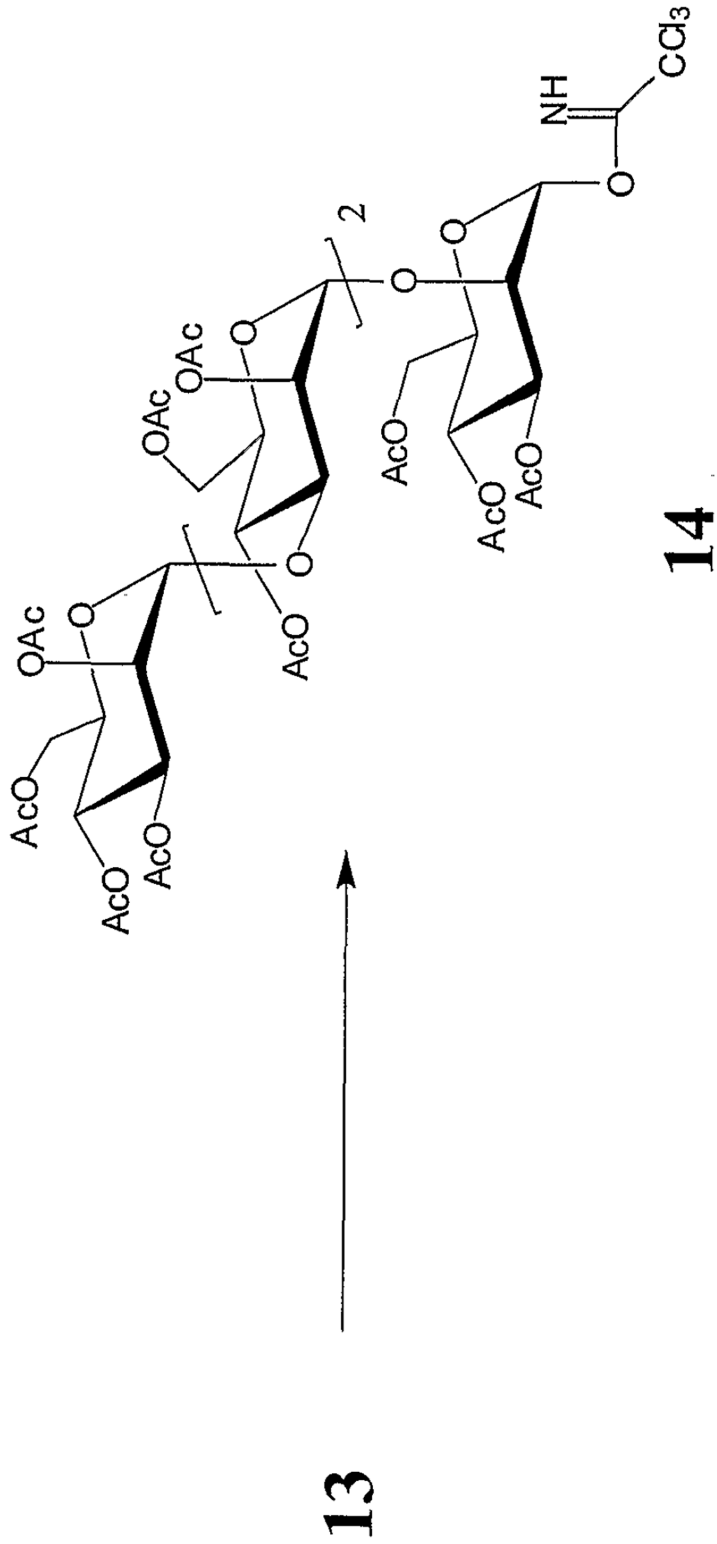
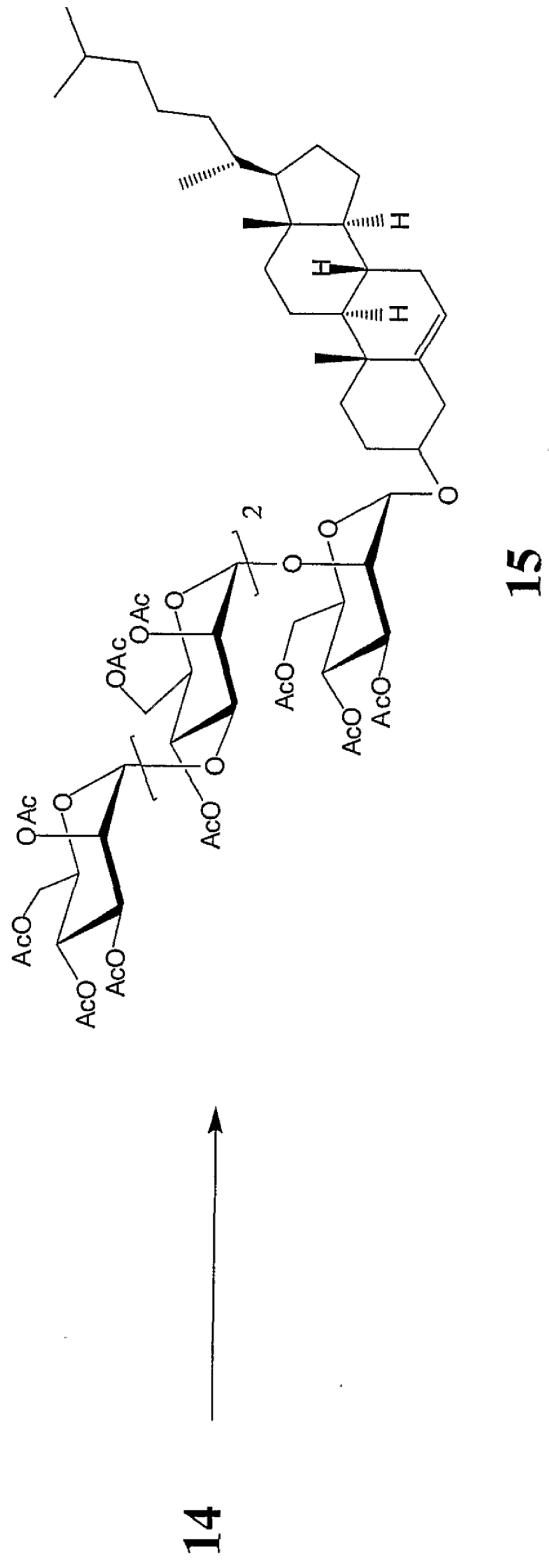
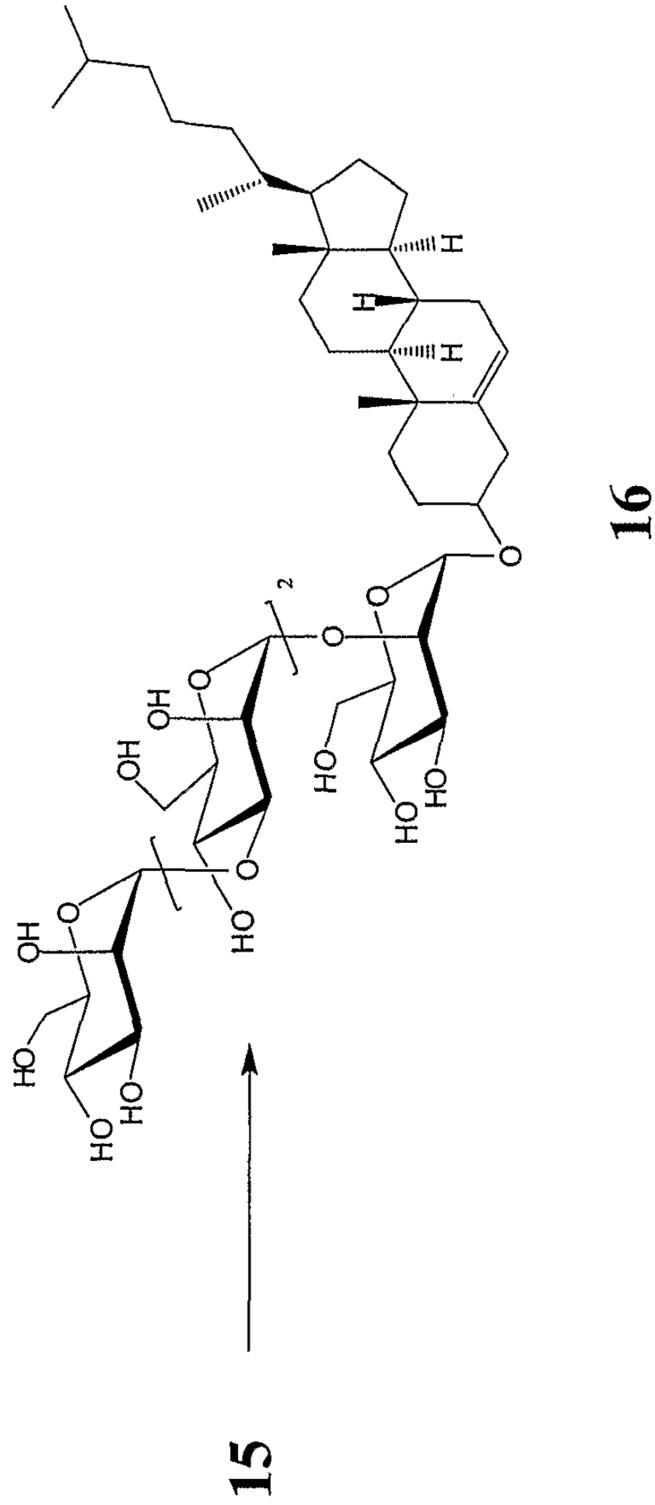


Figura 13:





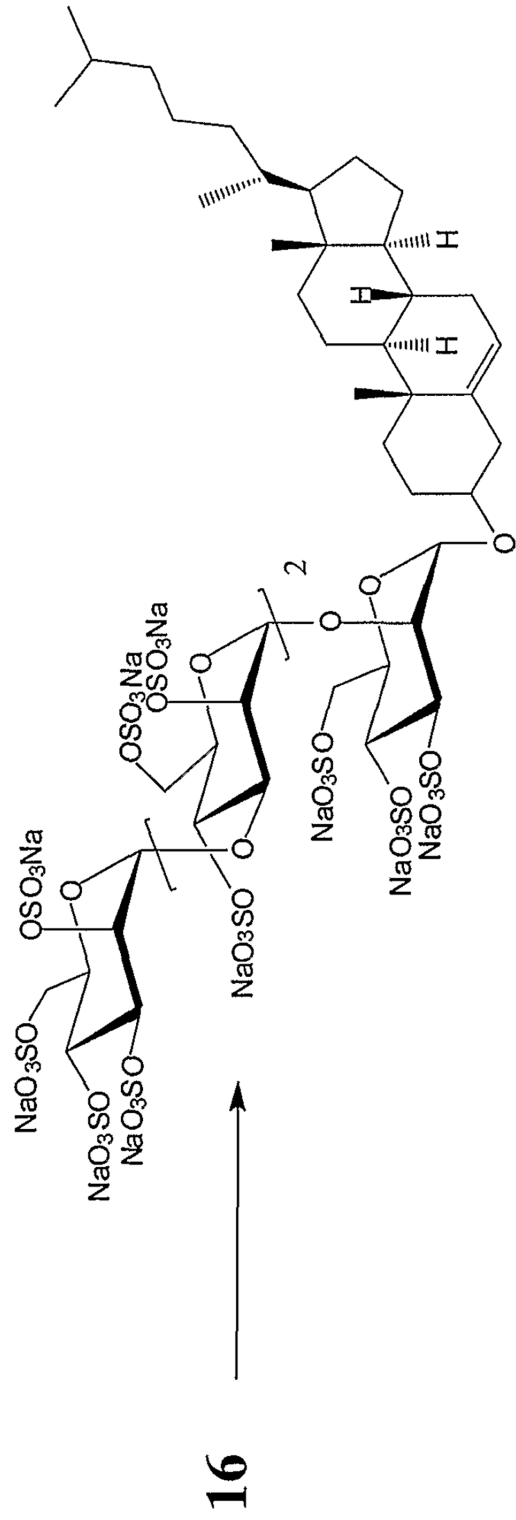
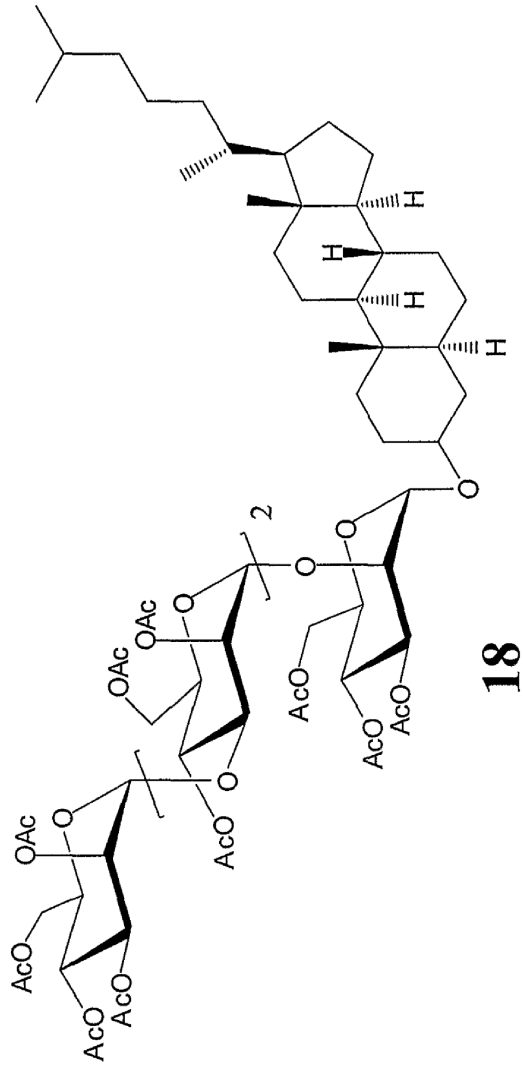


Figura 14:



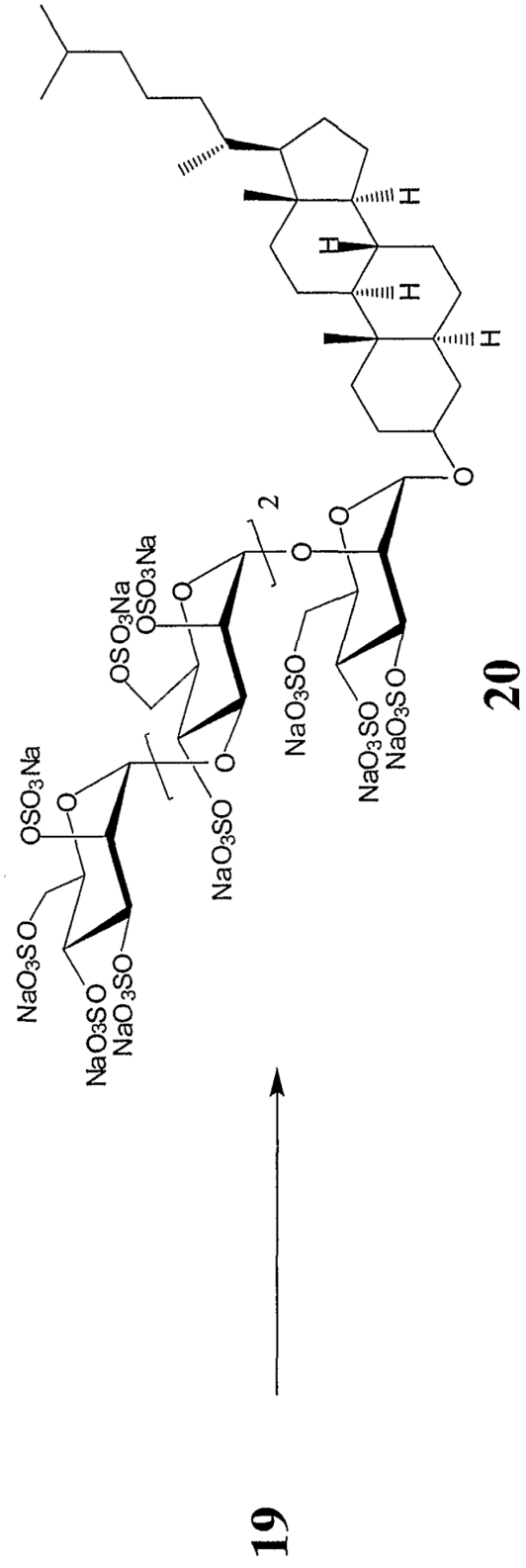
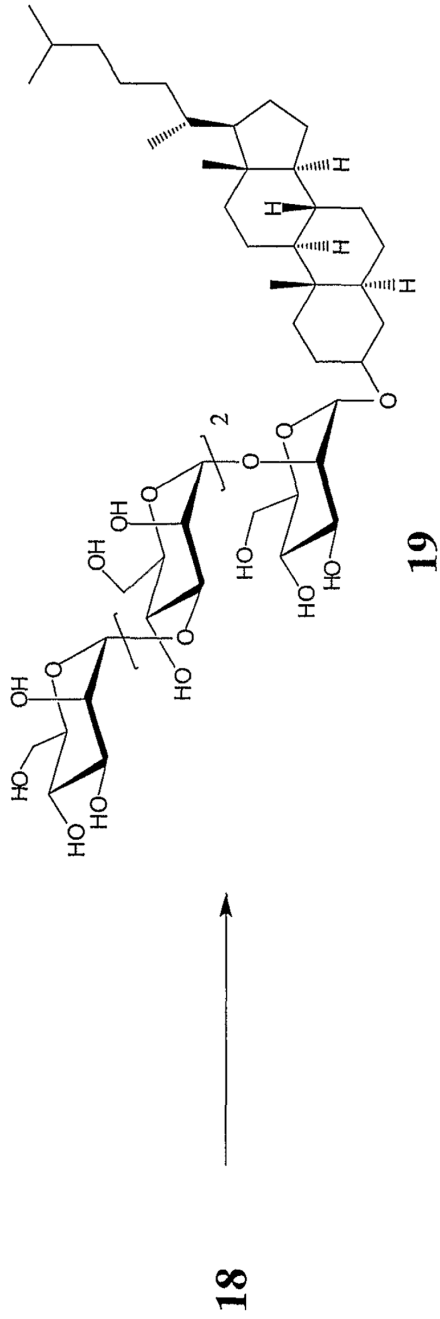
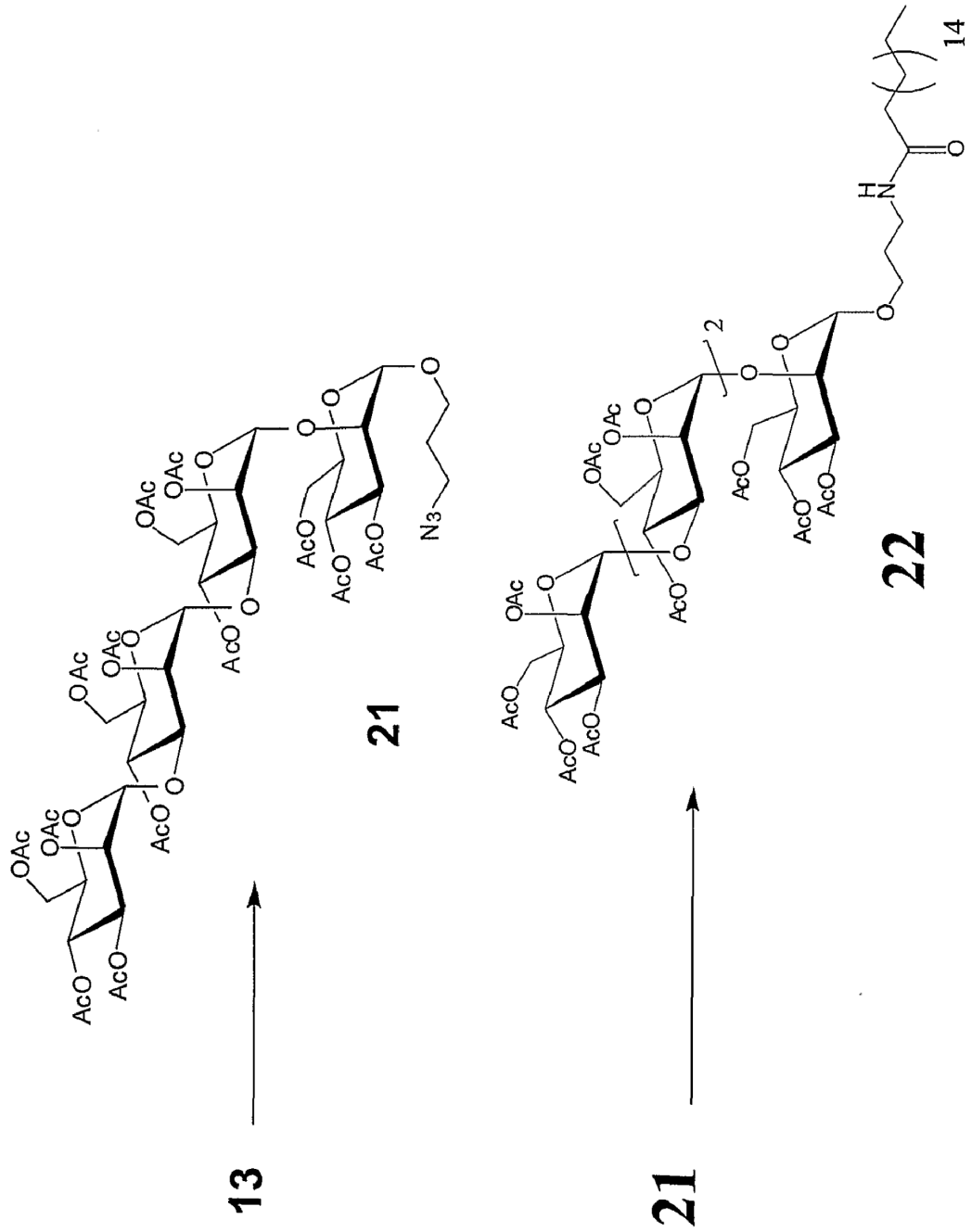


Figura 15:



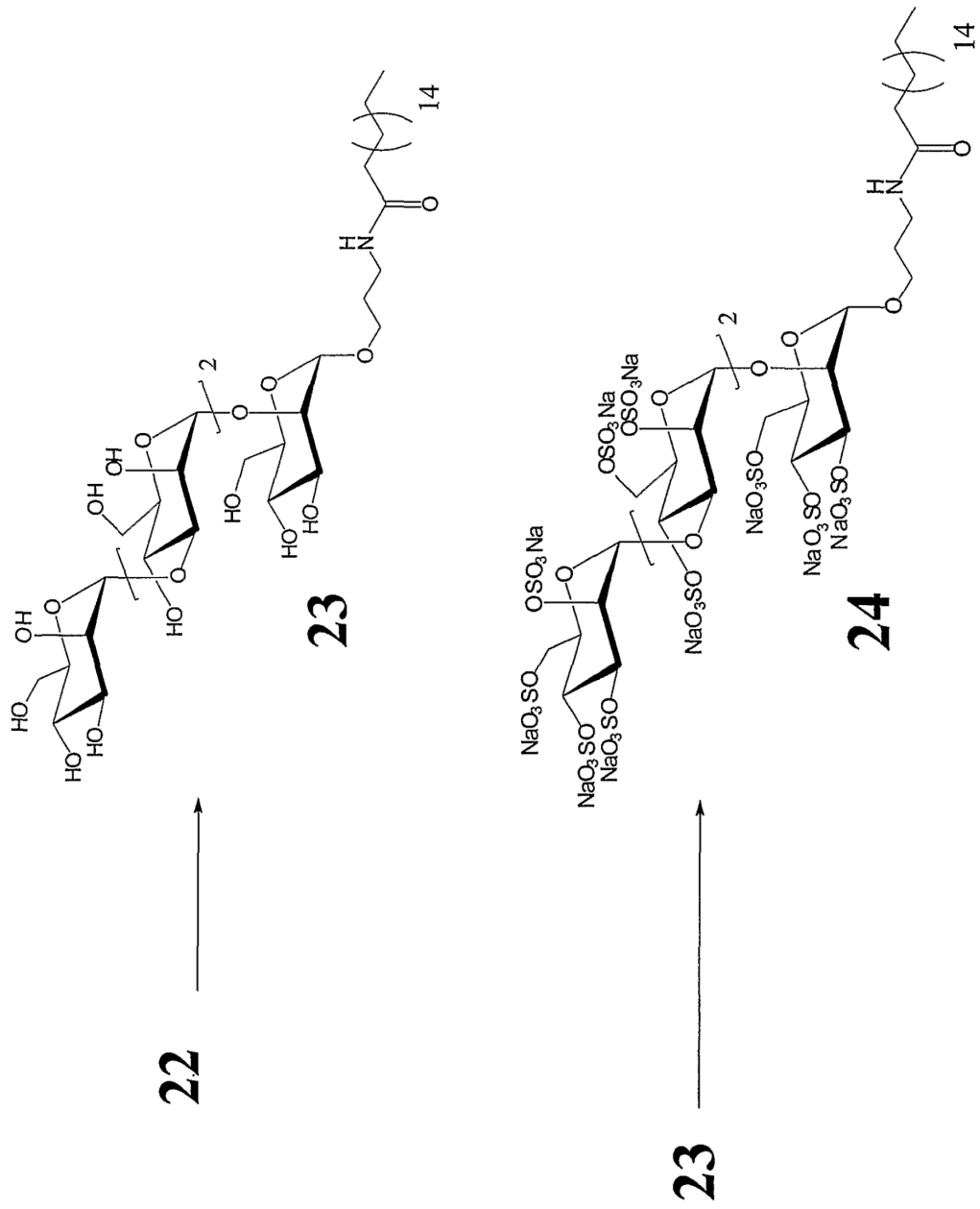
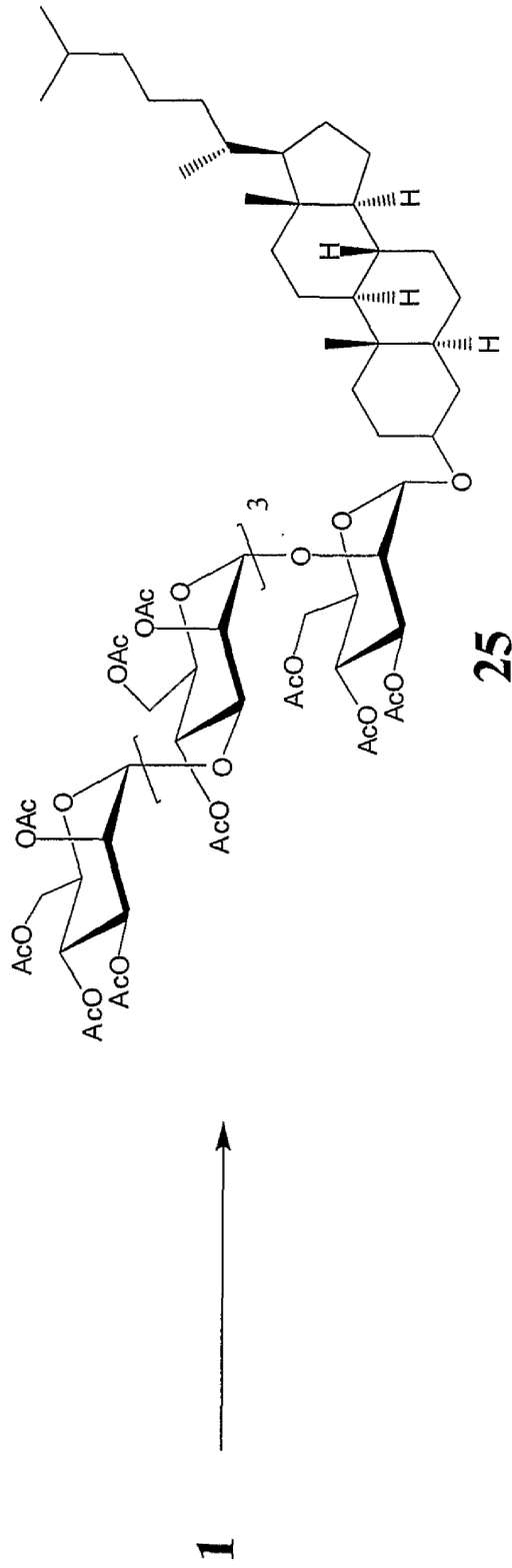
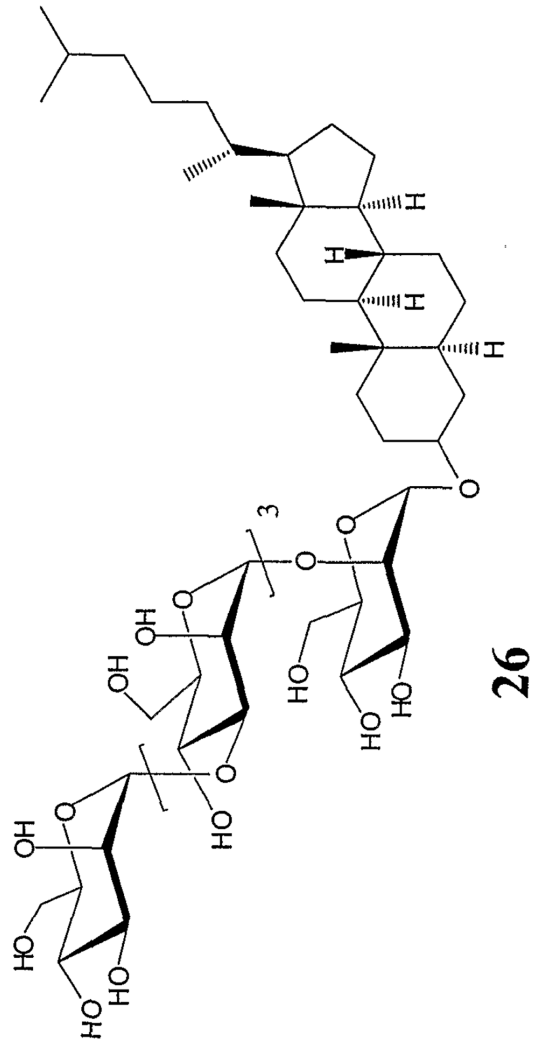


Figura 16:





25

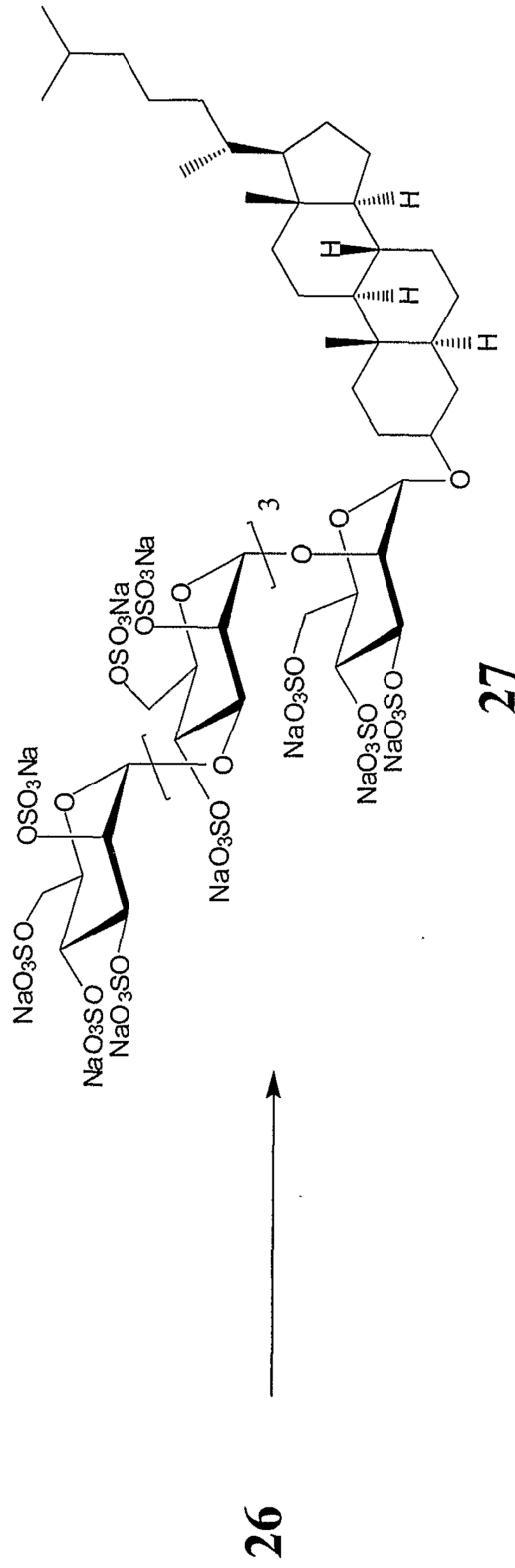
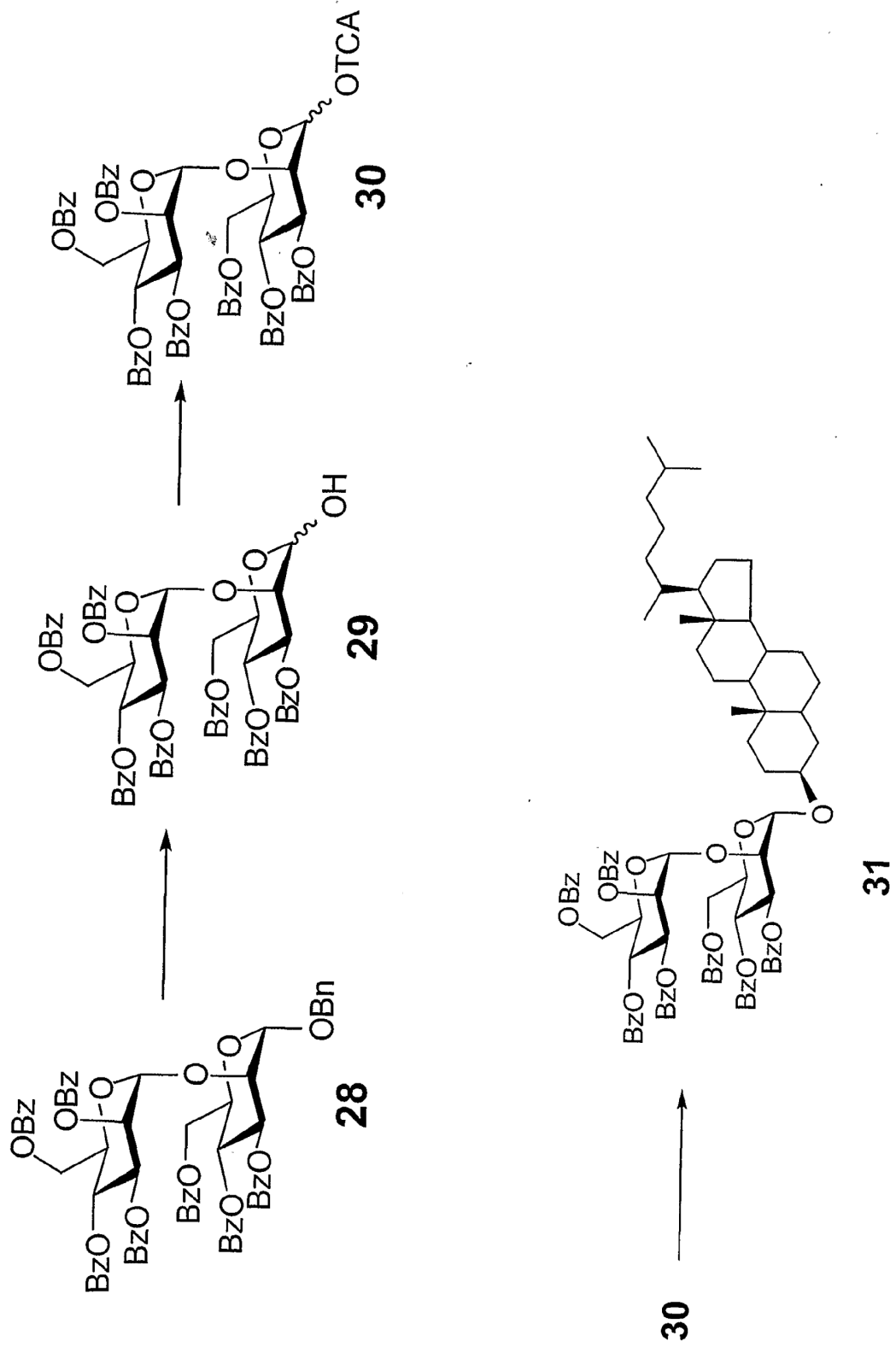
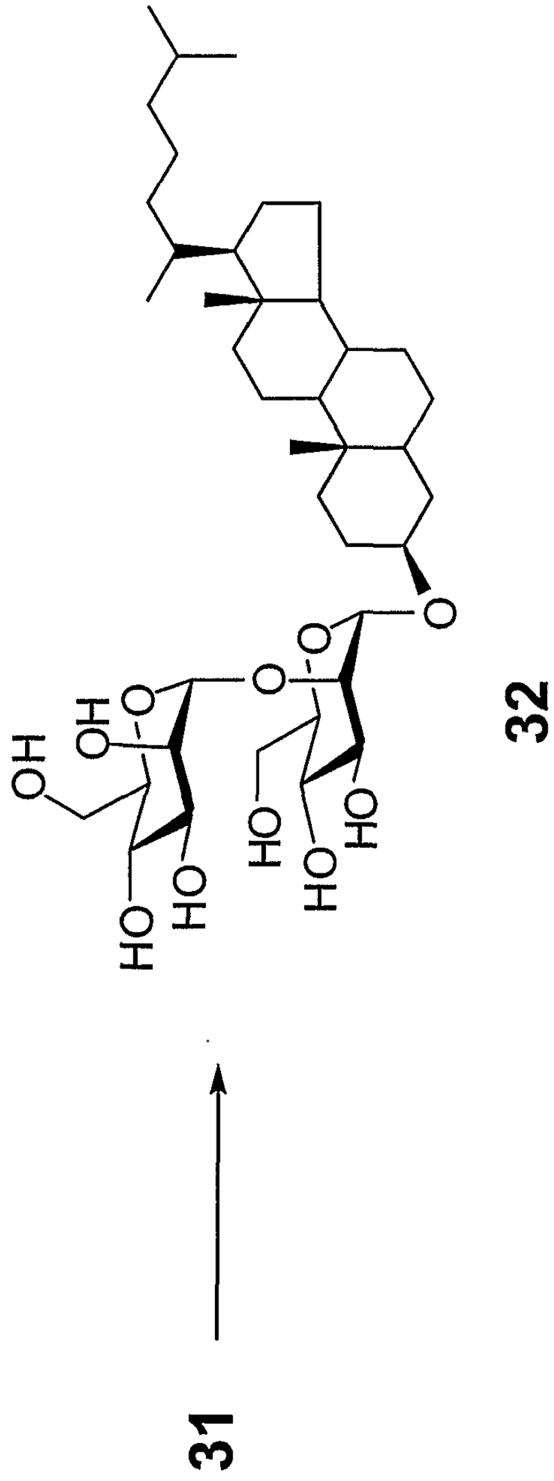


Figura 17:





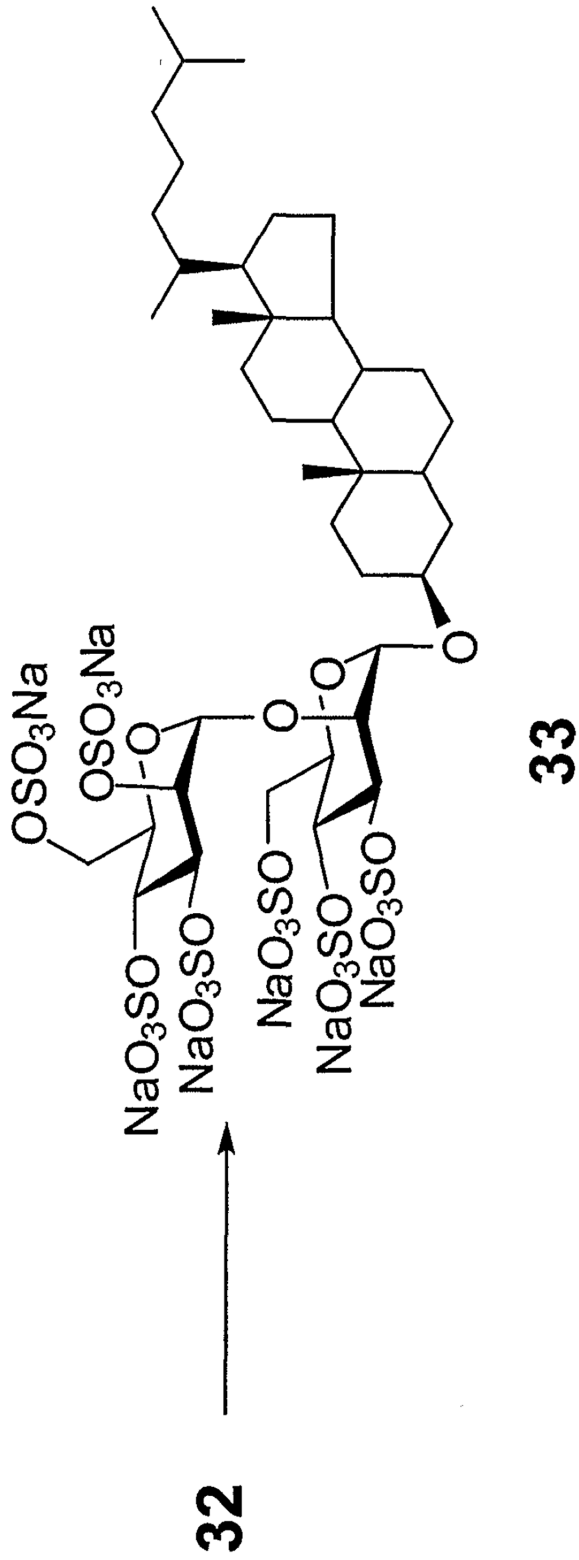
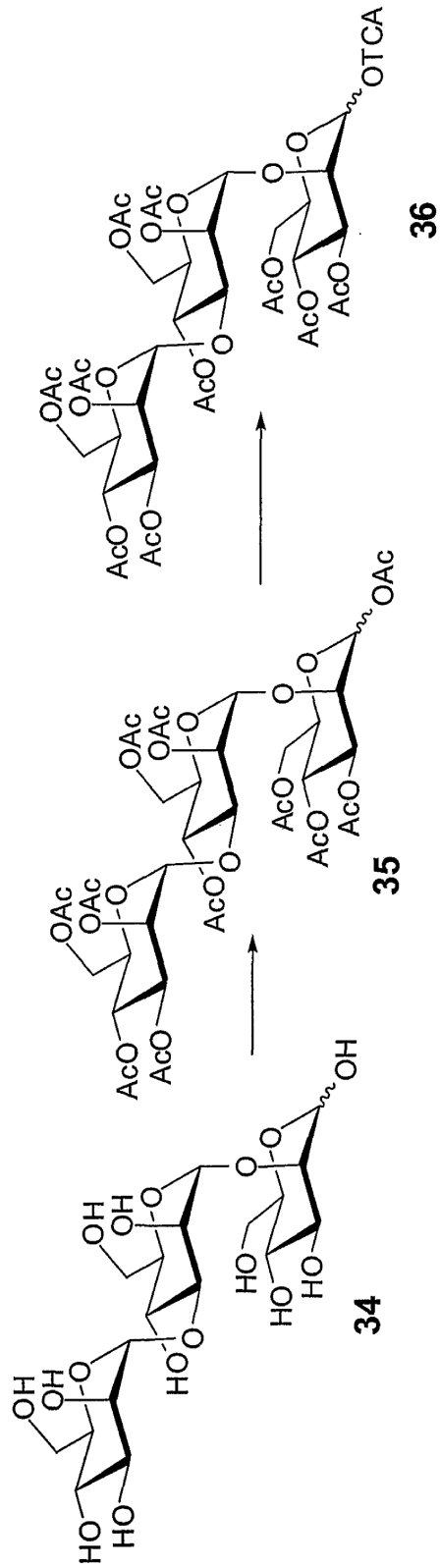
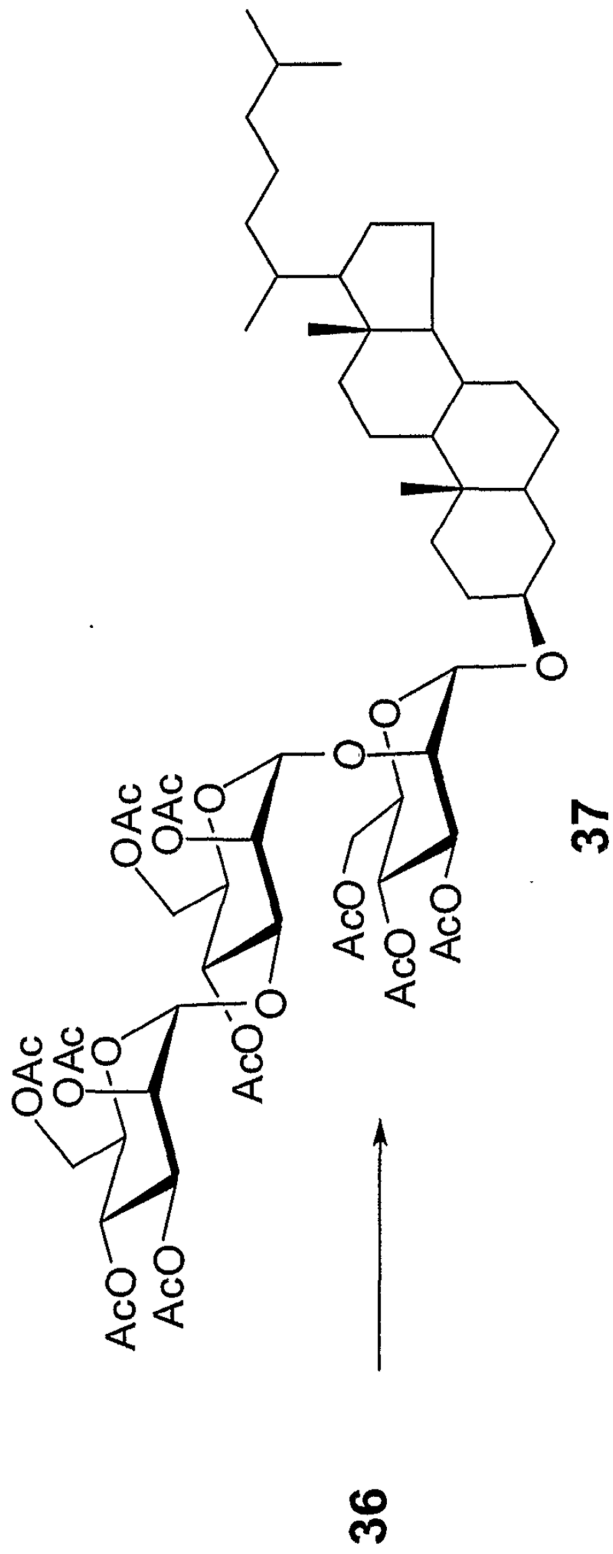
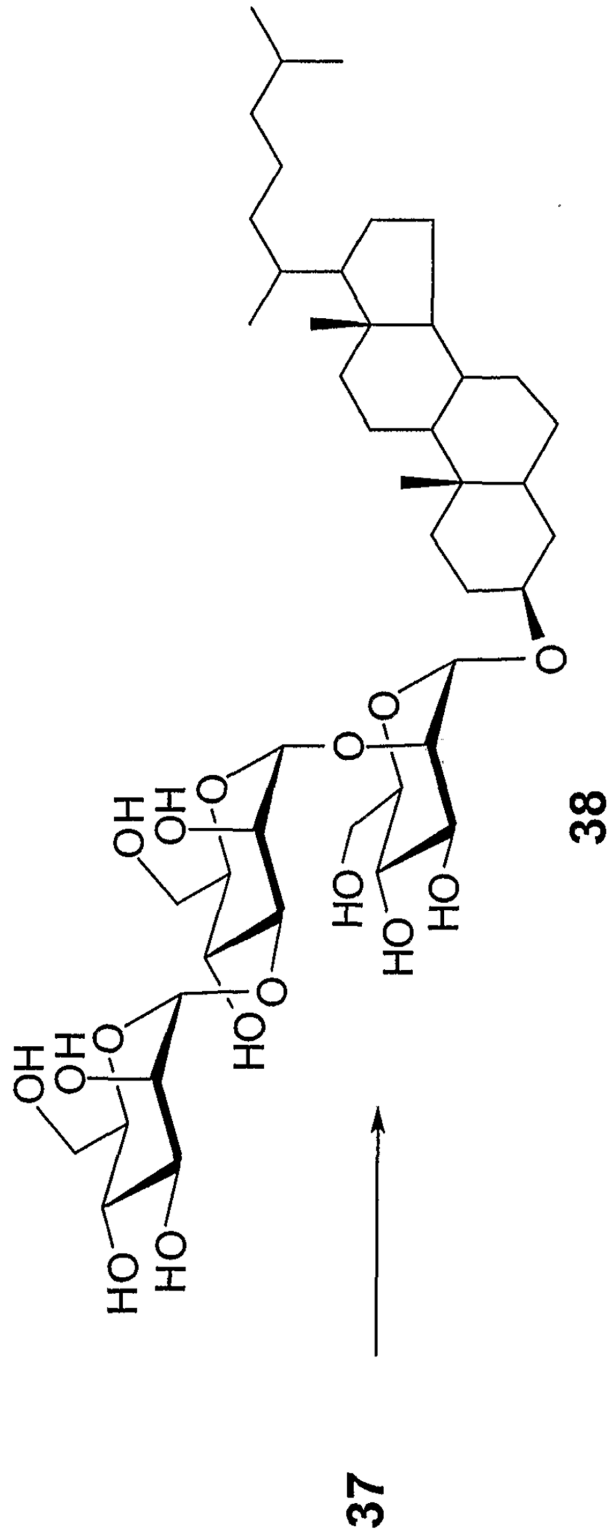


Figura 18:







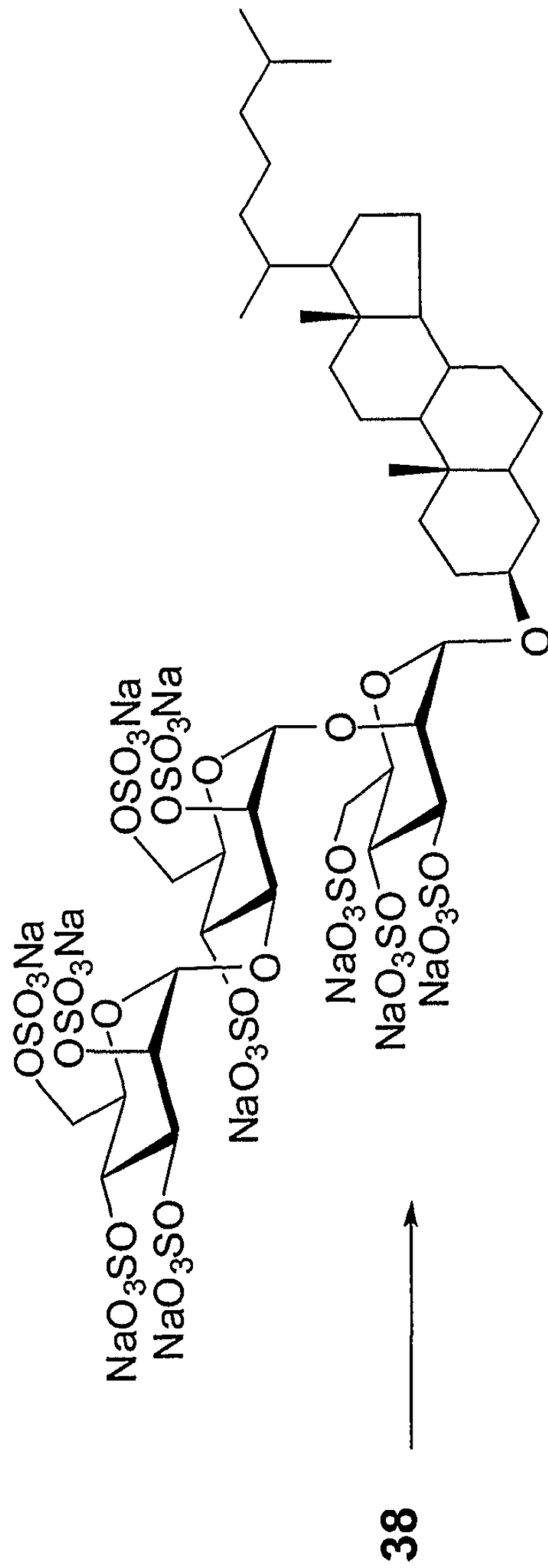
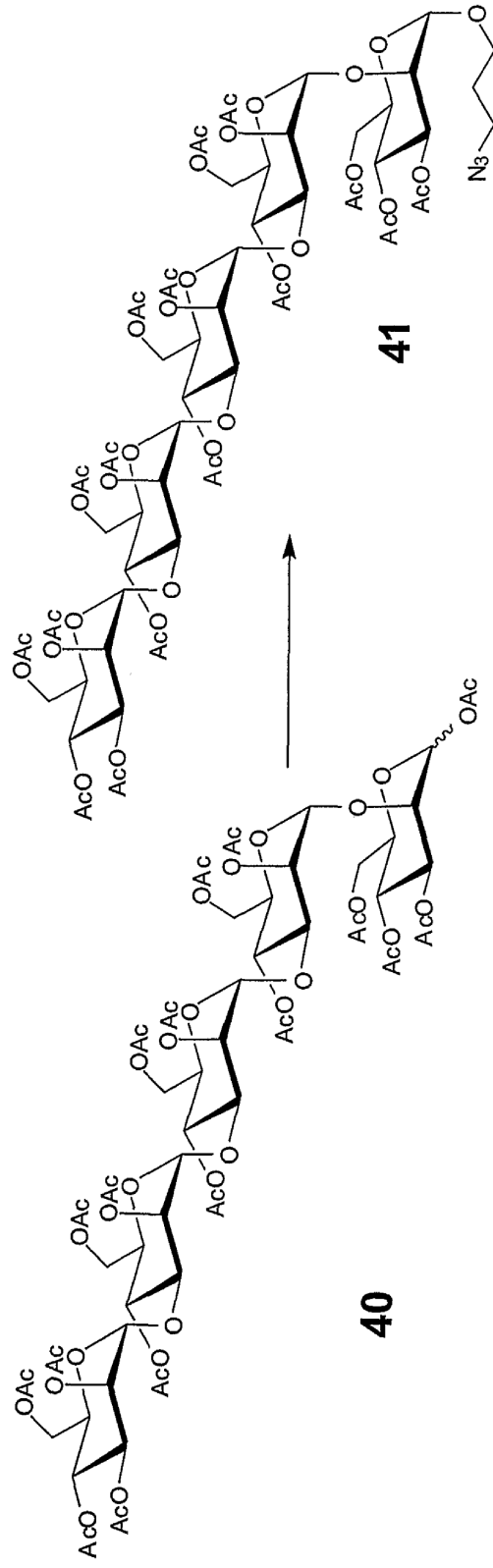
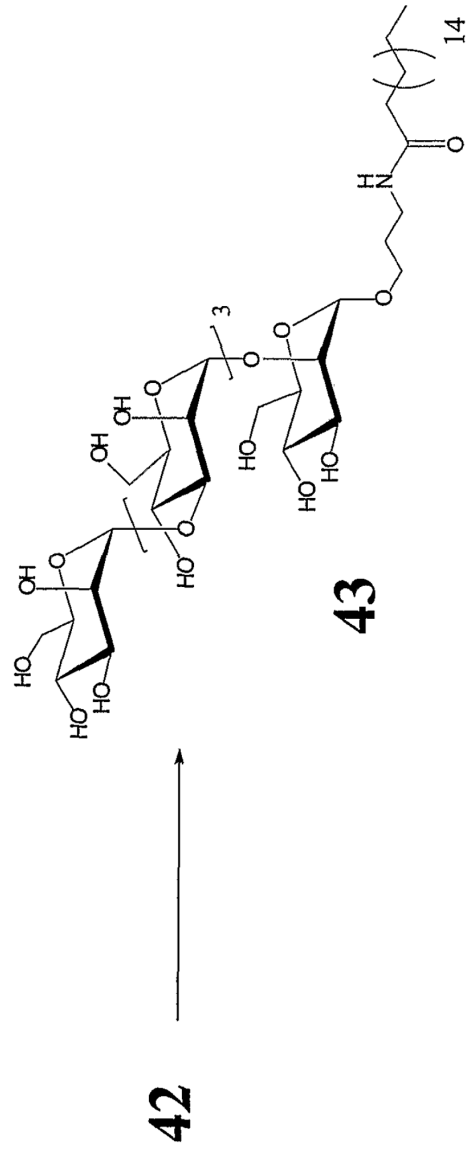
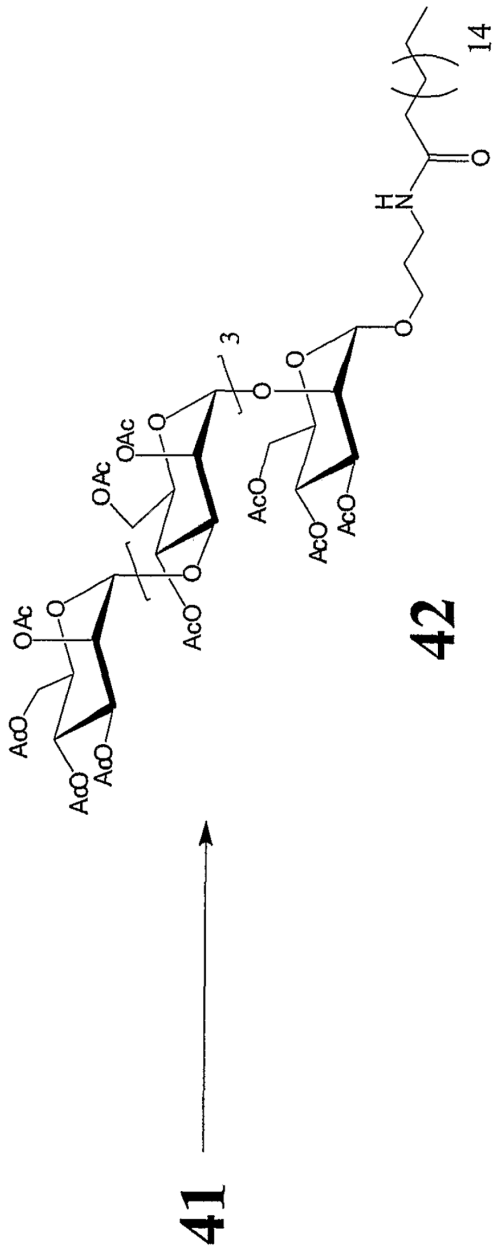


Figura 19:





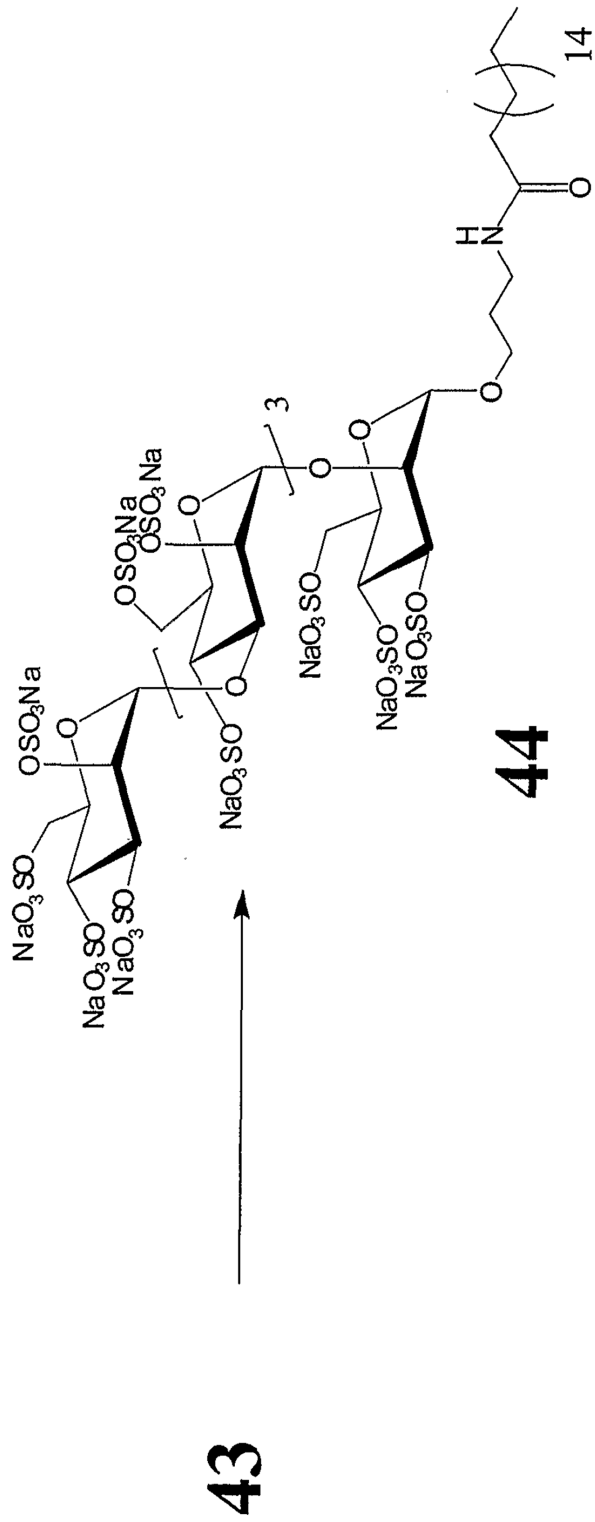
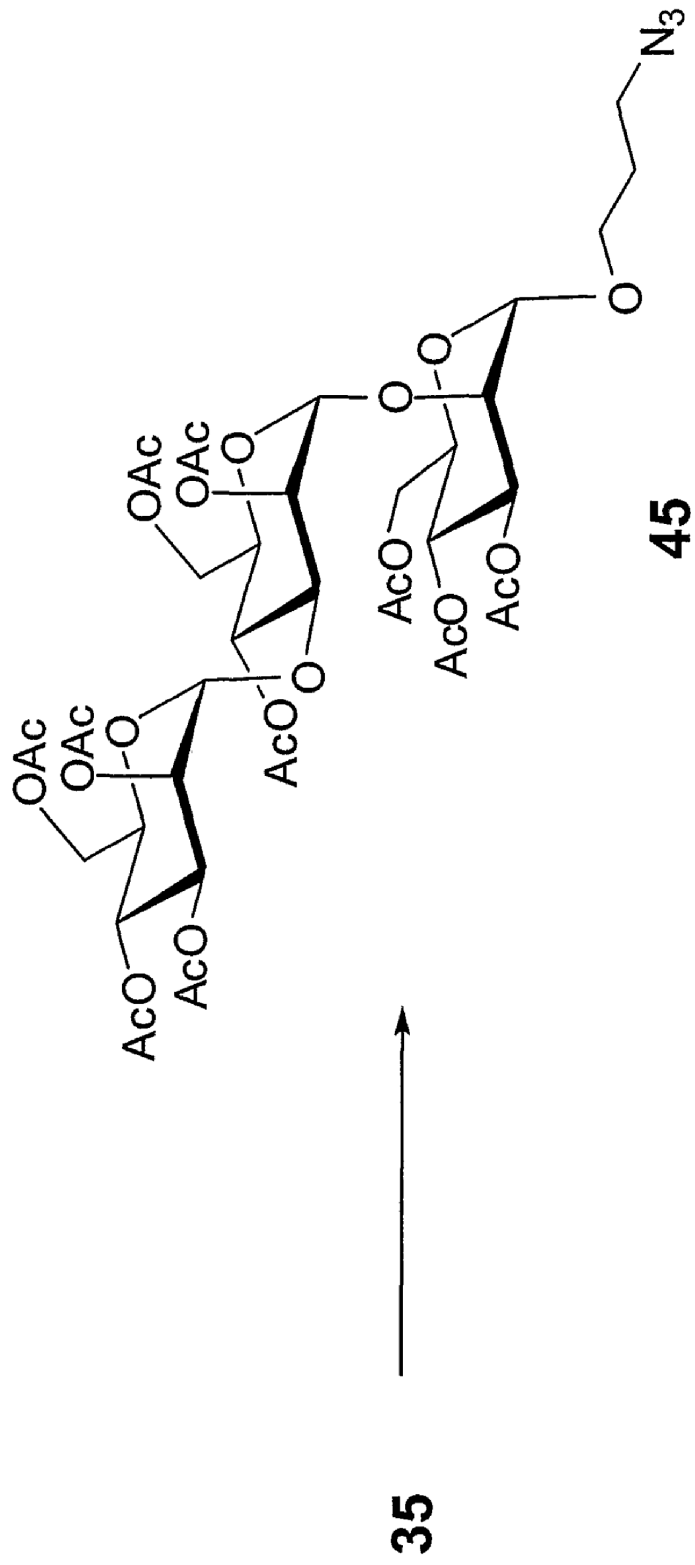
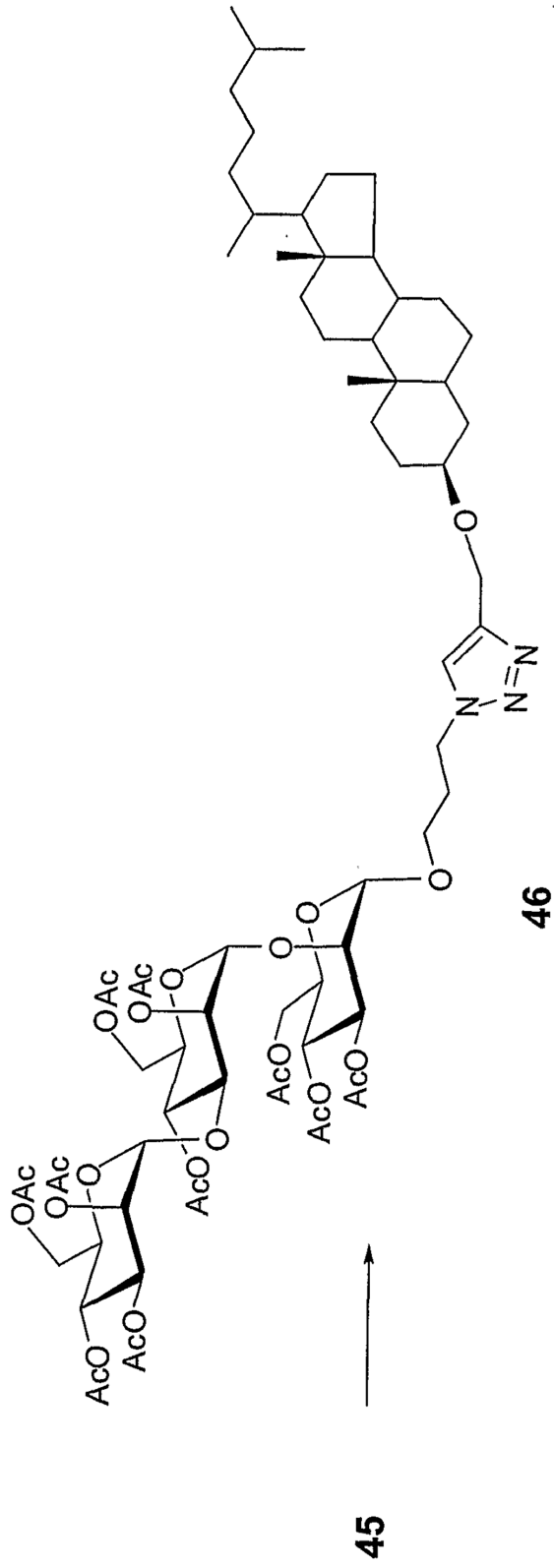
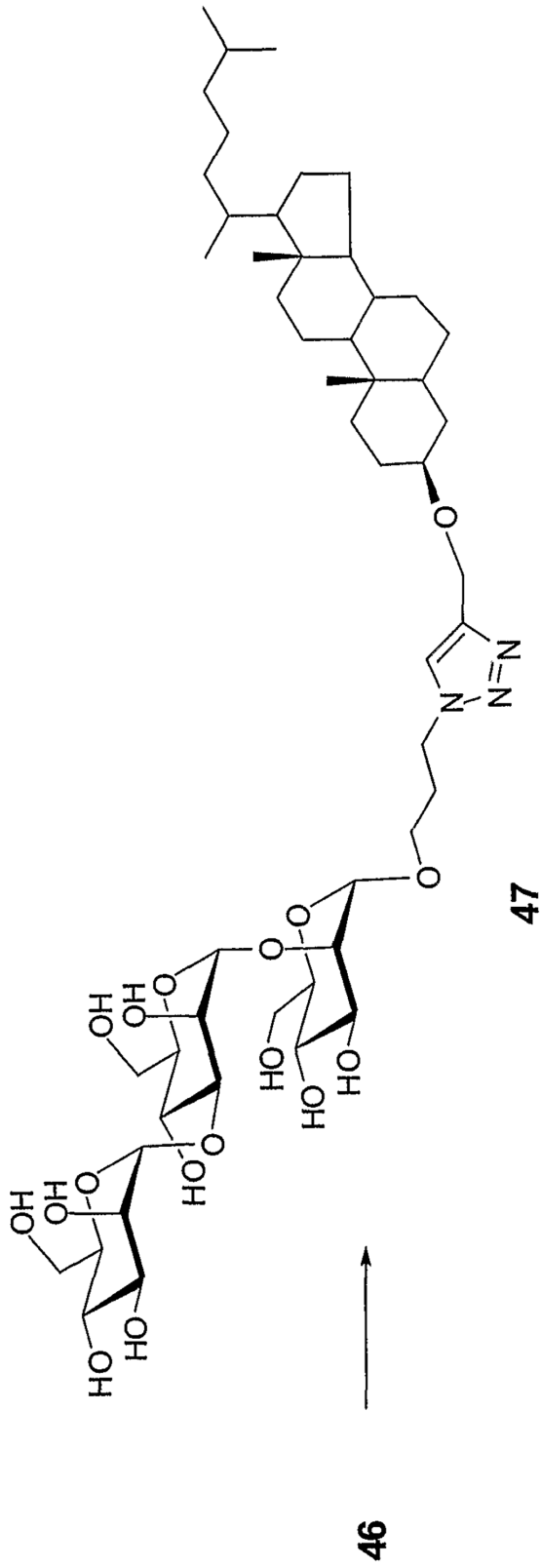


Figura 20:







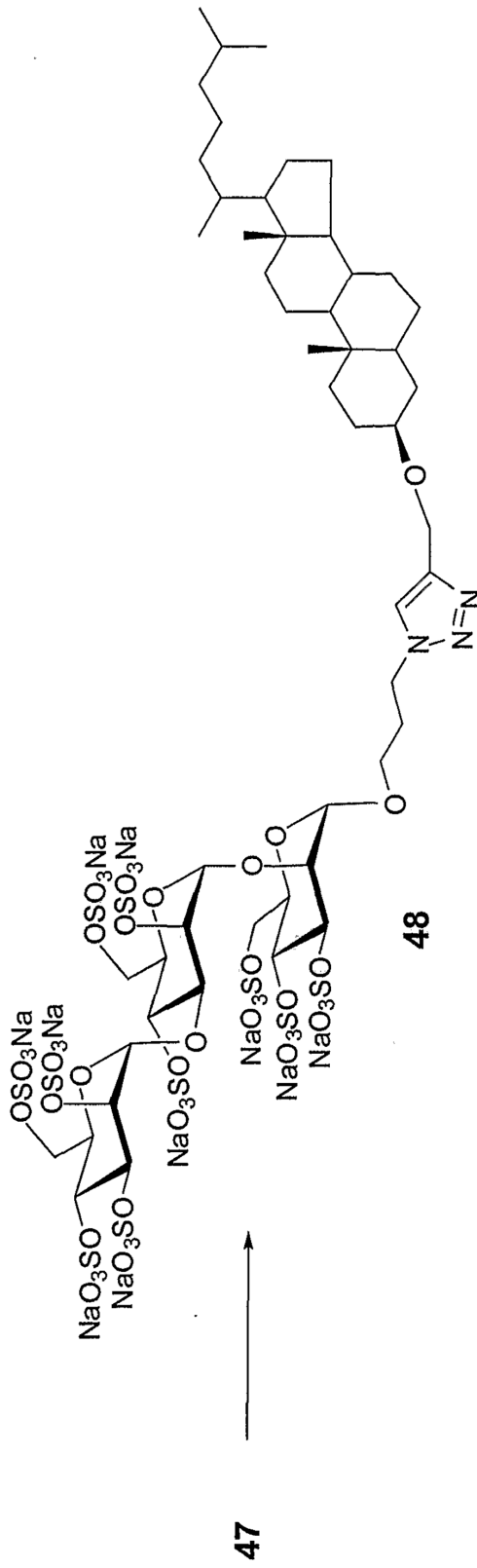
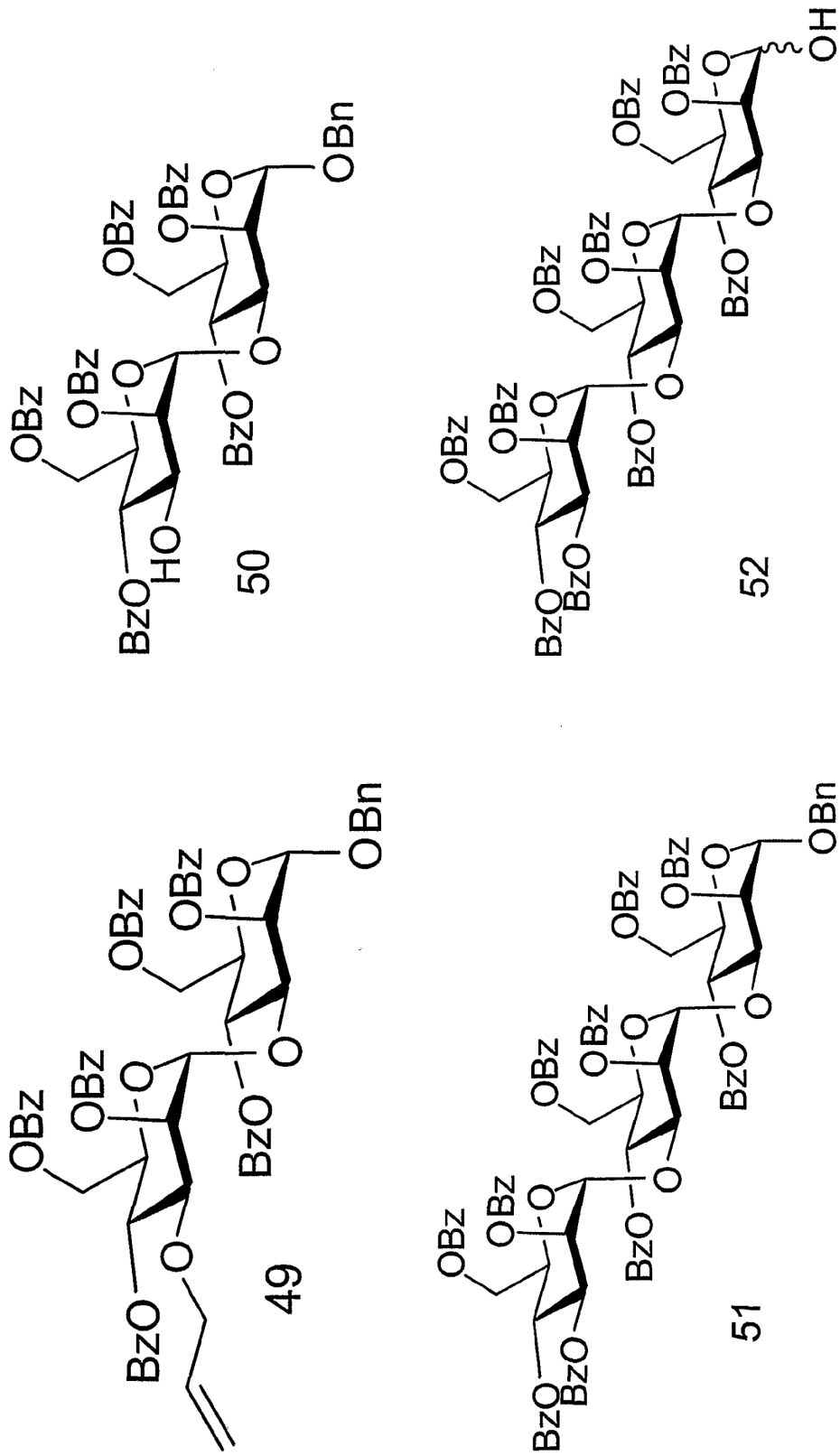
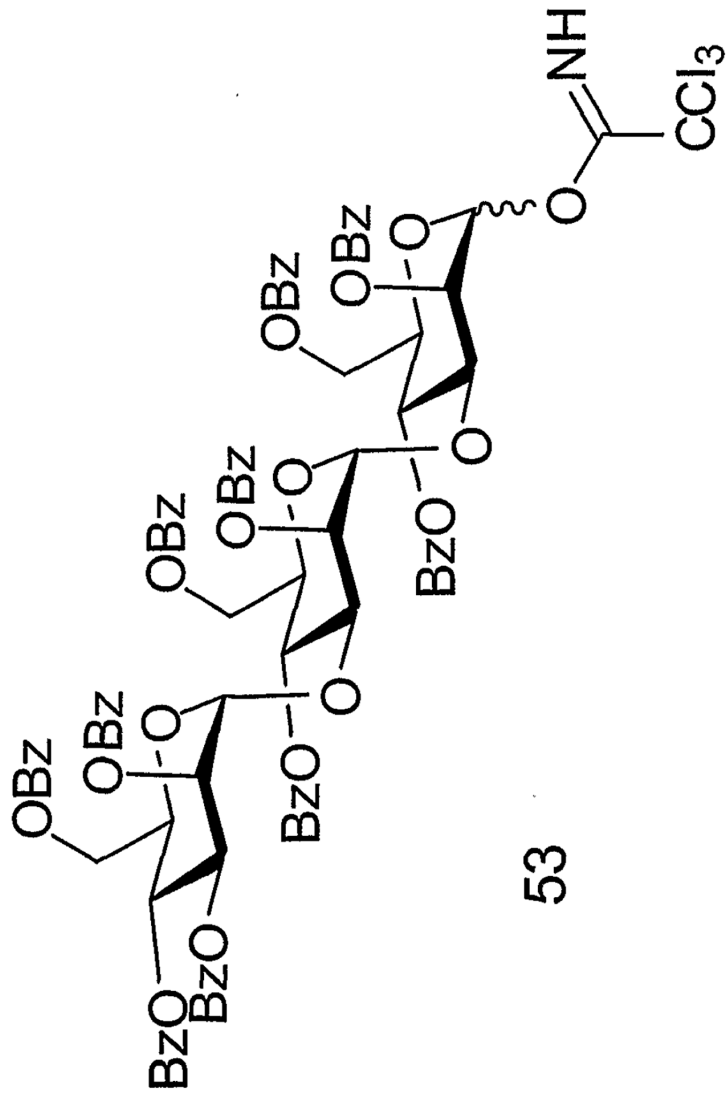
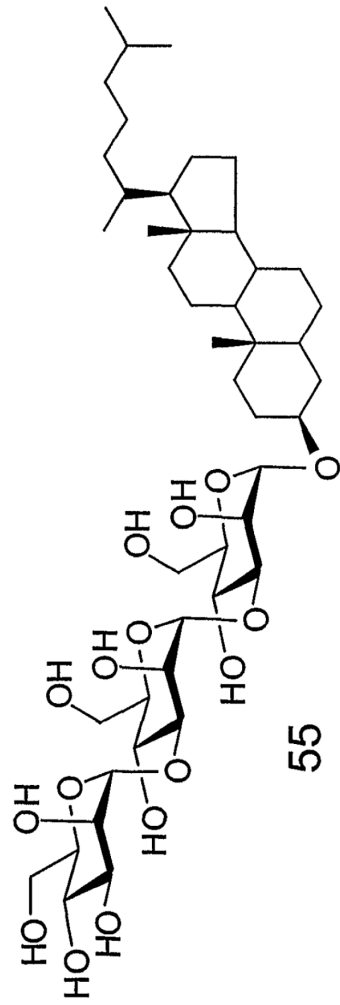
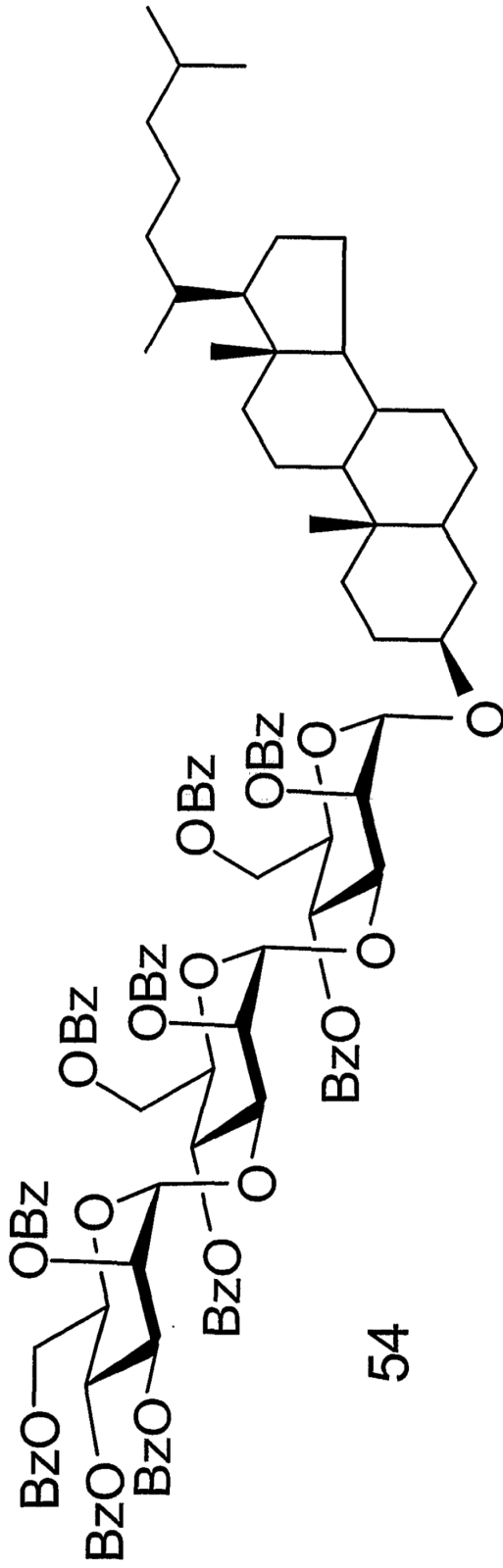


Figura 21:







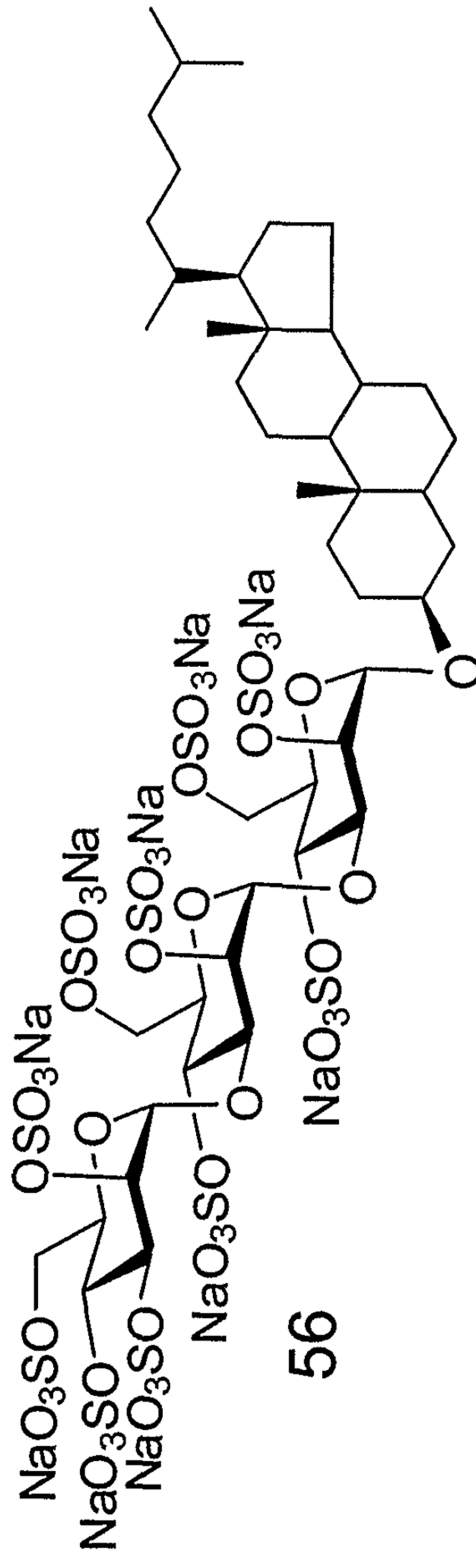
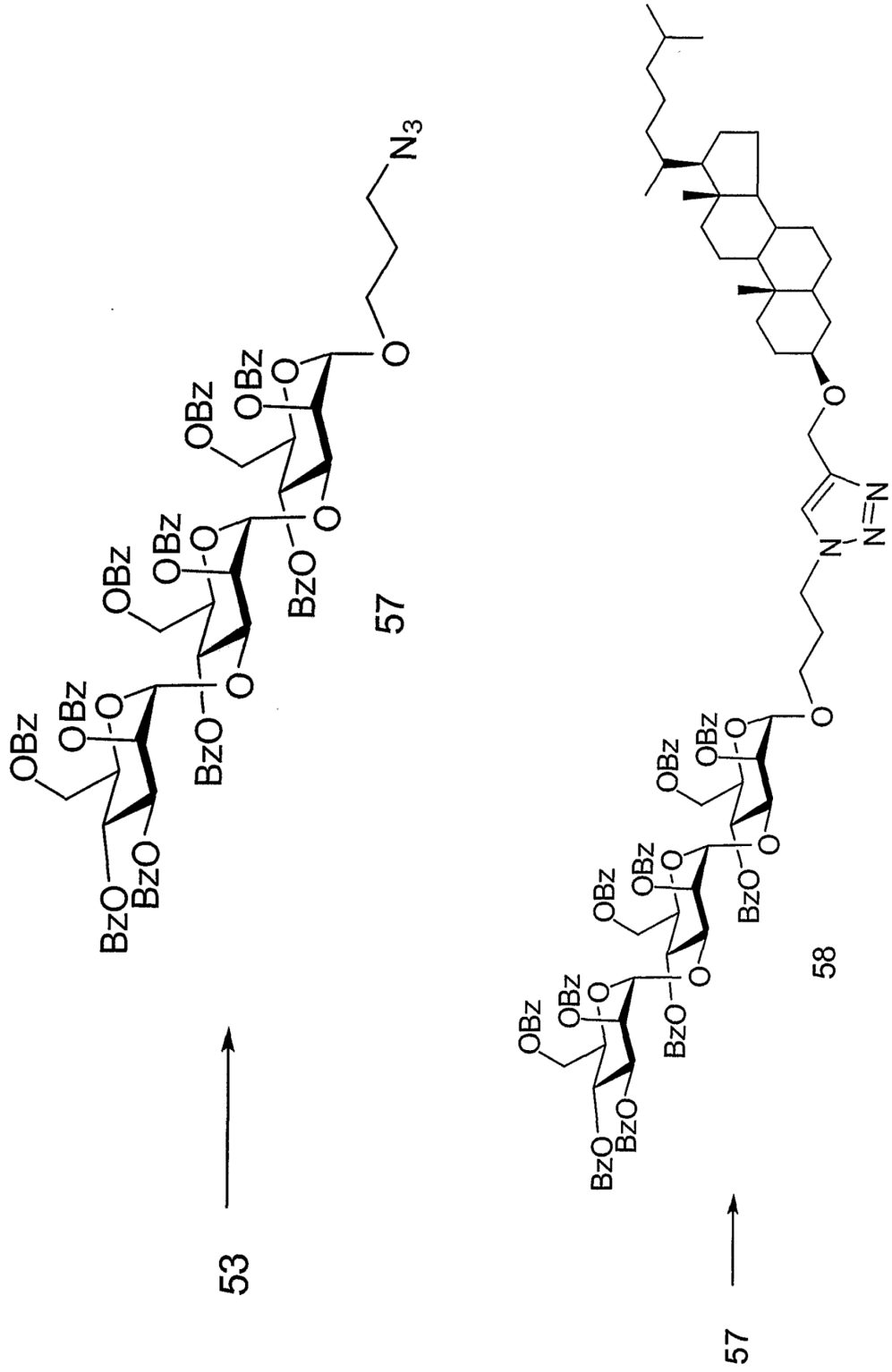


Figura 22:



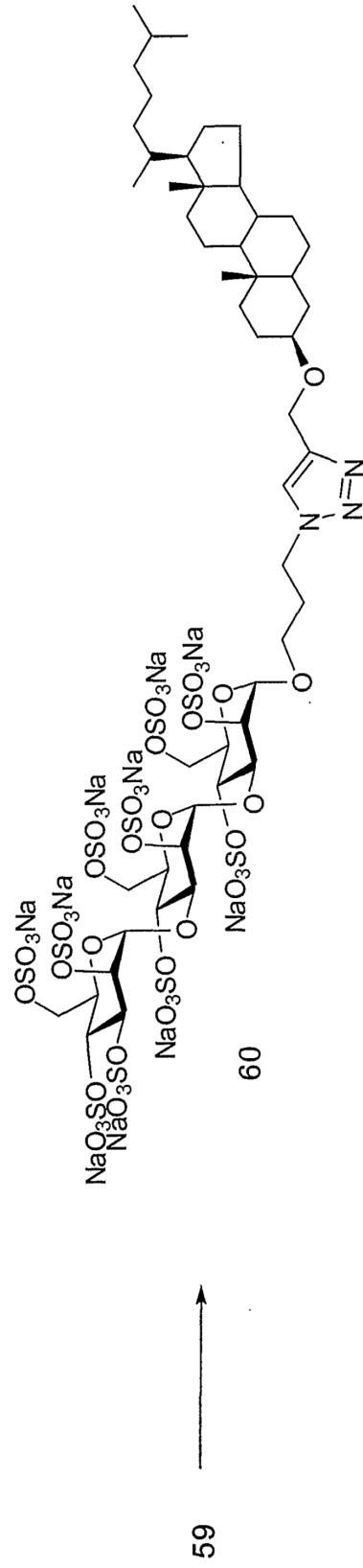
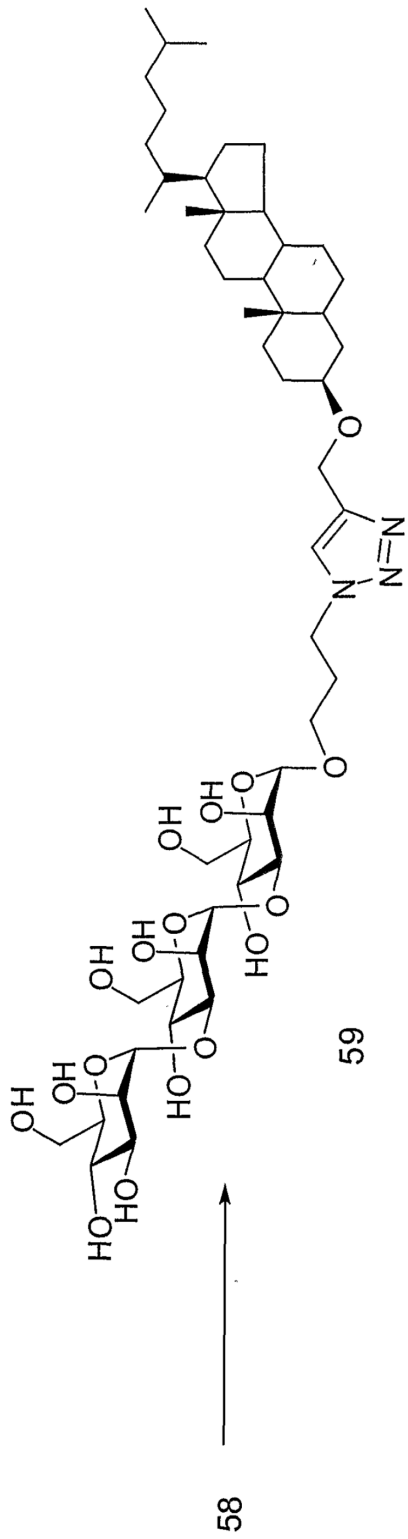
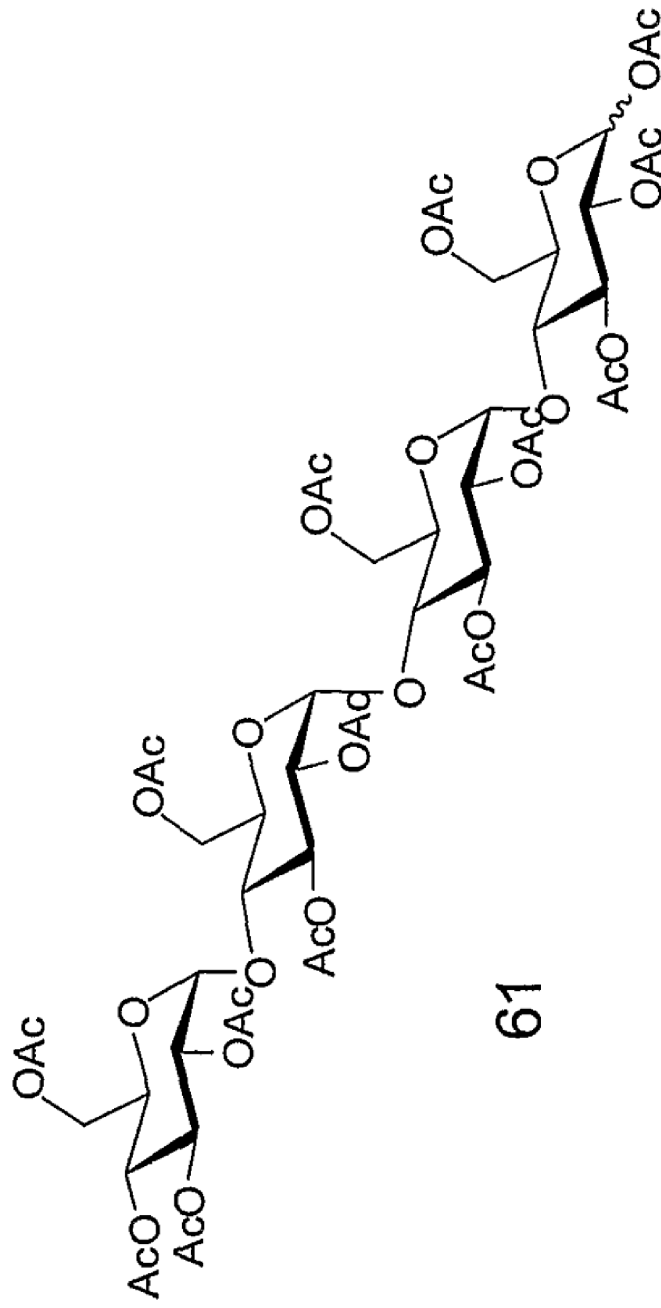
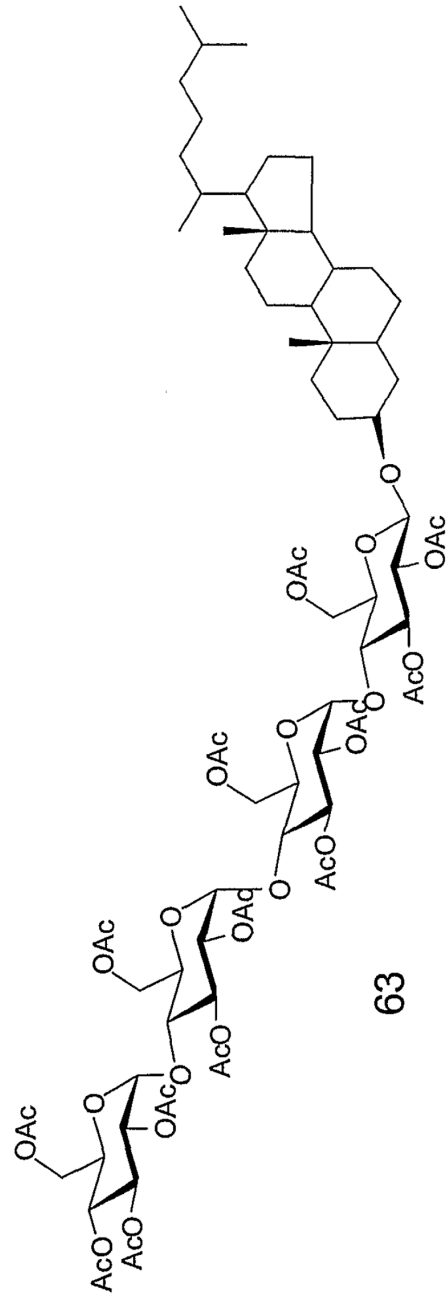
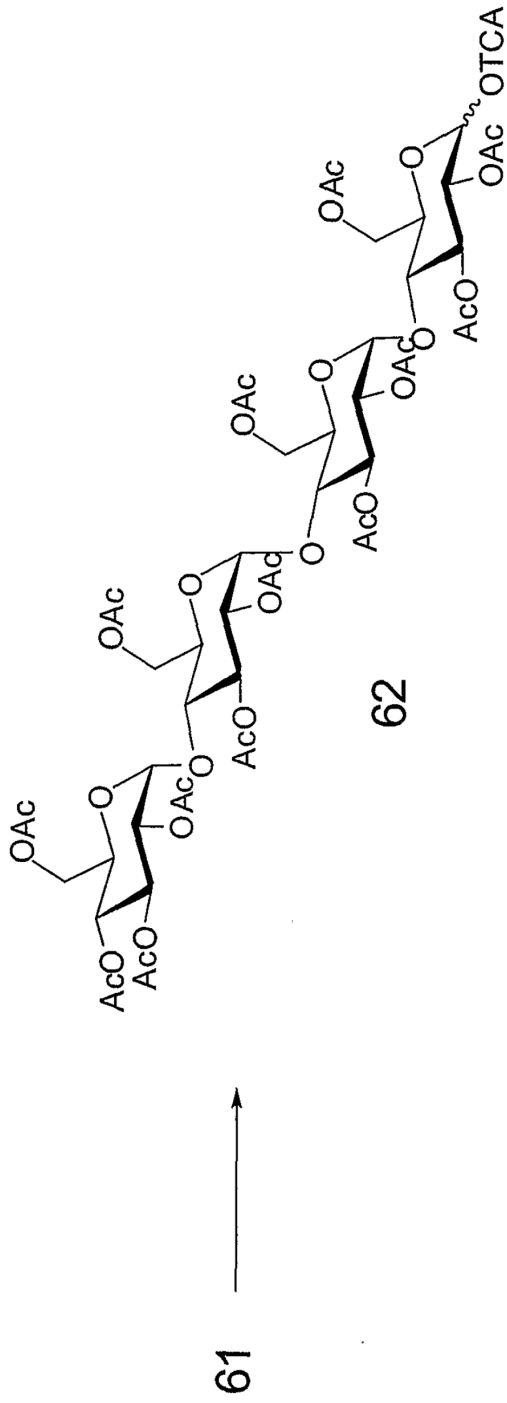
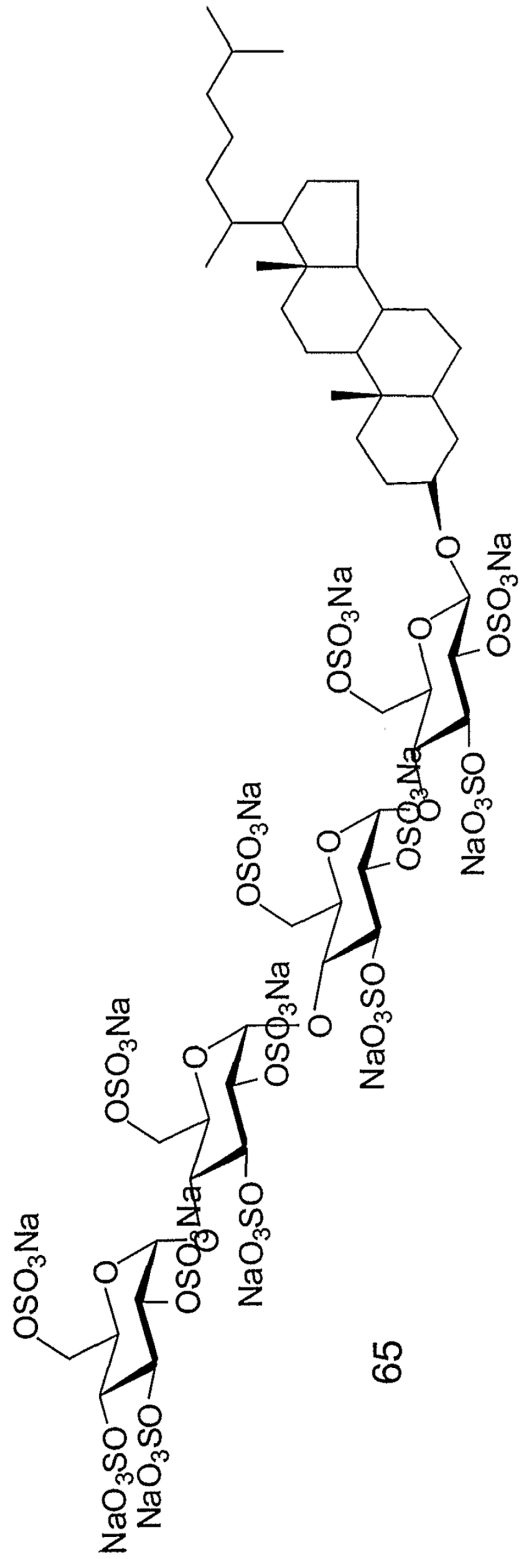
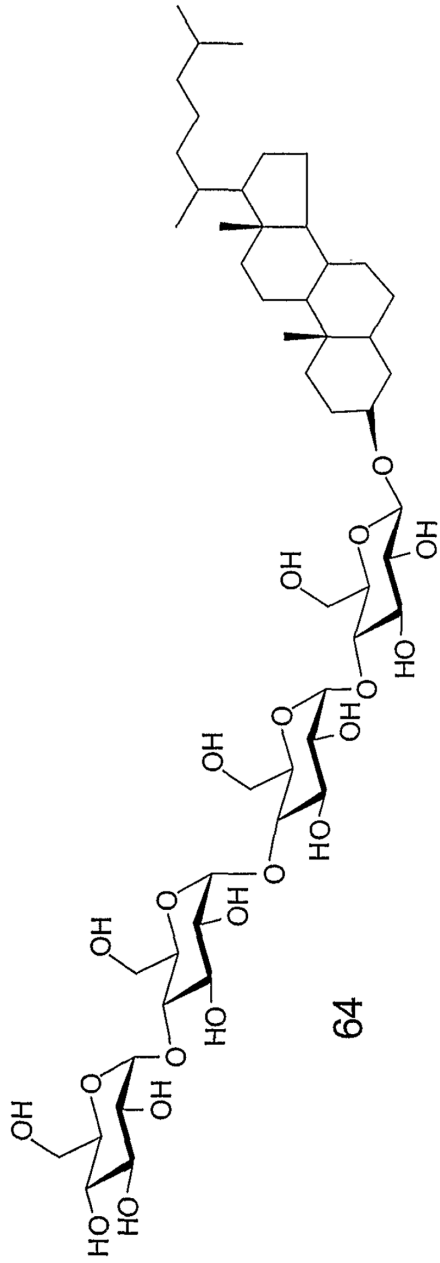
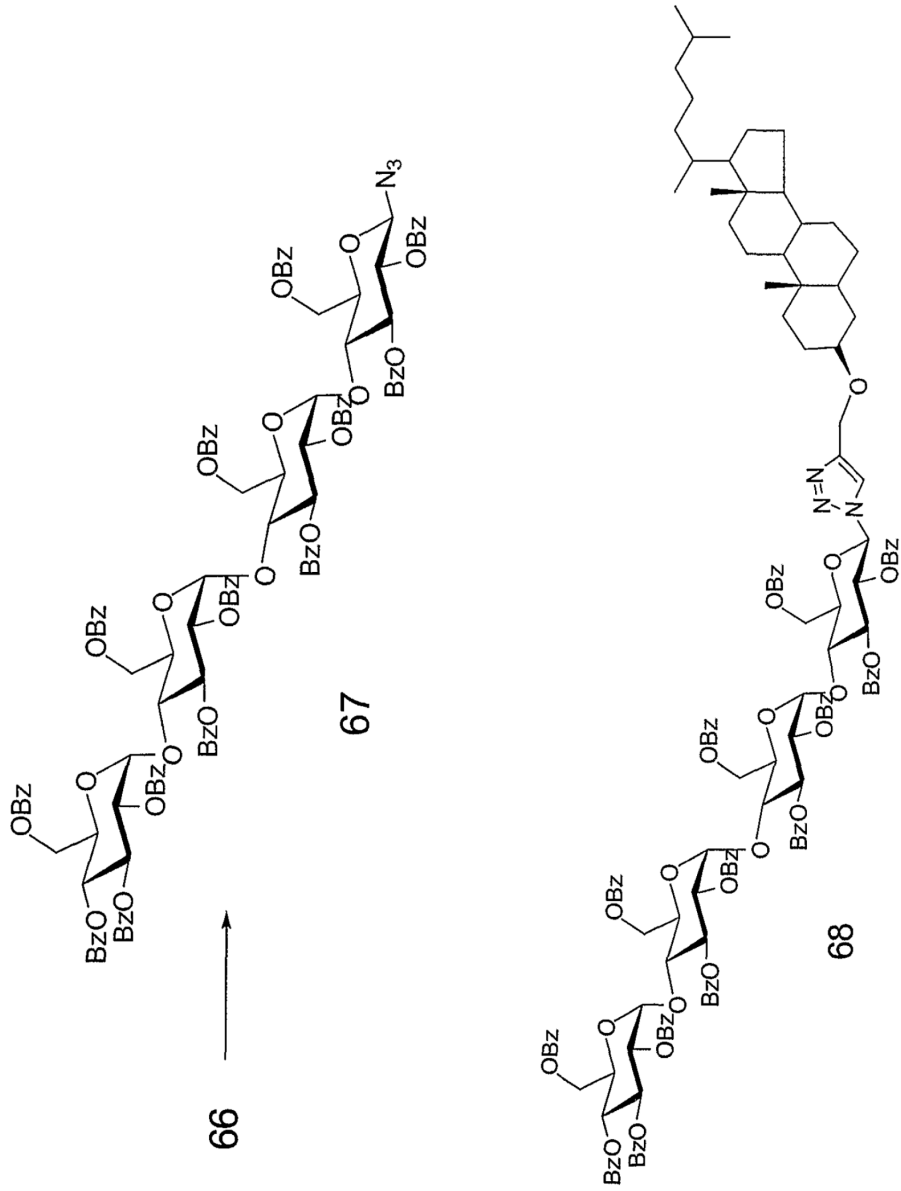


Figura 23:









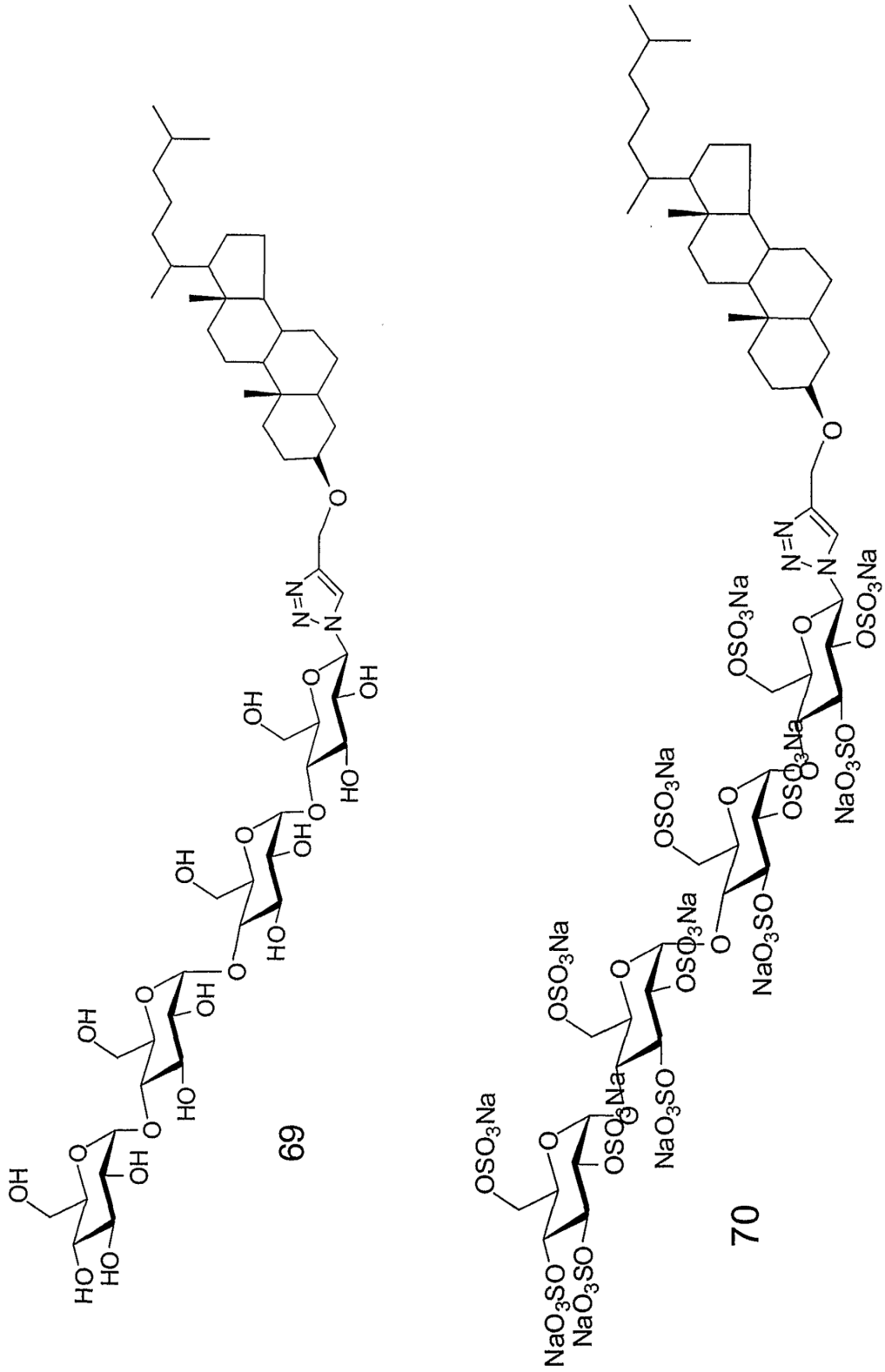
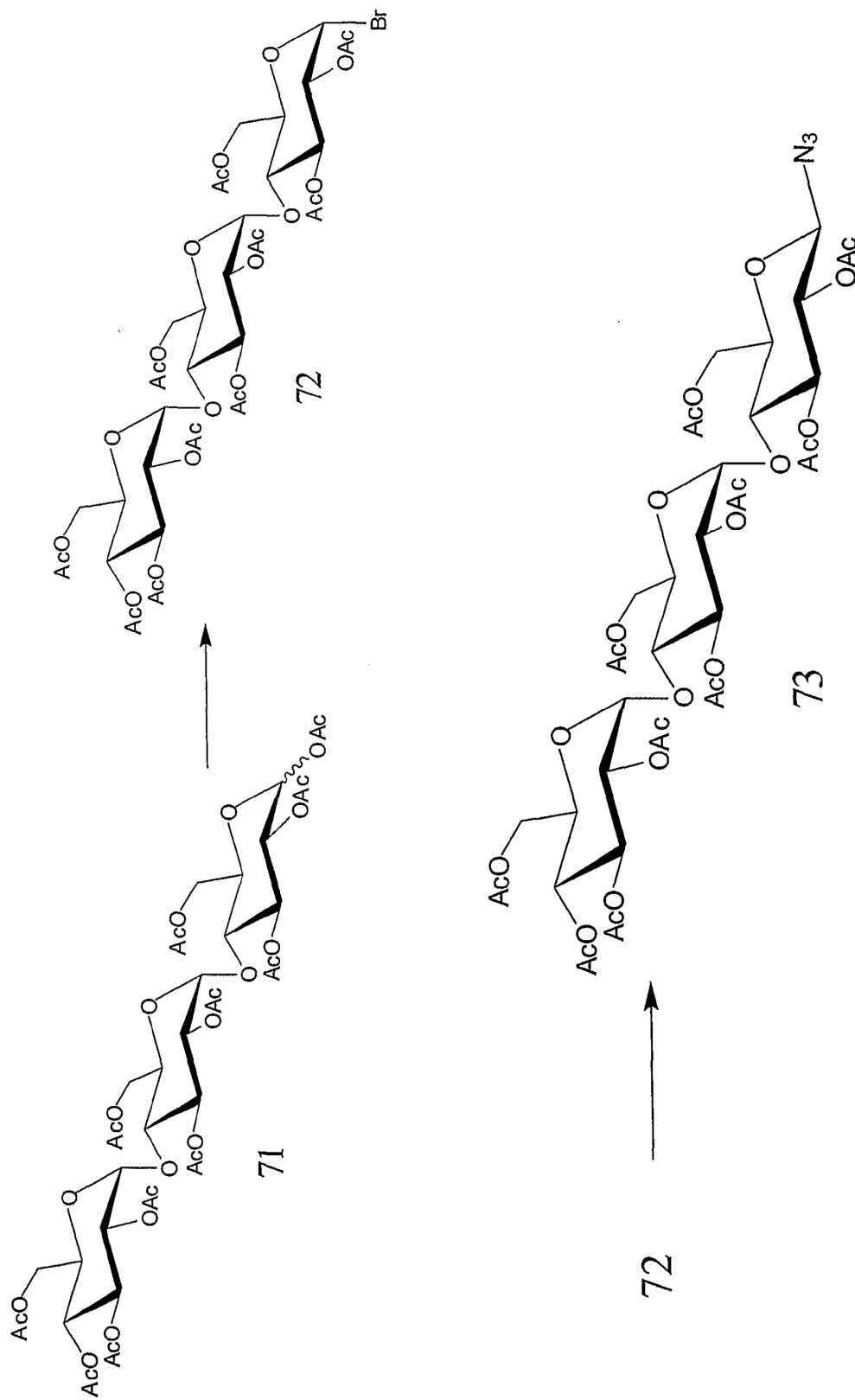
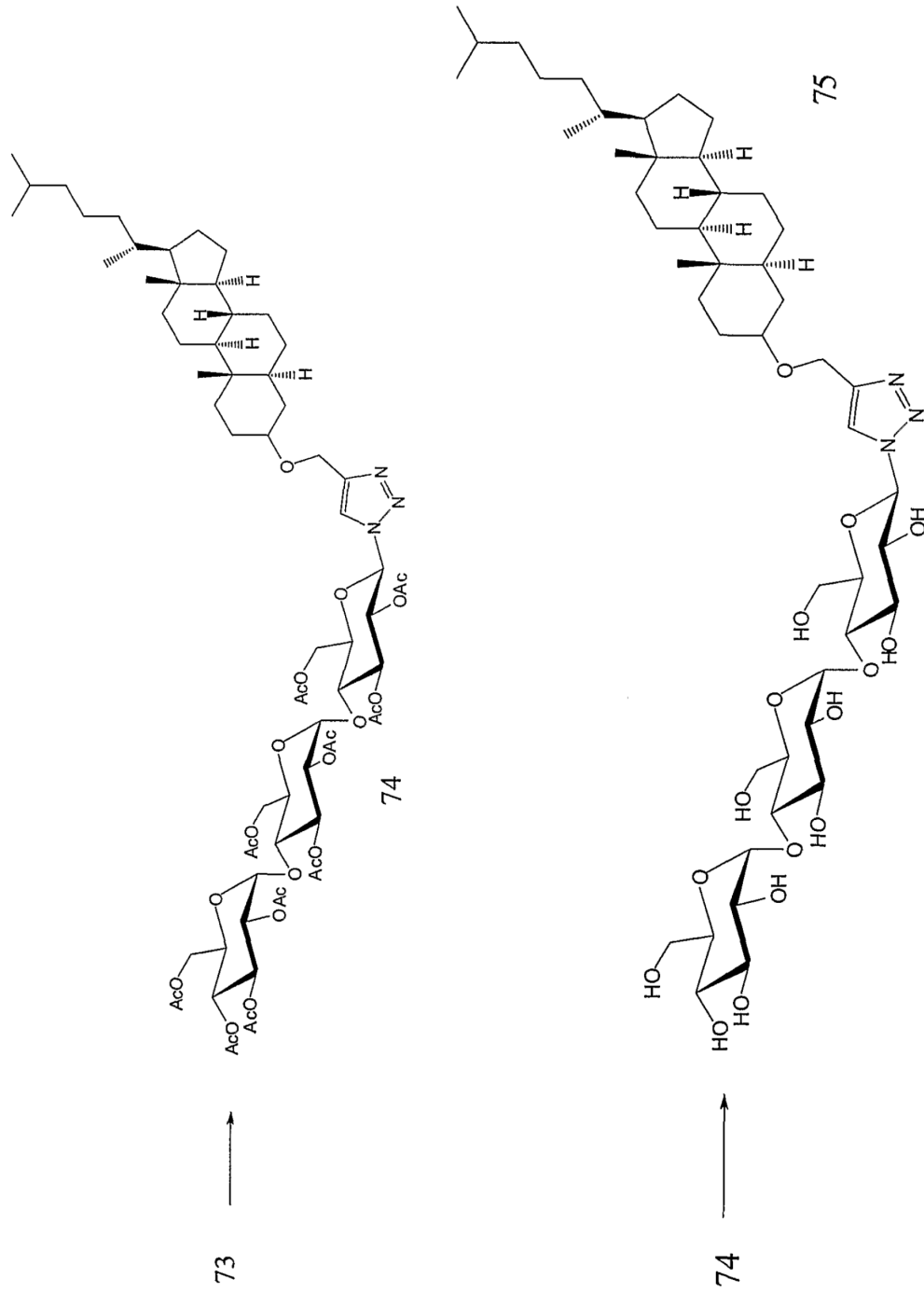
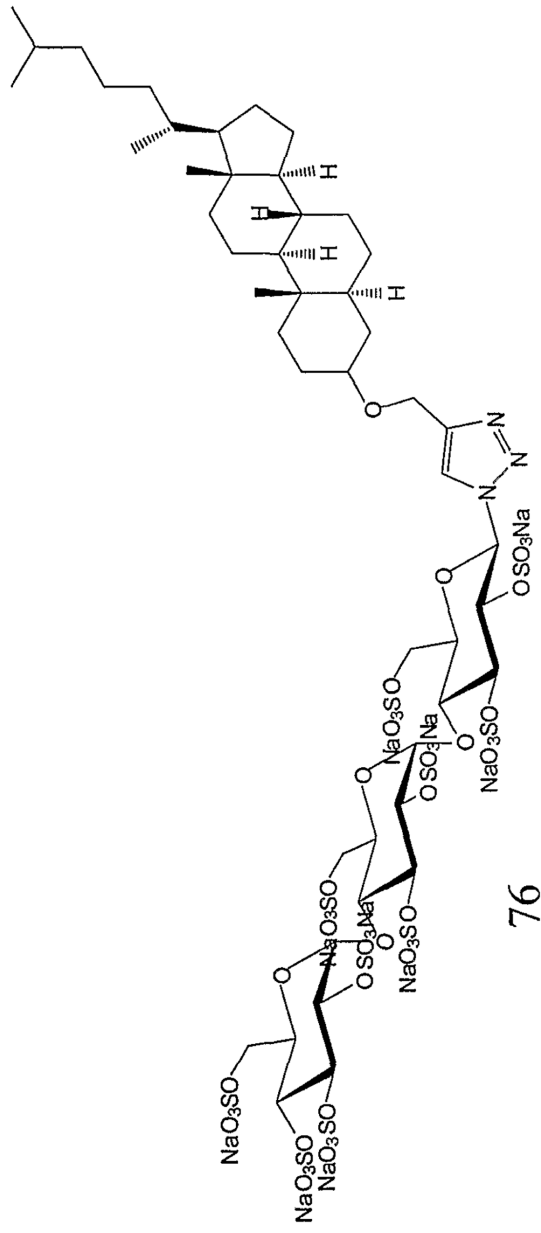


Figura 25:



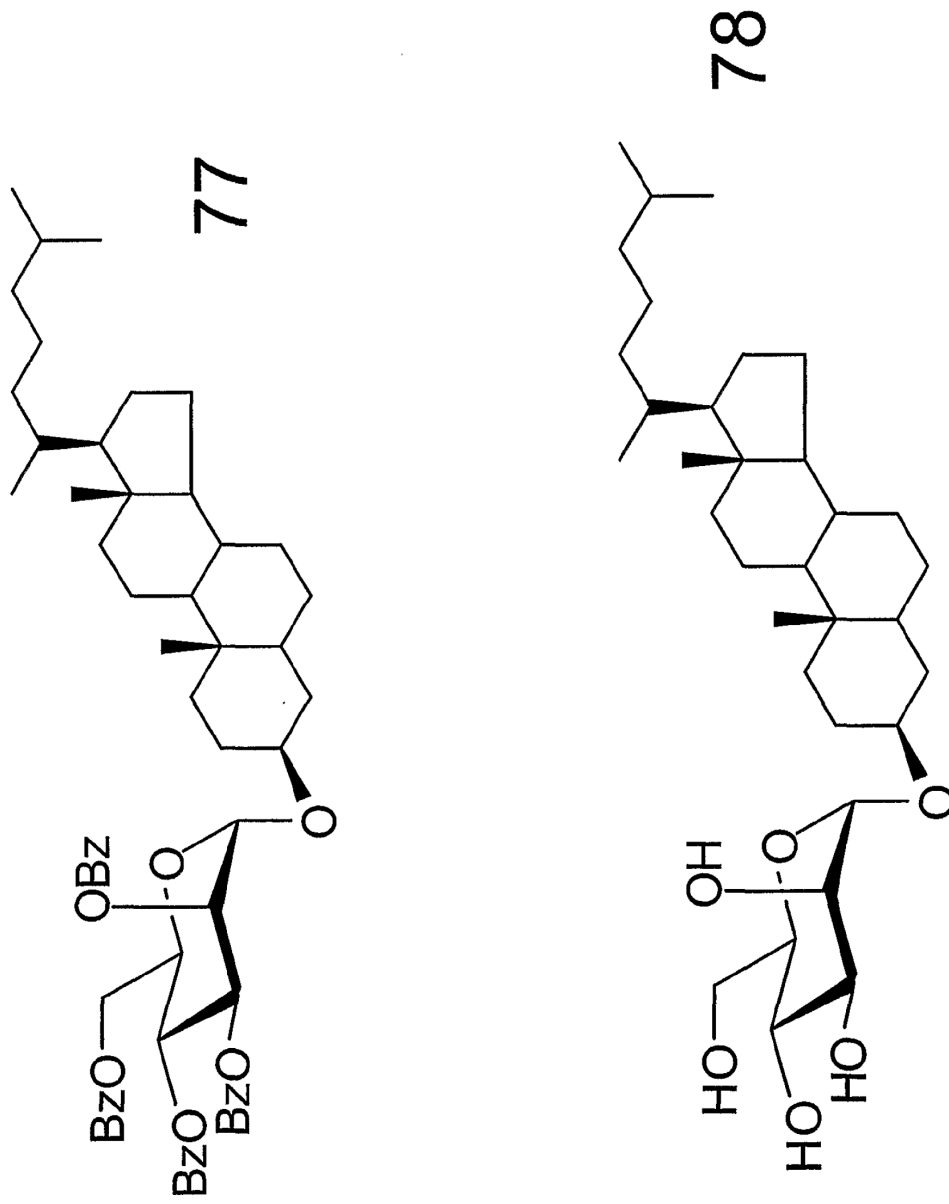




75

76

Figura 26:



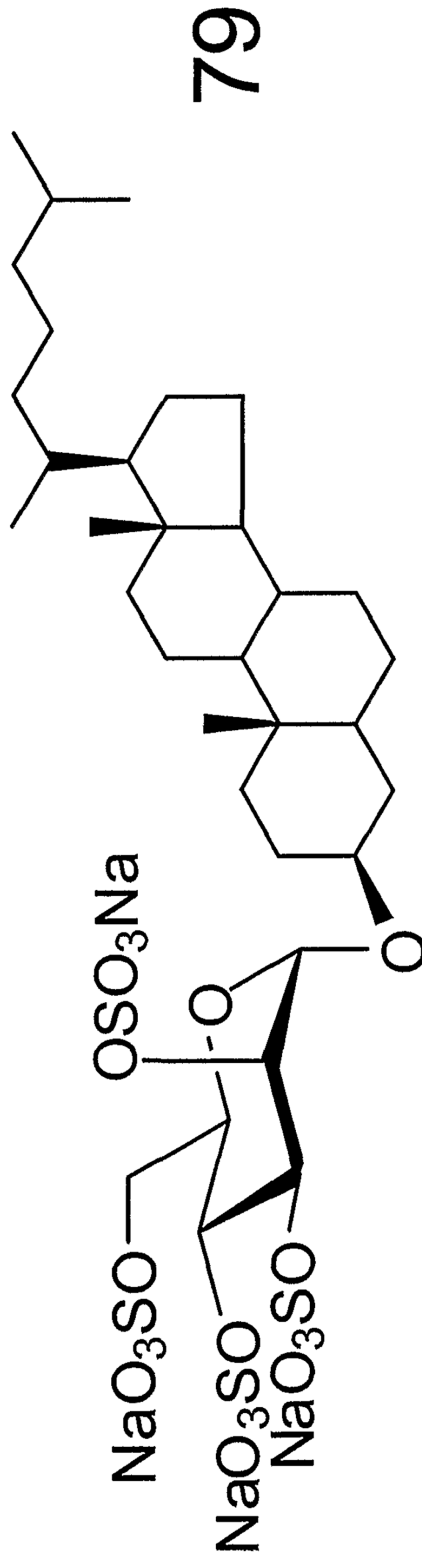
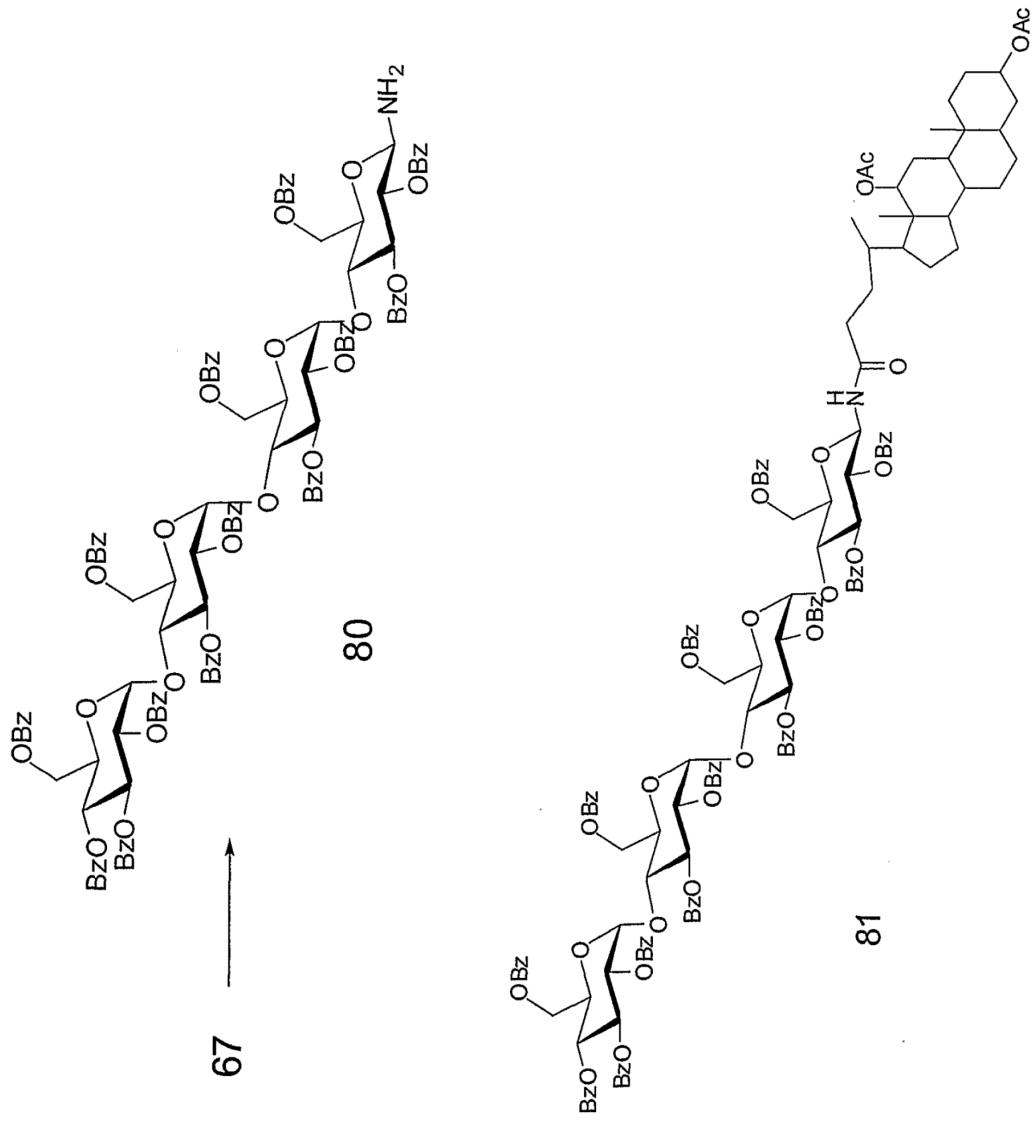
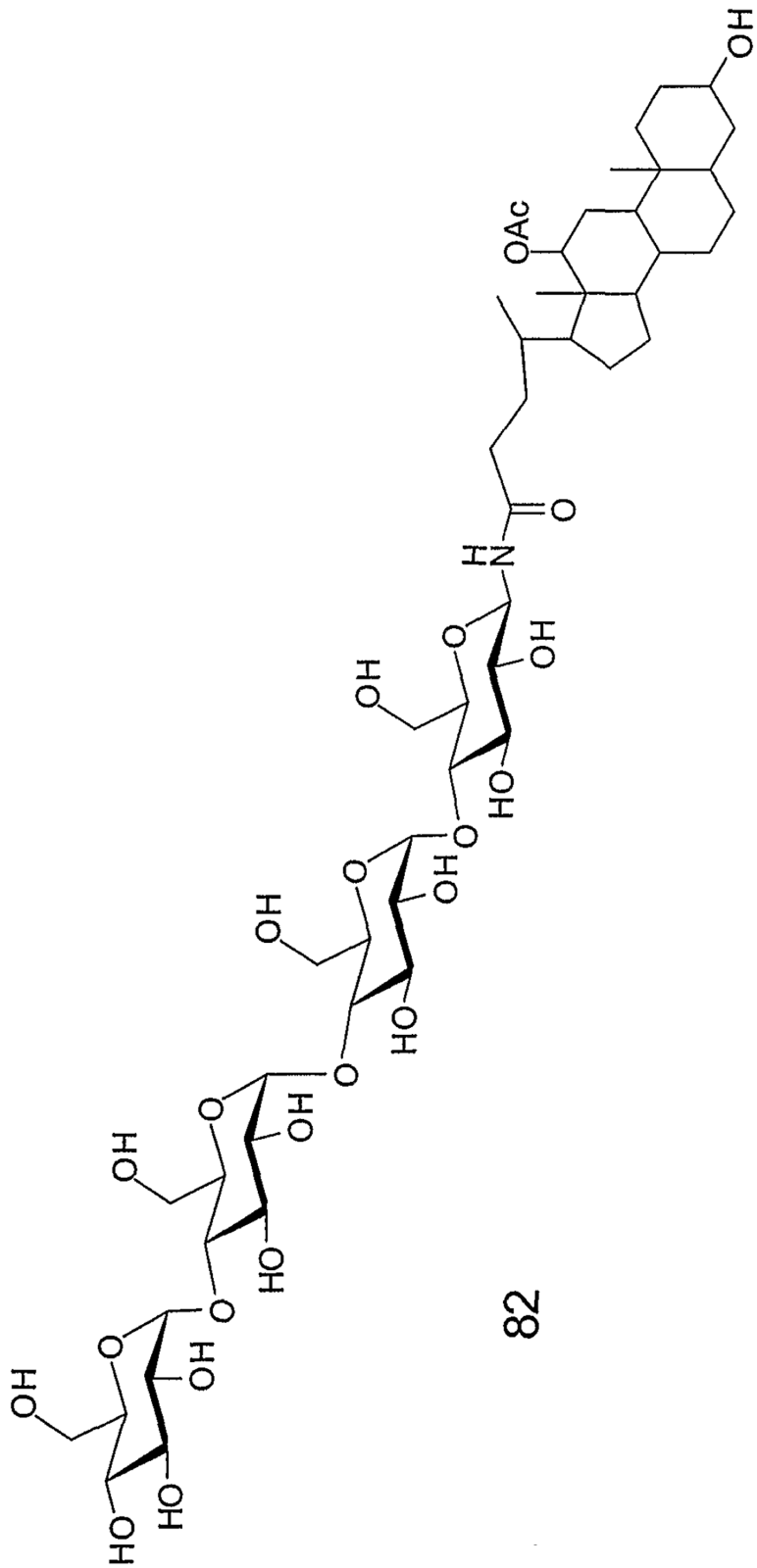
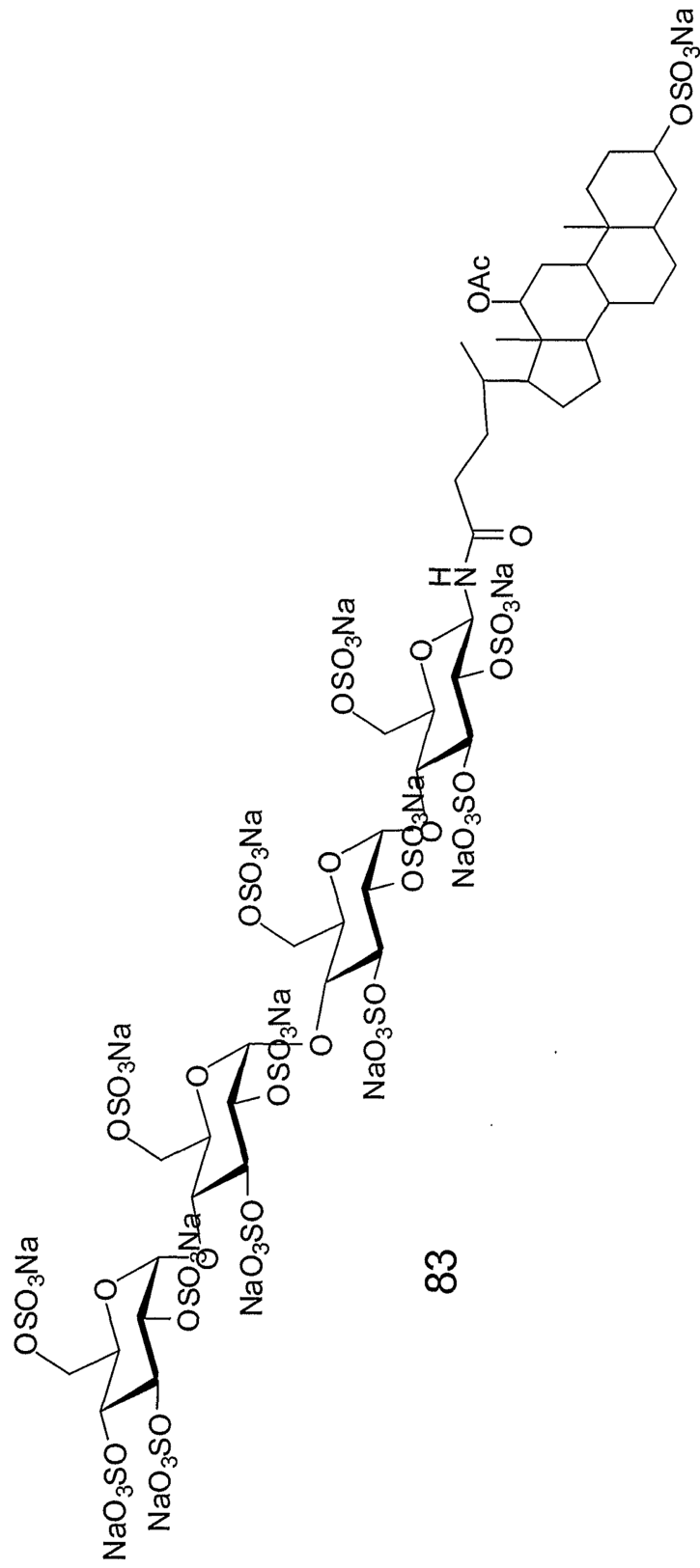


Figura 27:

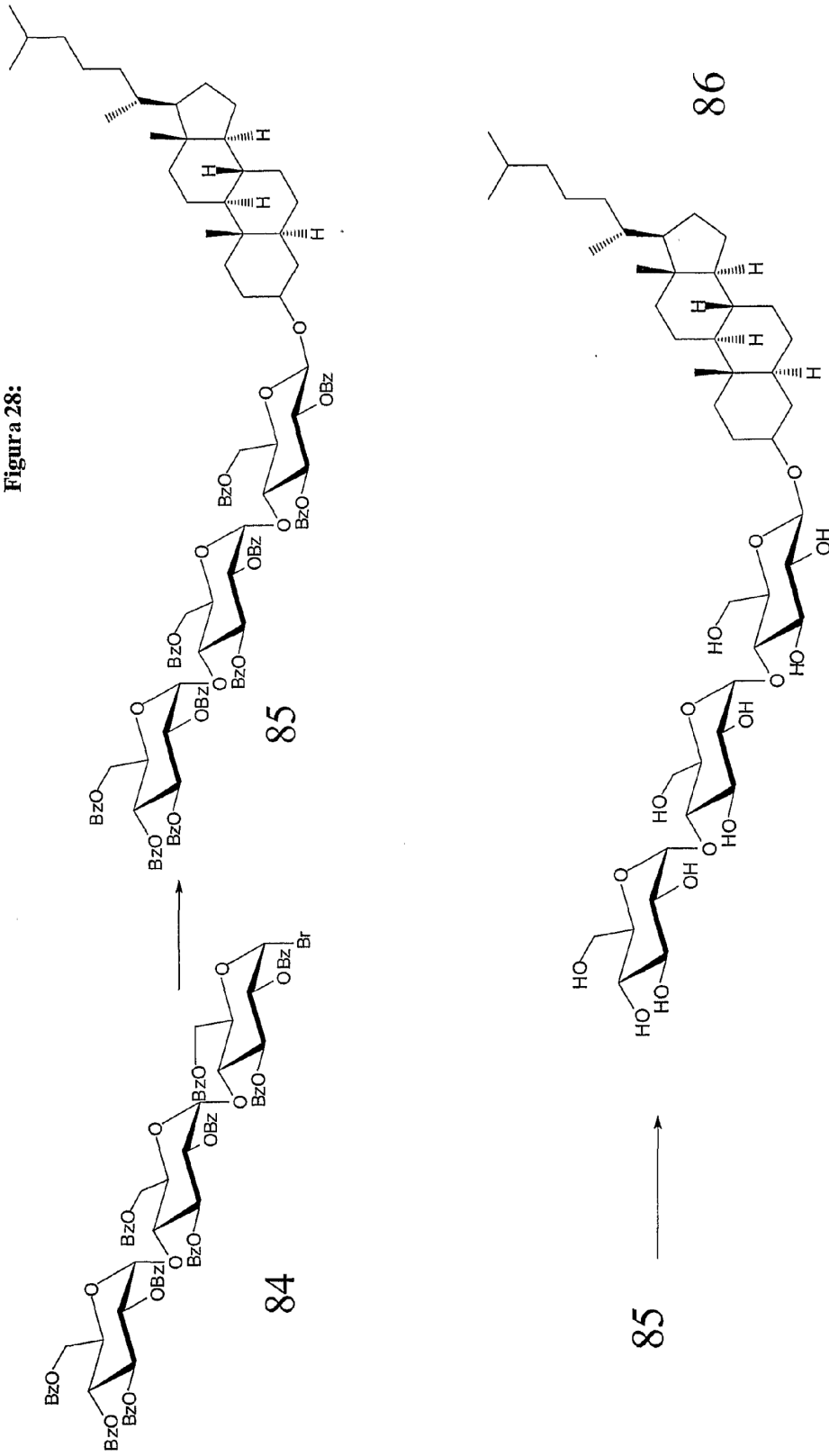




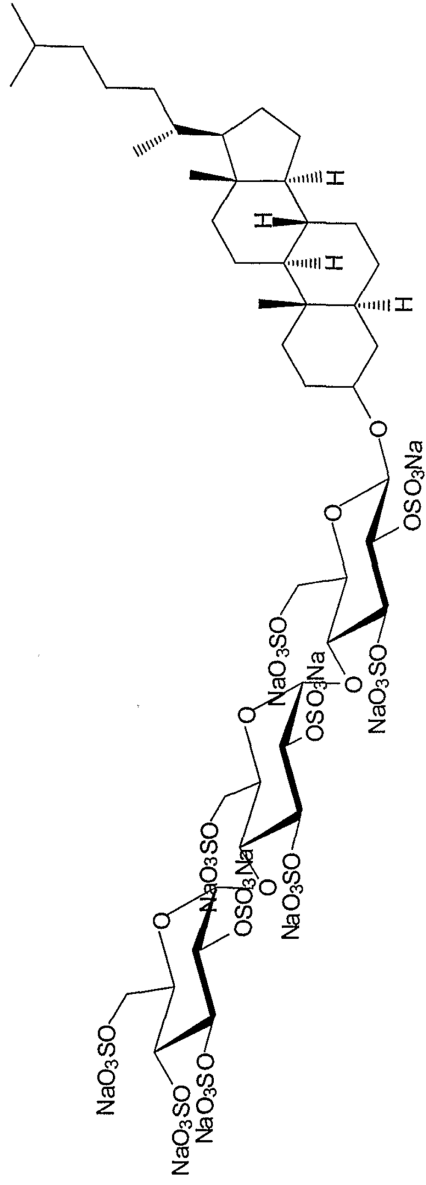


83

Figura 28:



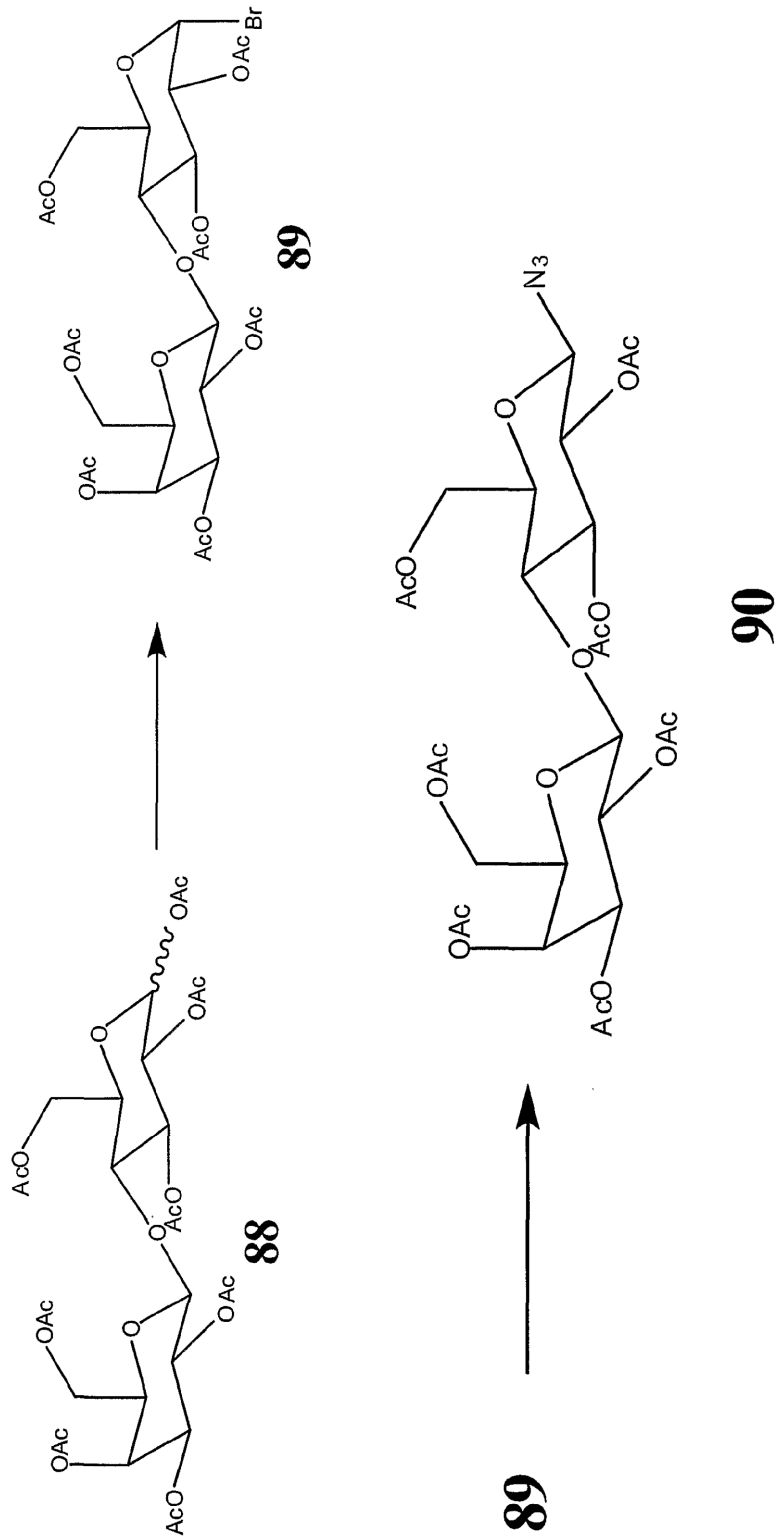
87

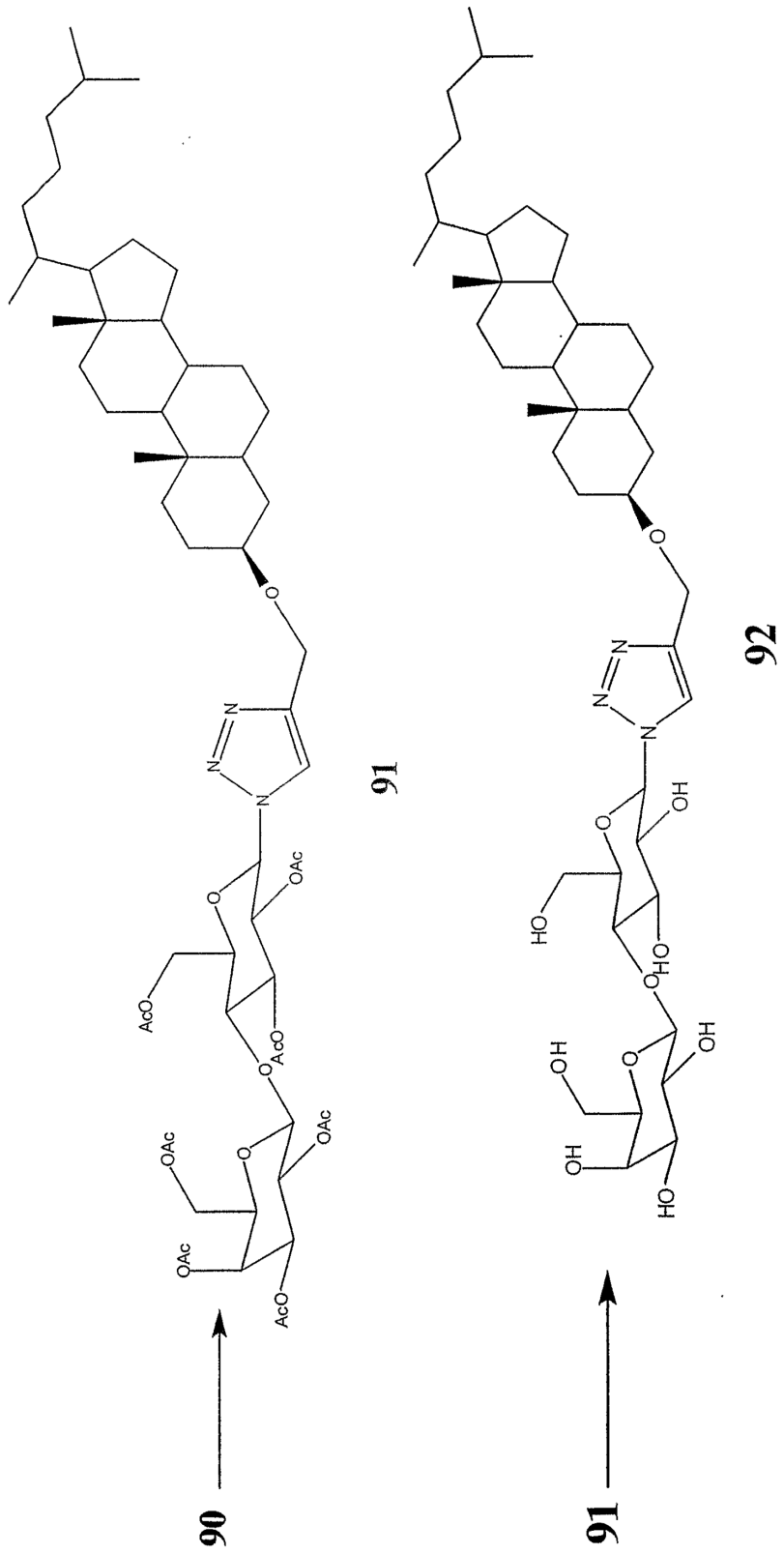


86



Figura 29:





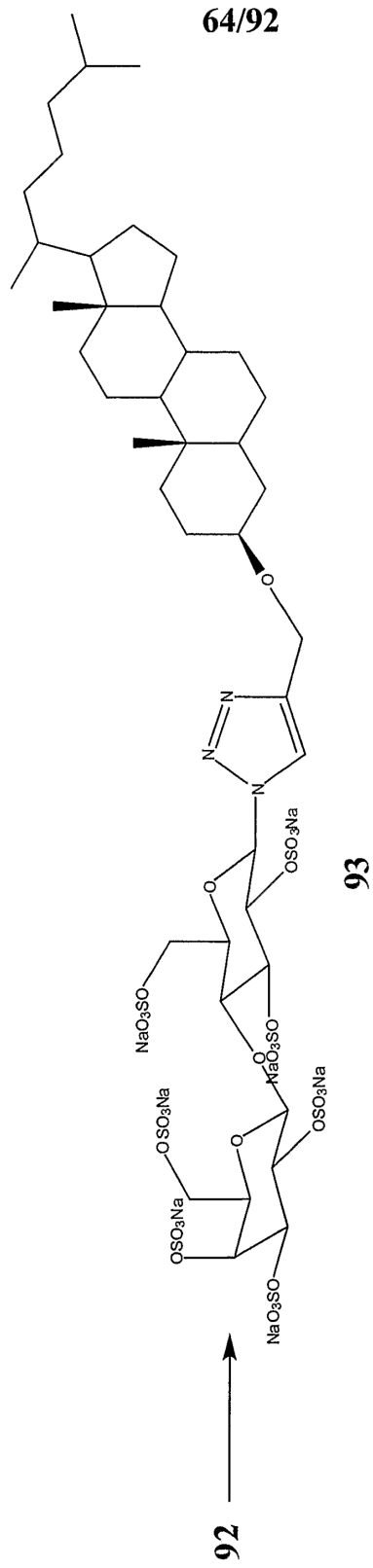
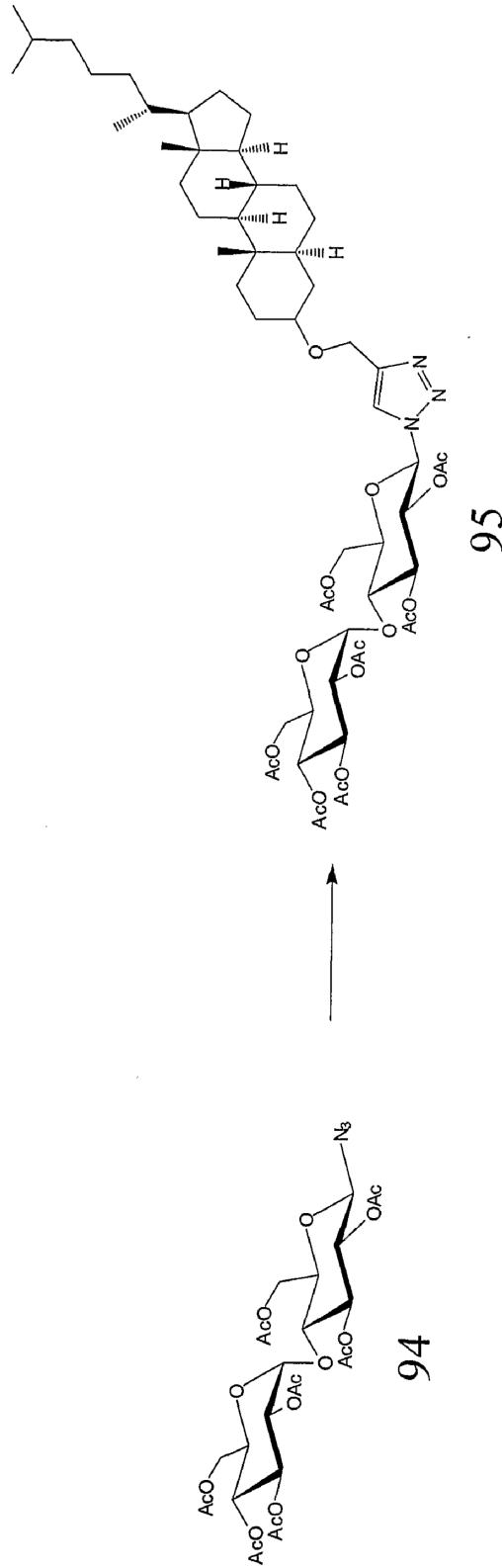
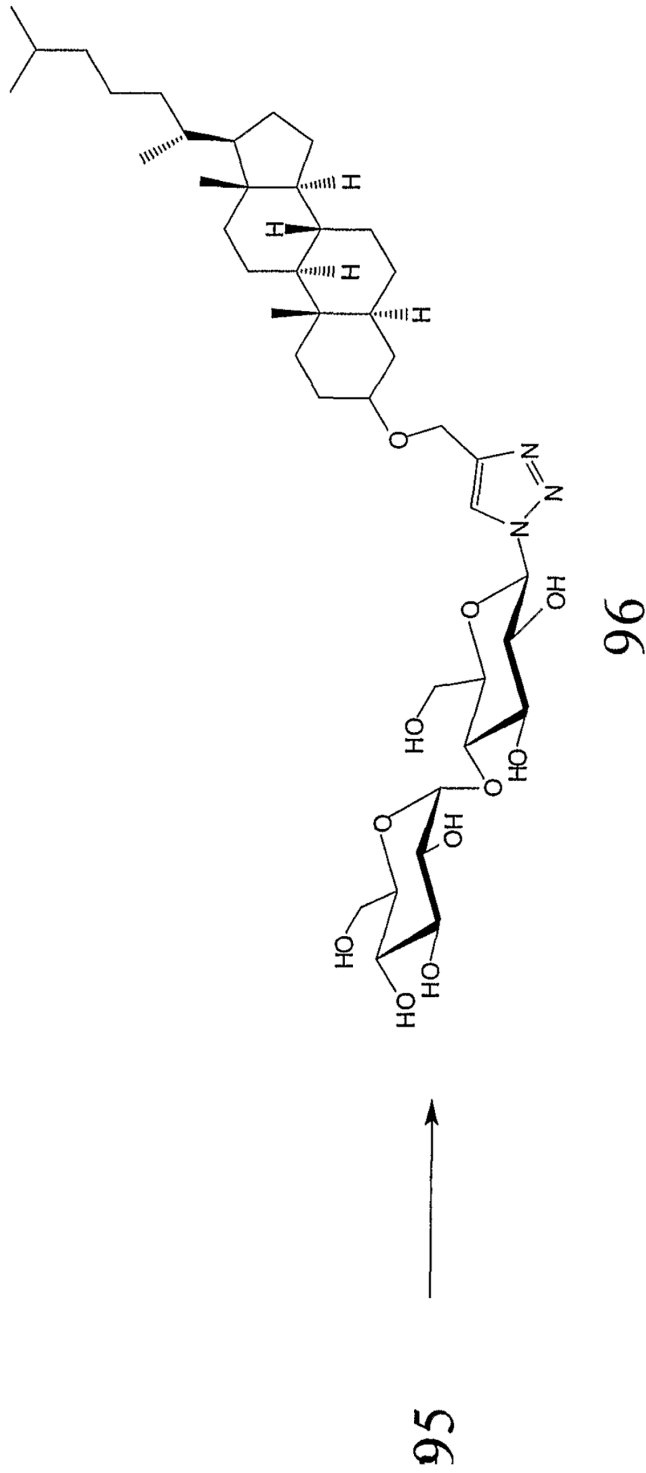
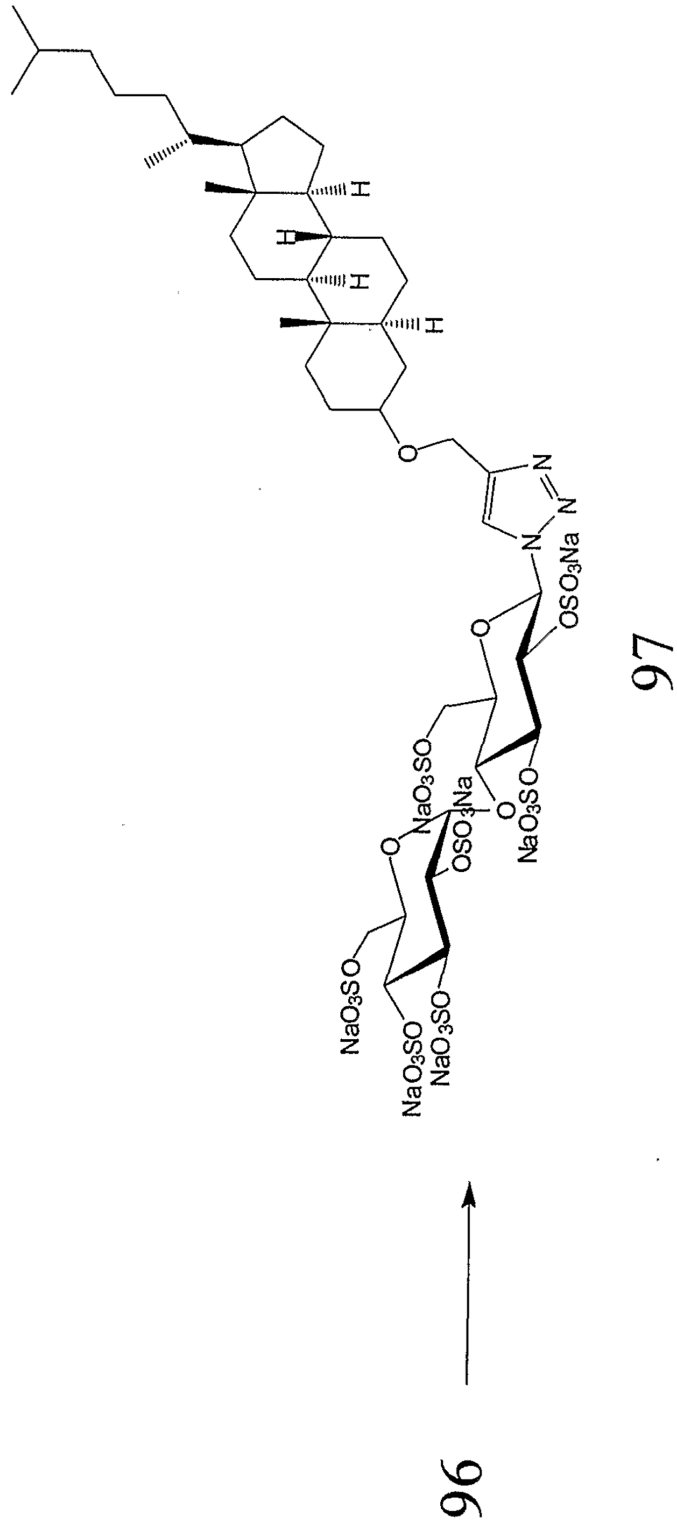
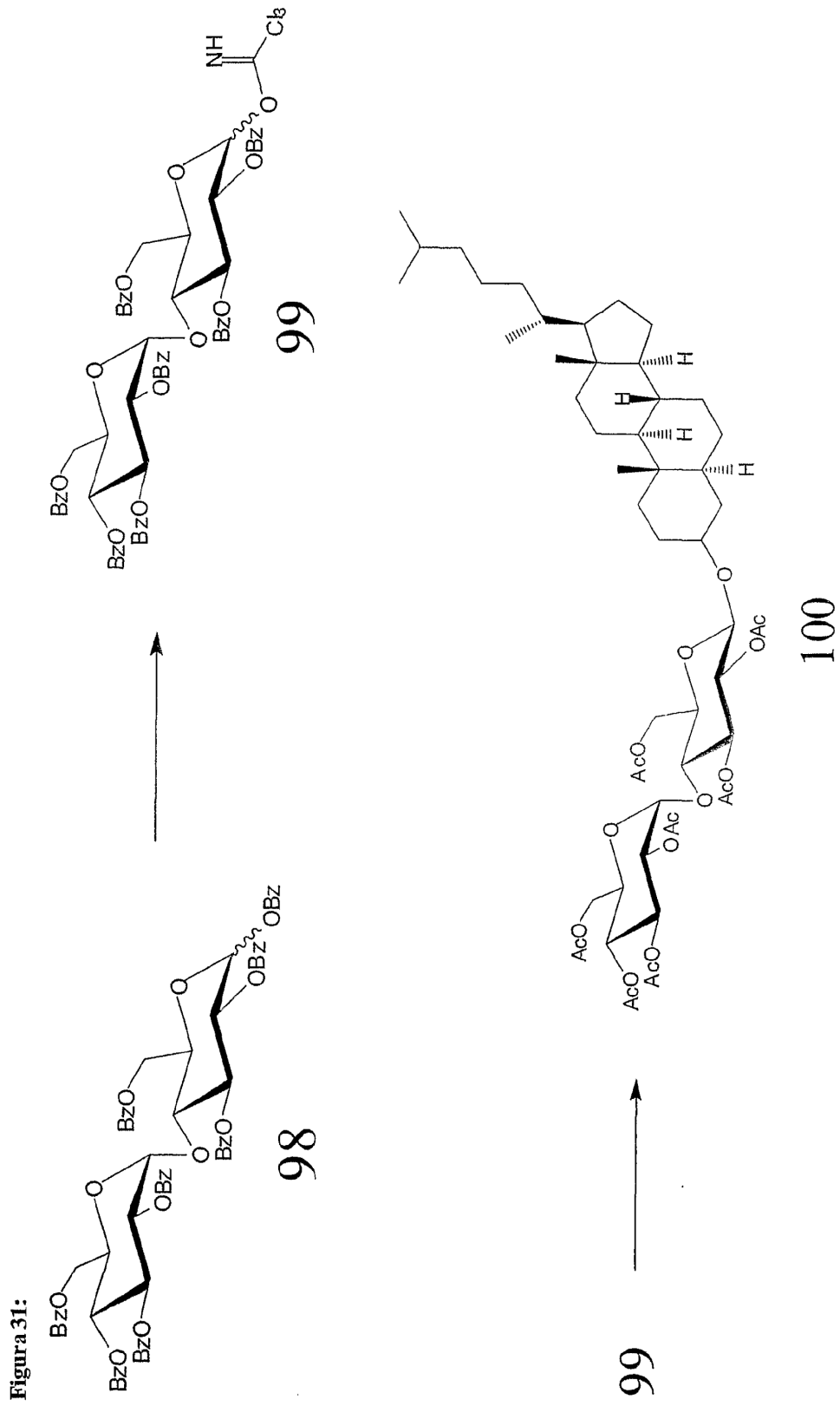


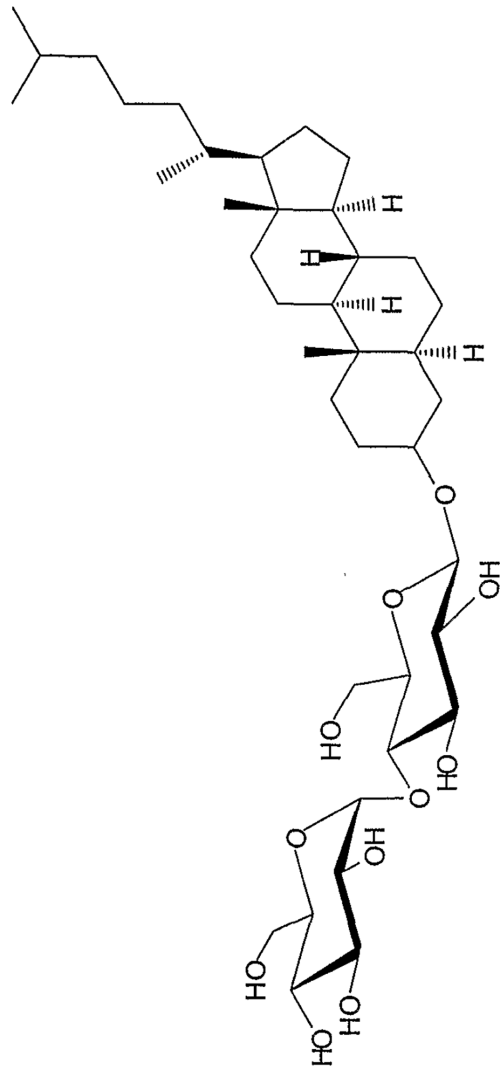
Figura 30:









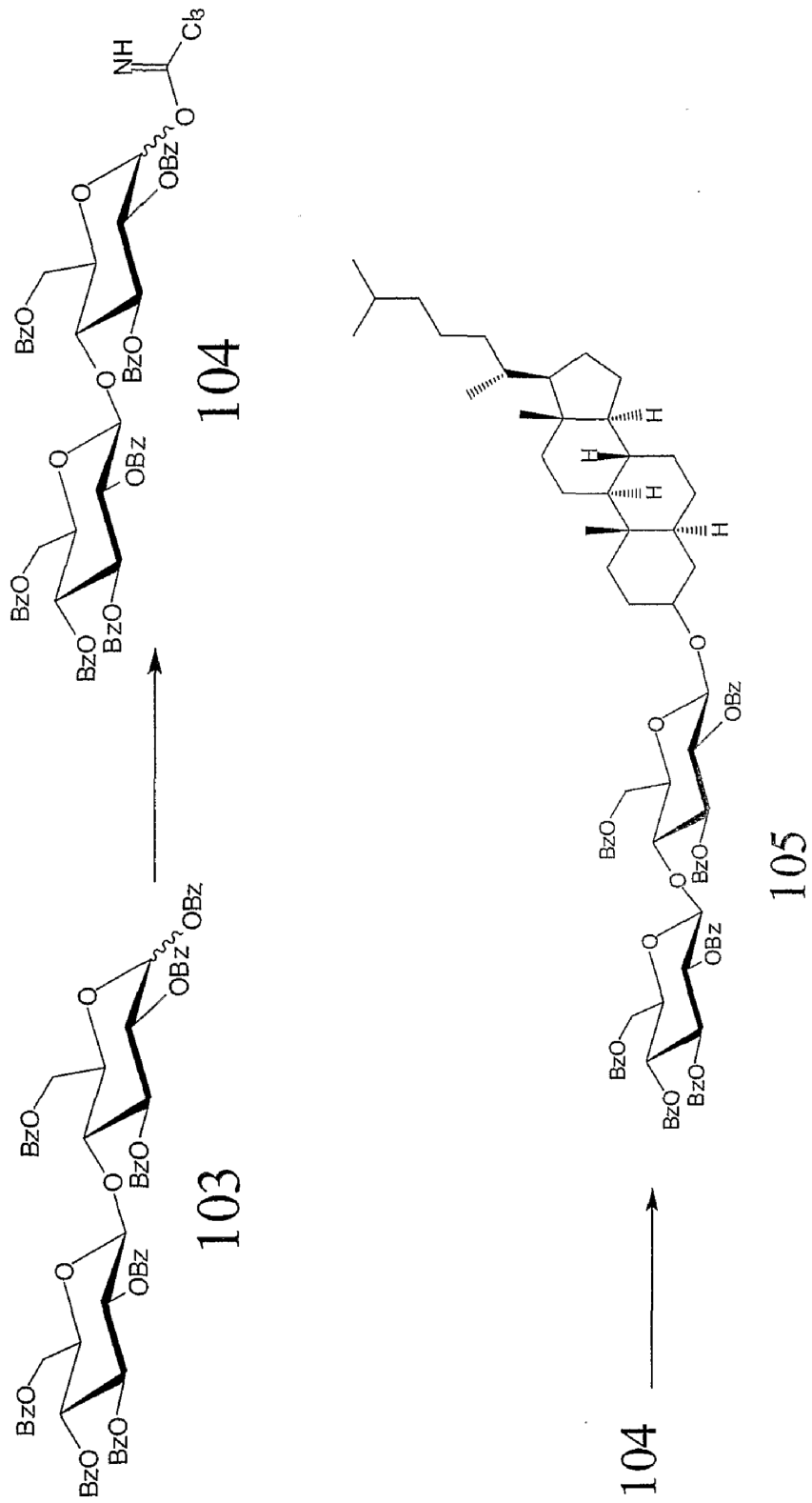


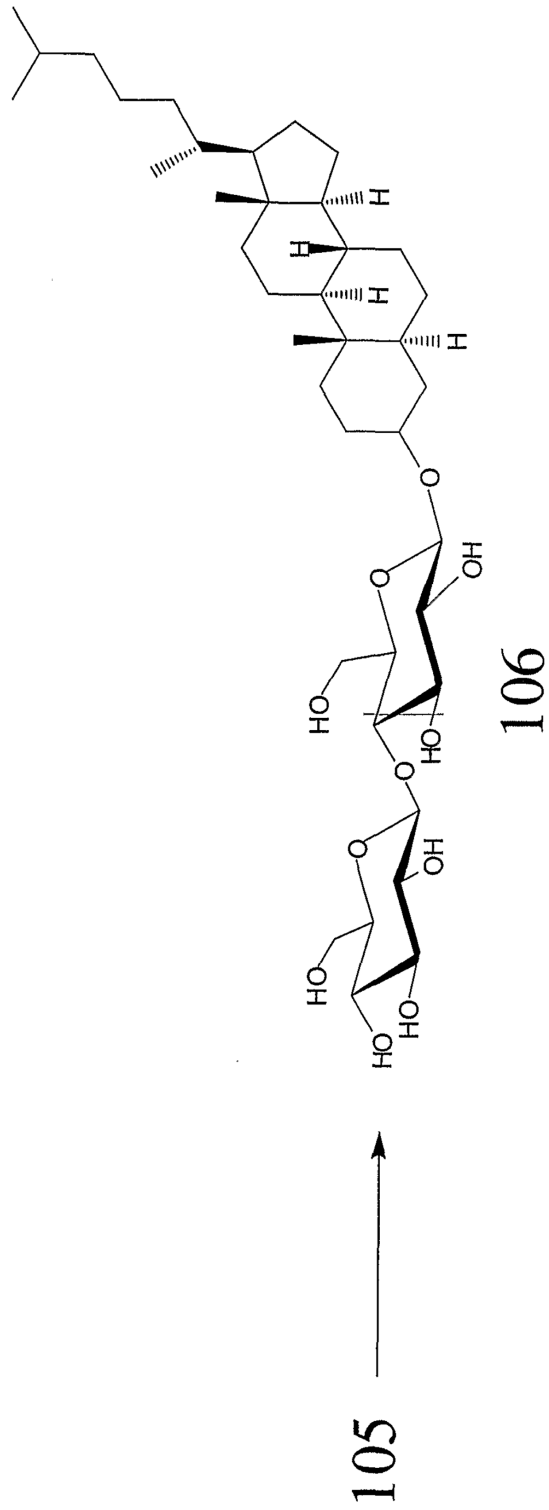
101



100

Figura 32:





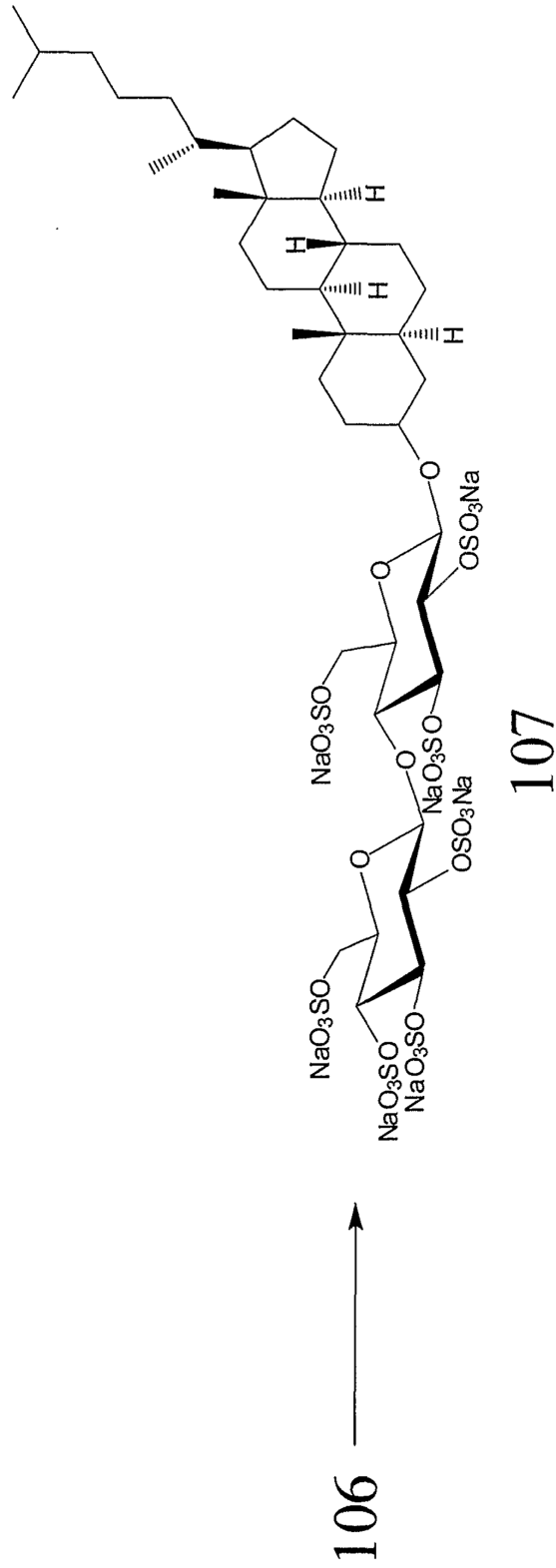
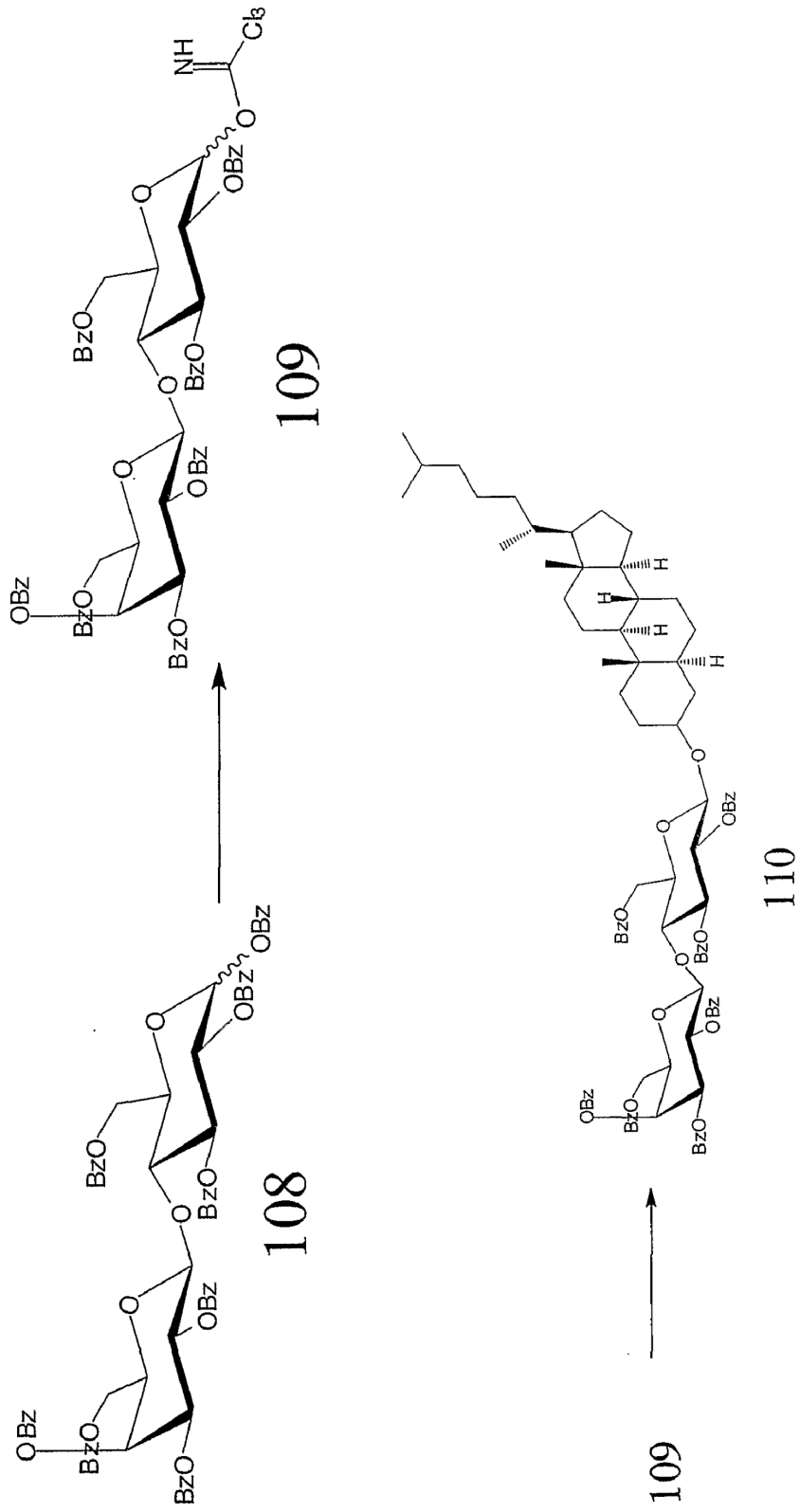
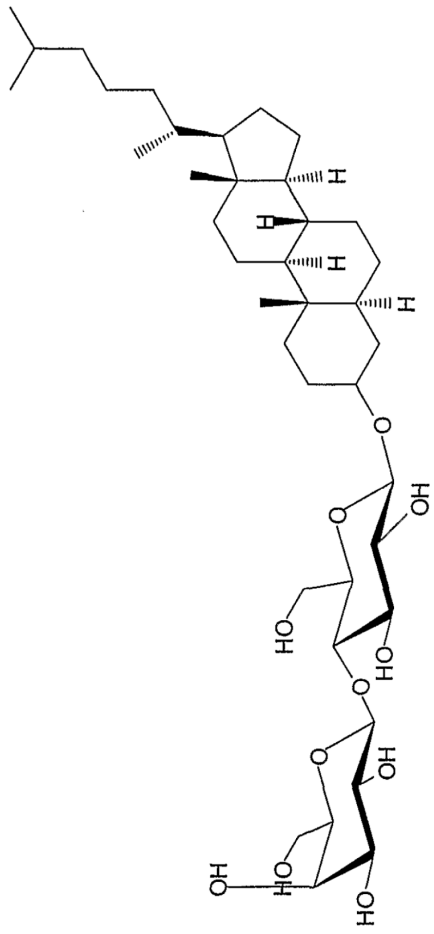


Figura 33:

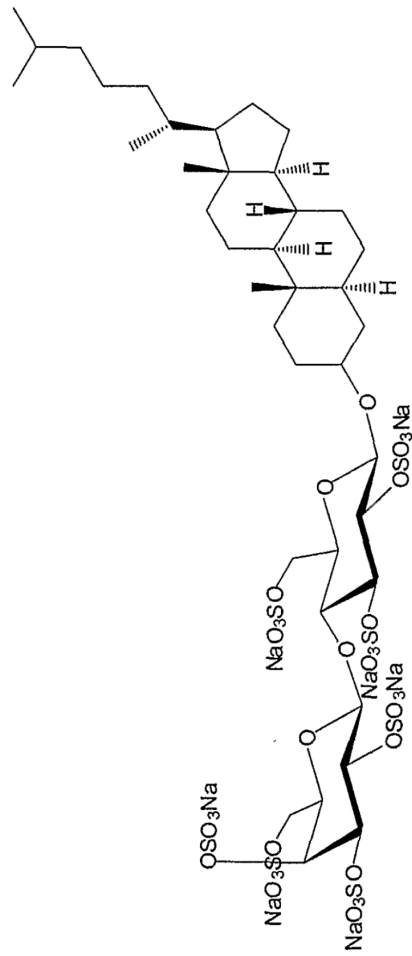




110



111

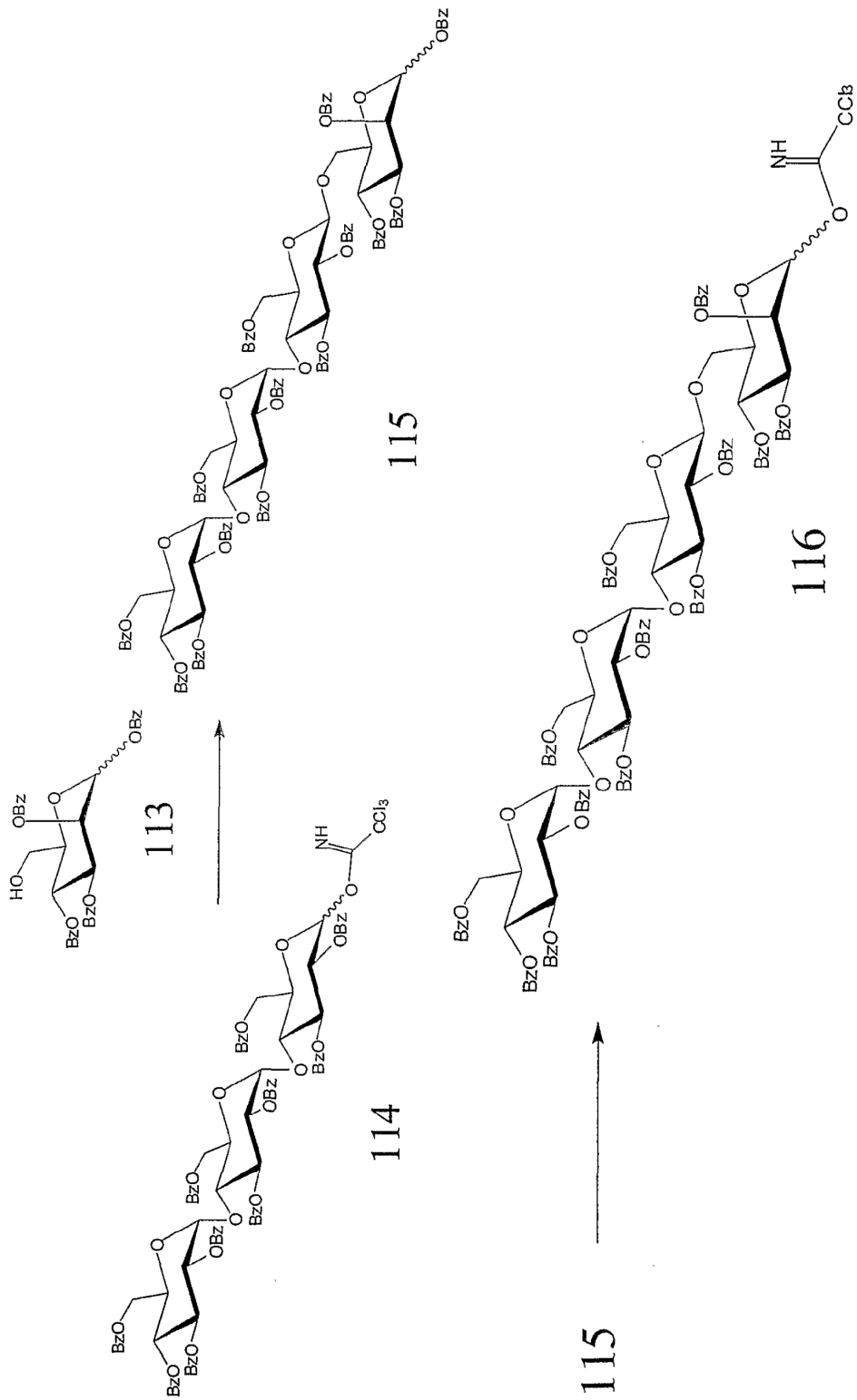


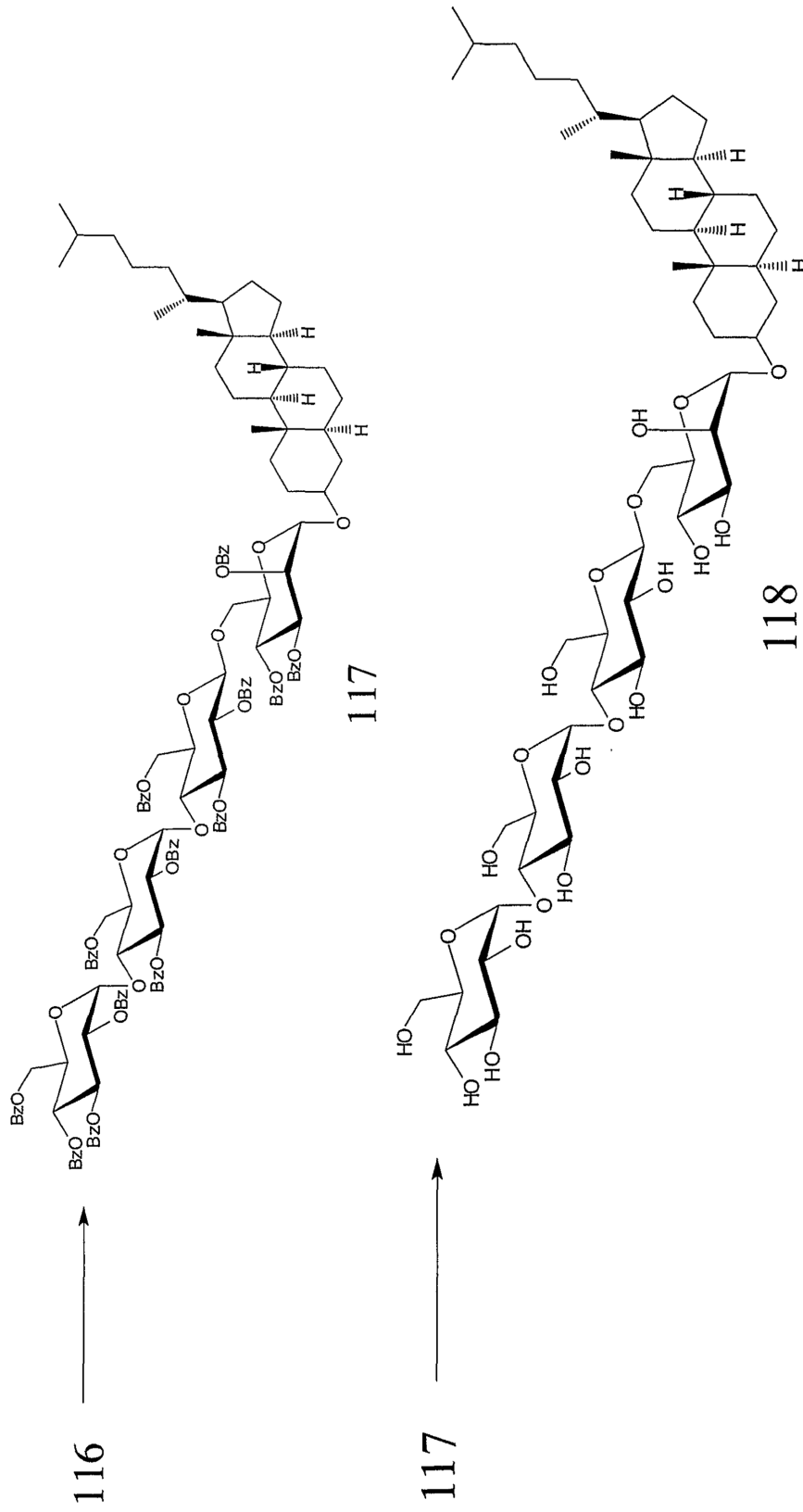
111



112

Figura 34:





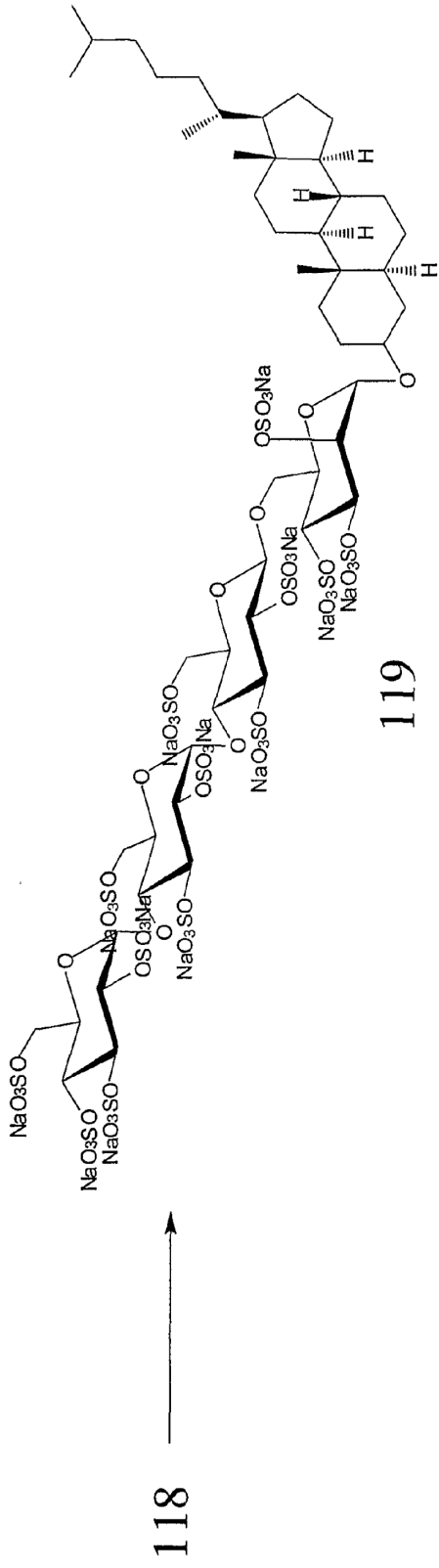
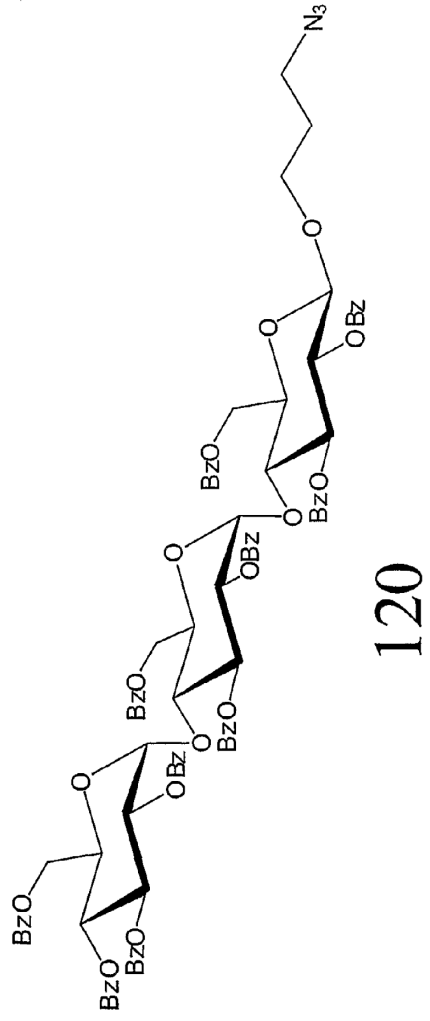
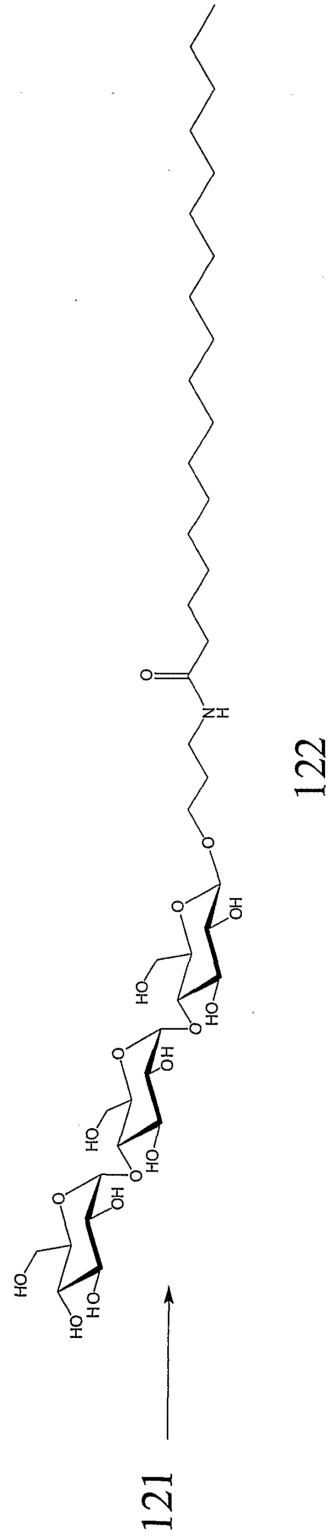
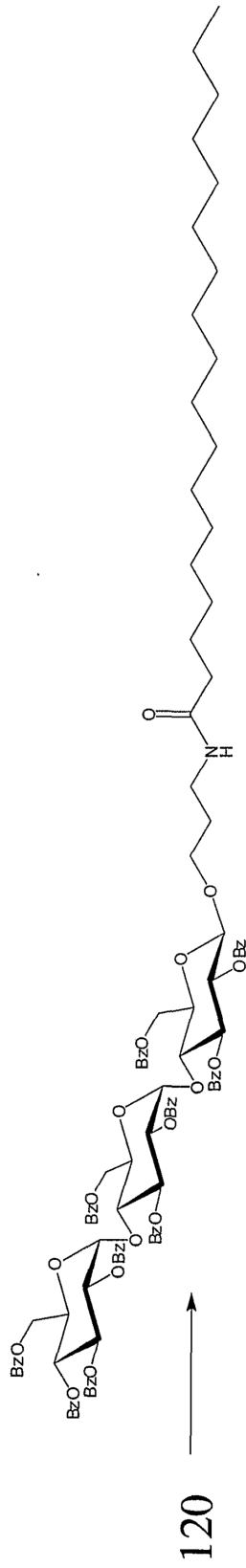
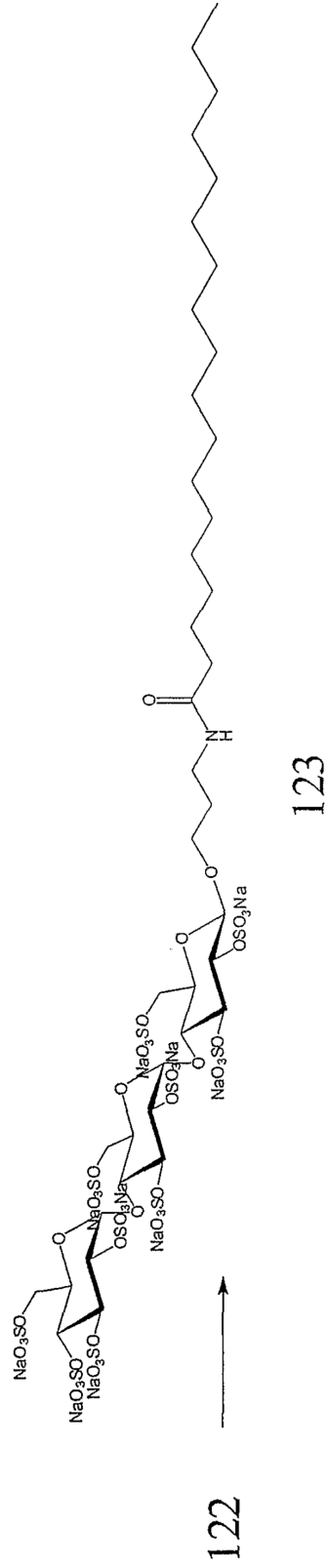


Figura 35:







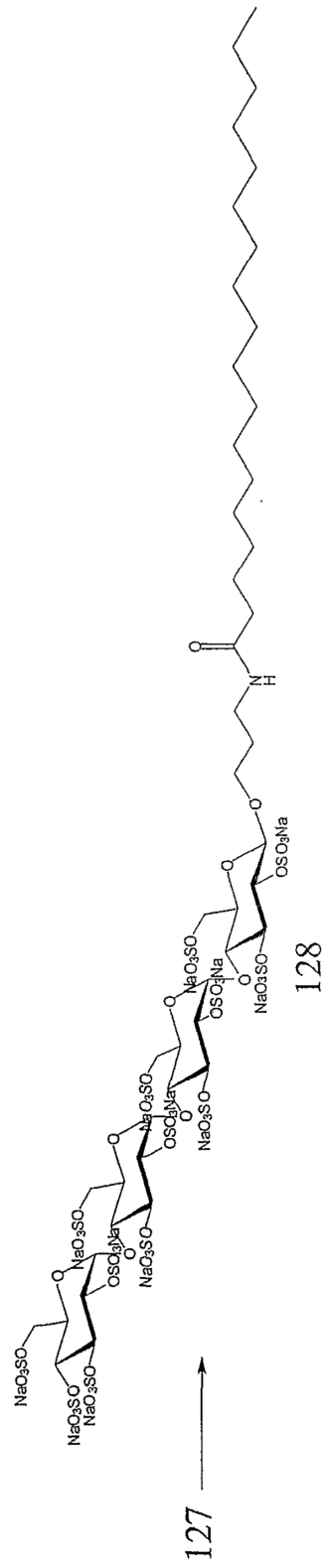
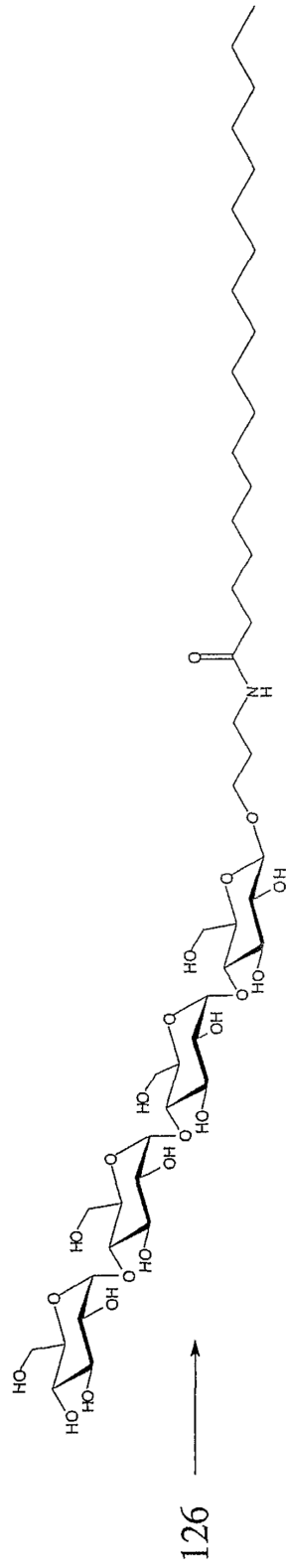
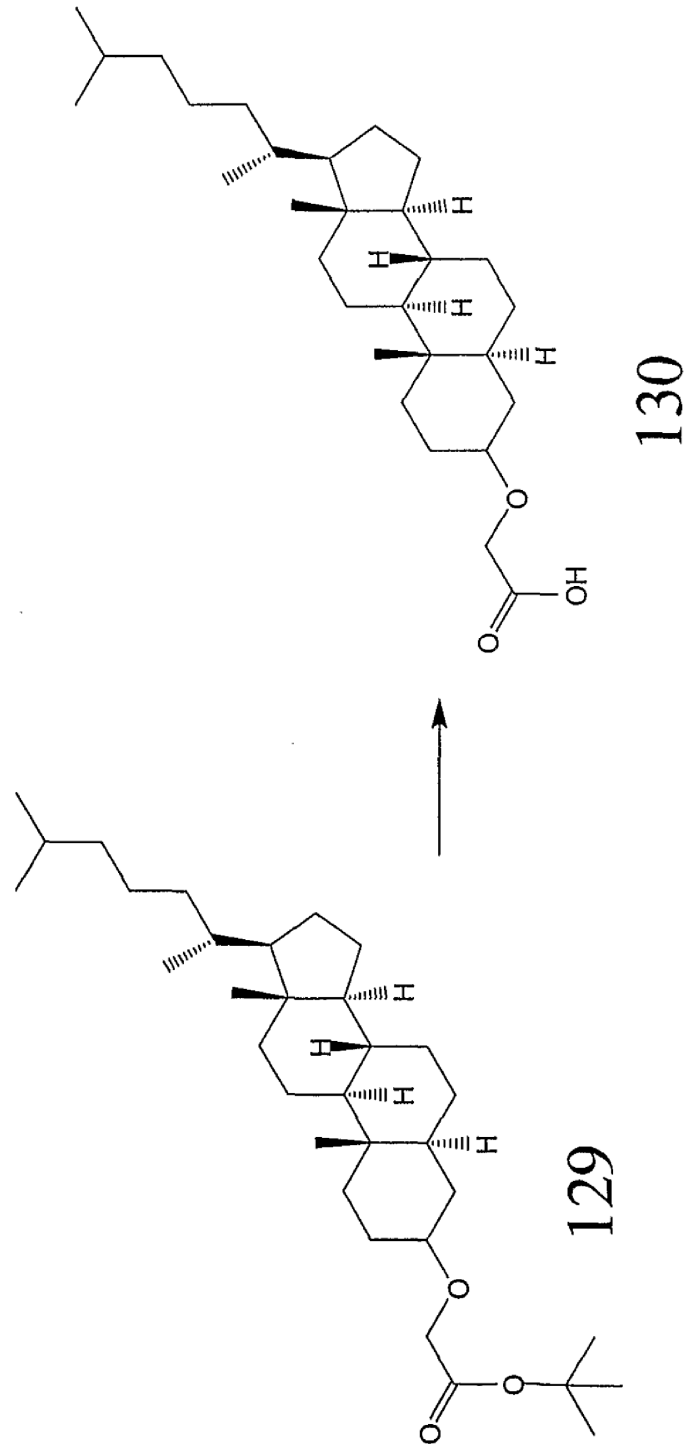
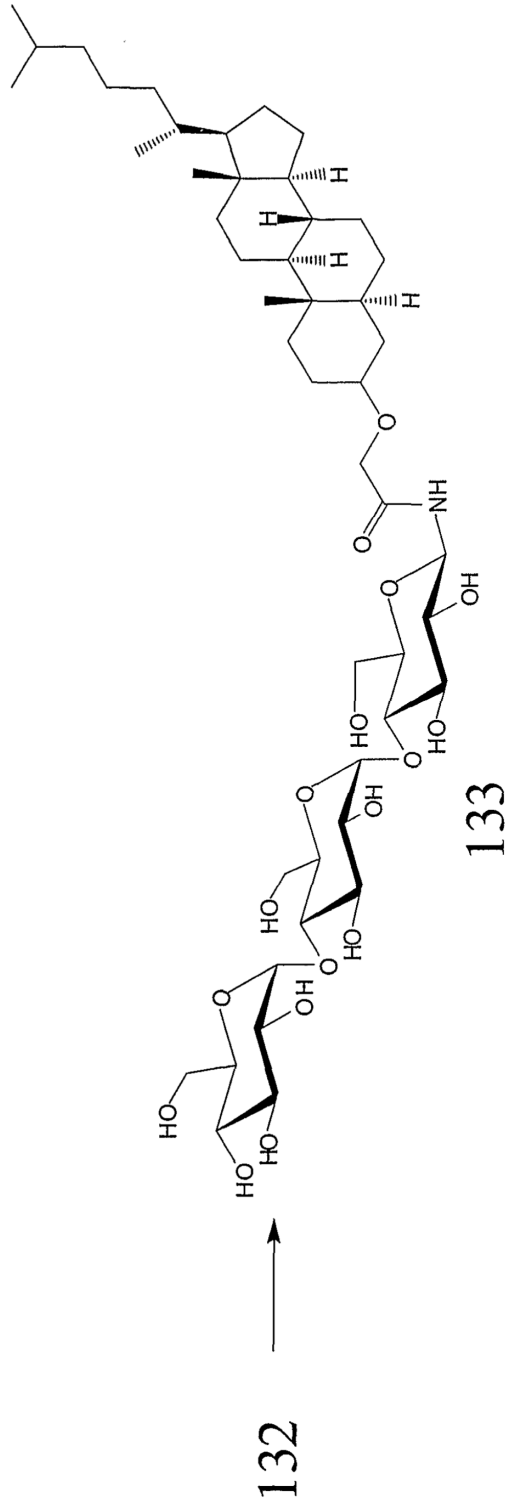
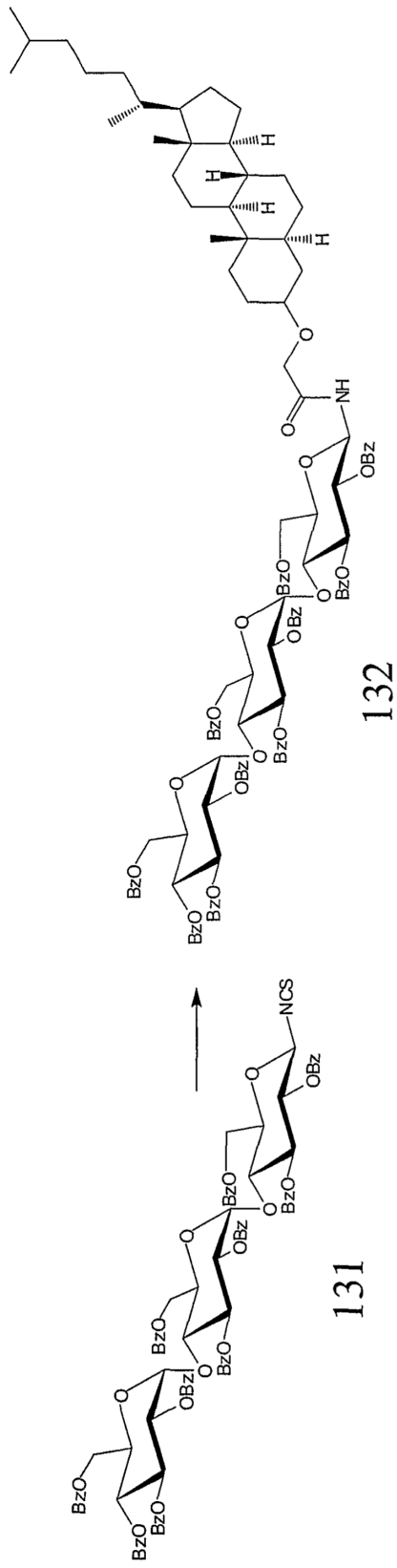
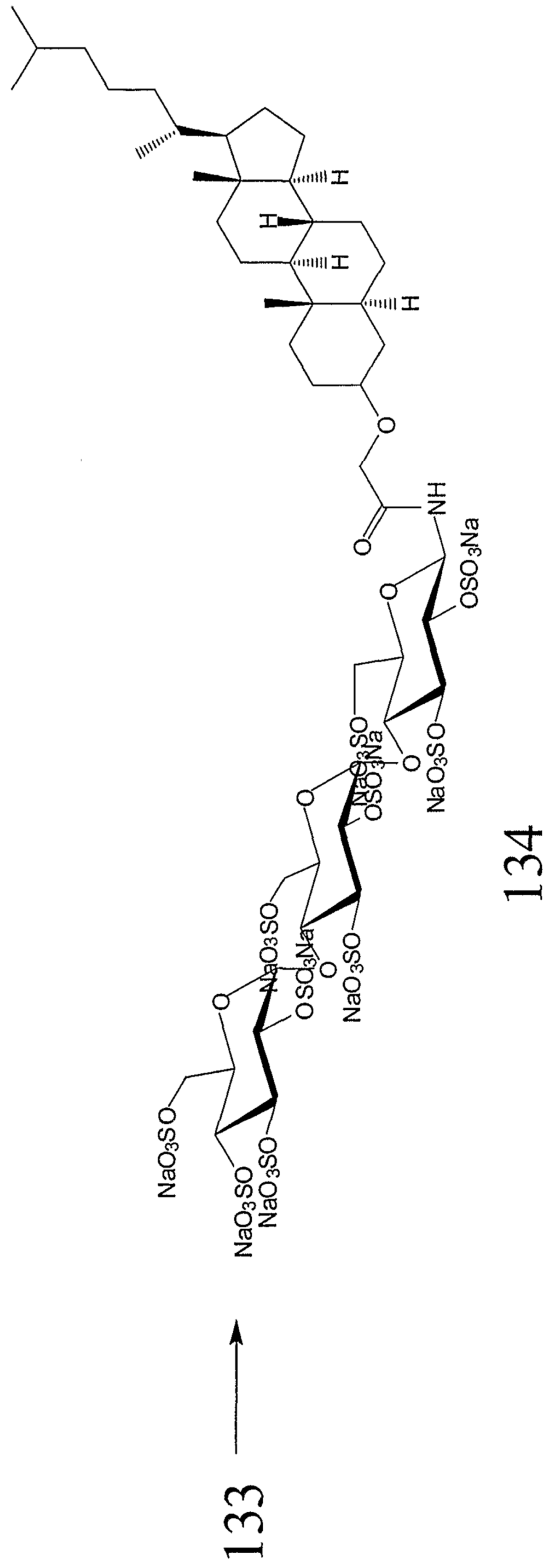
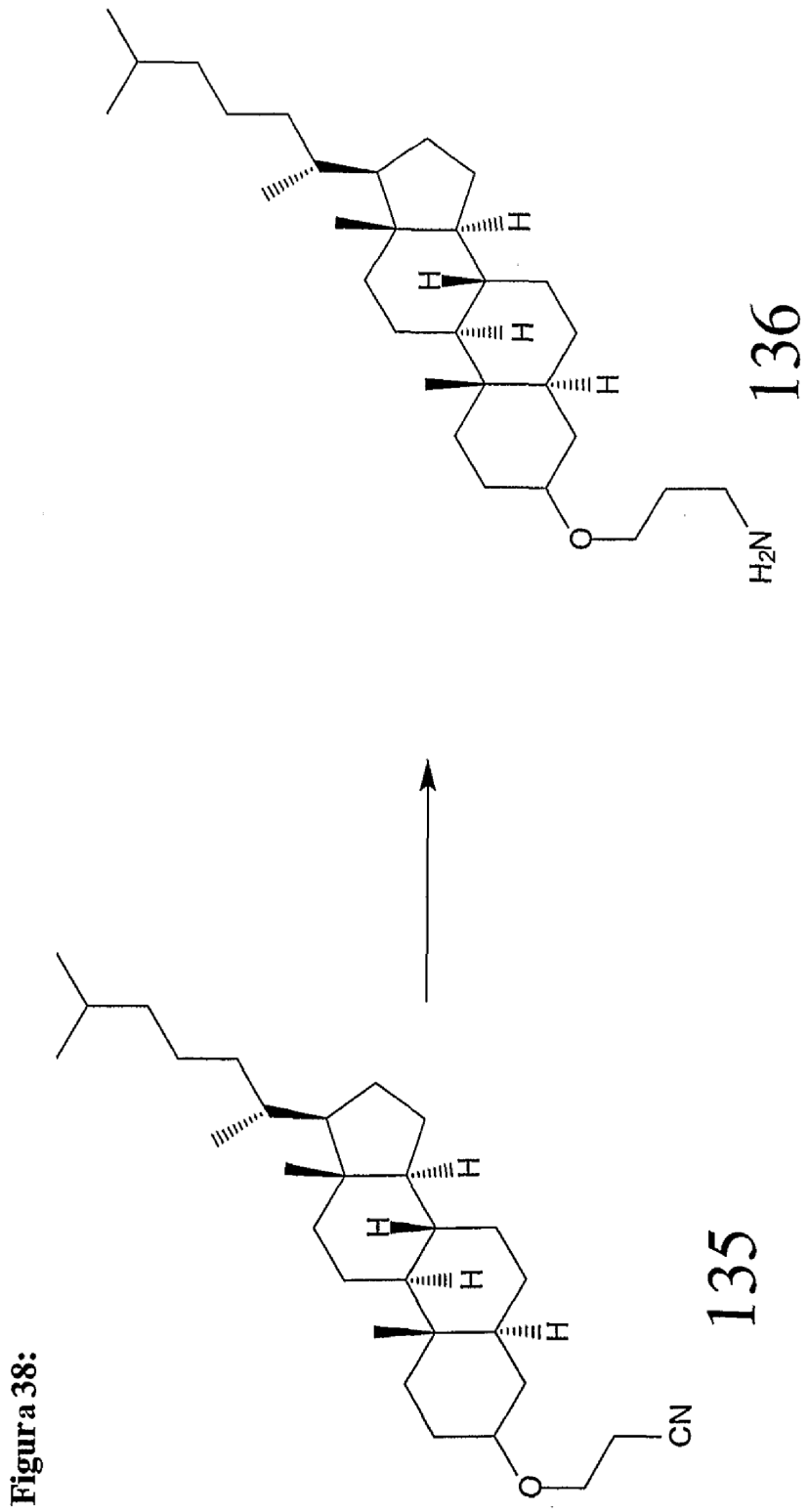


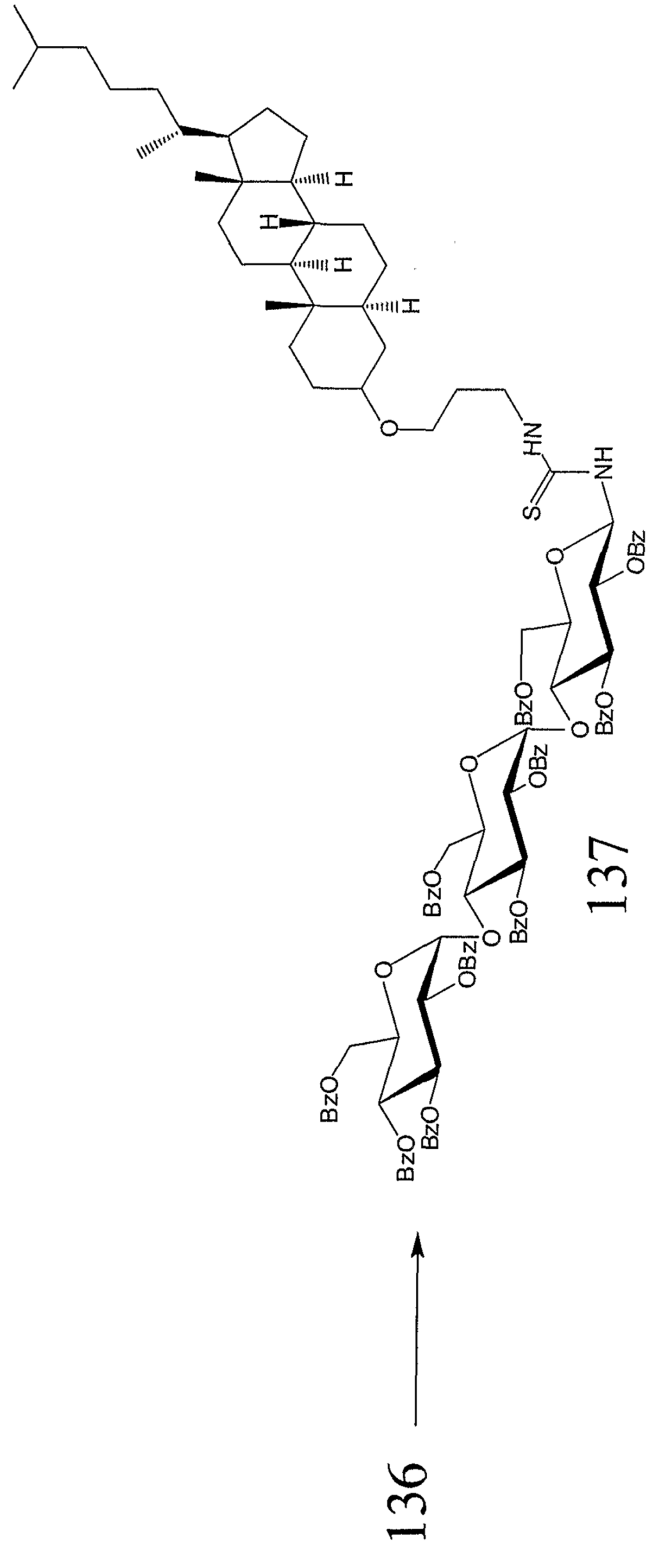
Figura 37:

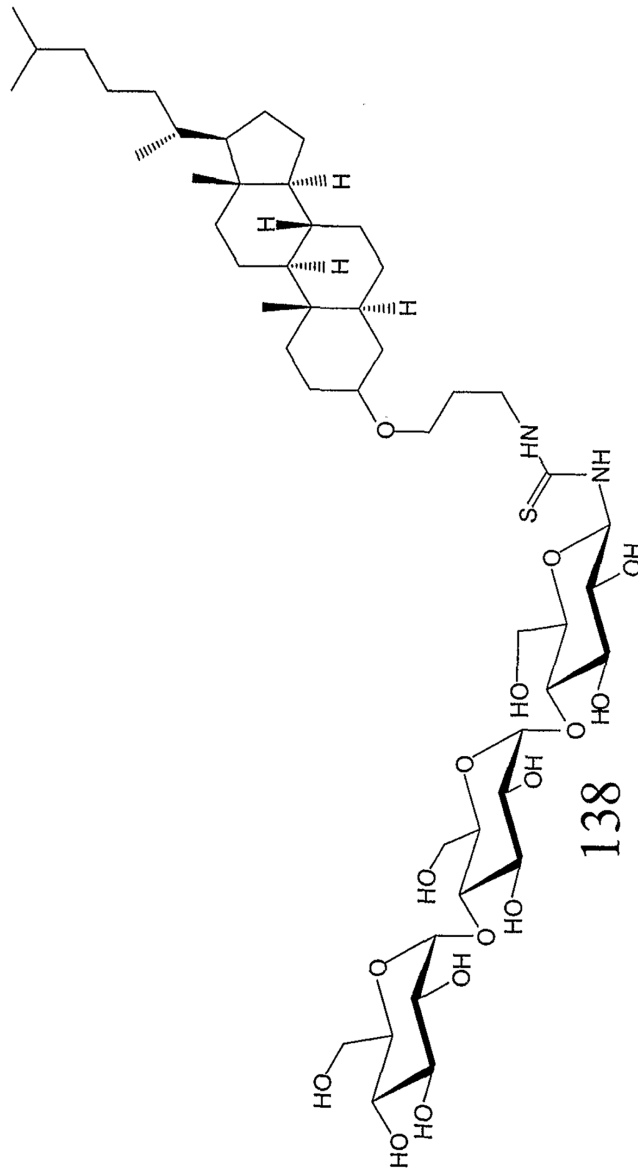












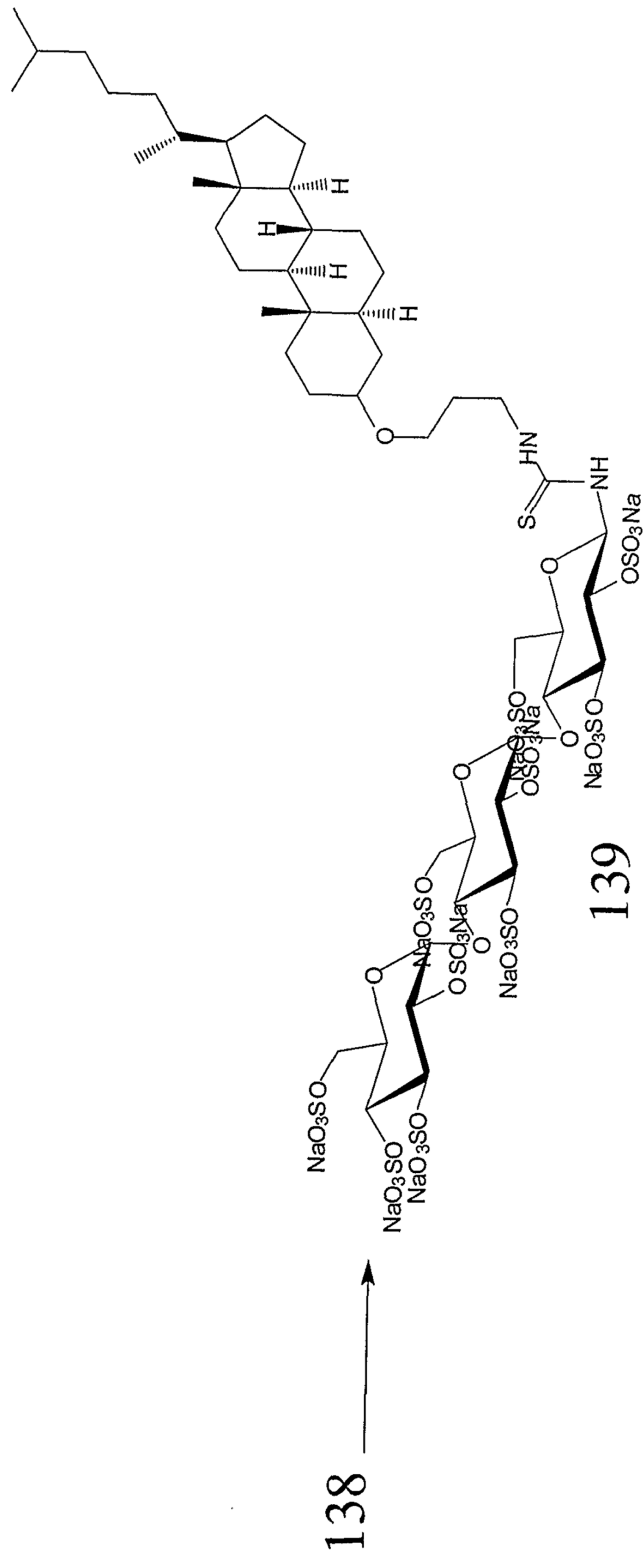
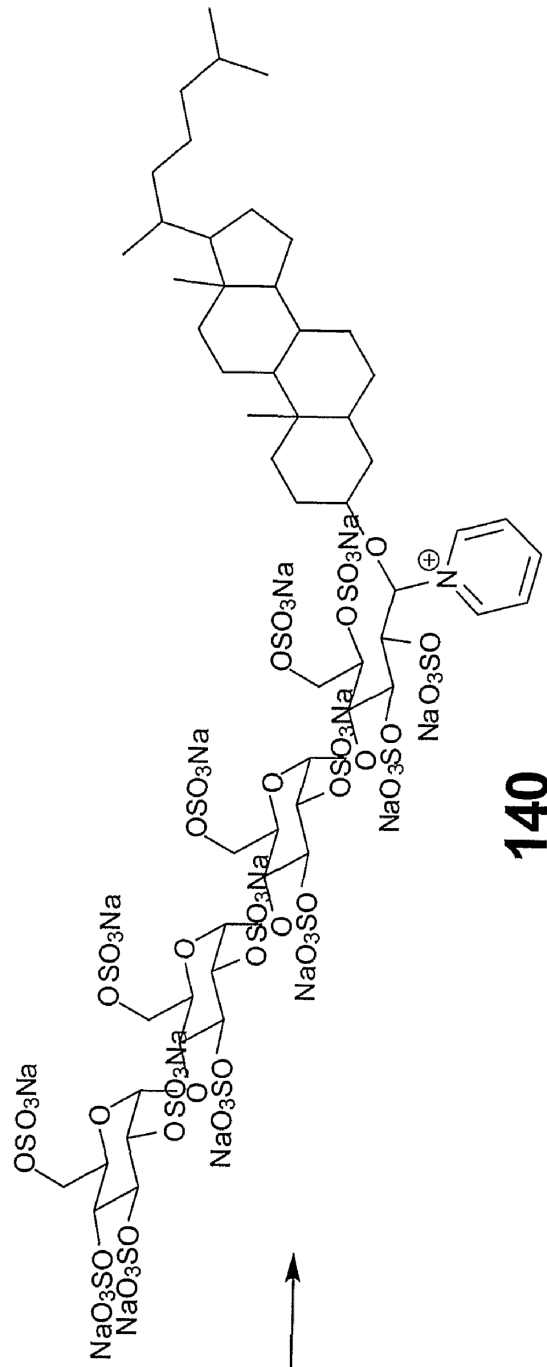
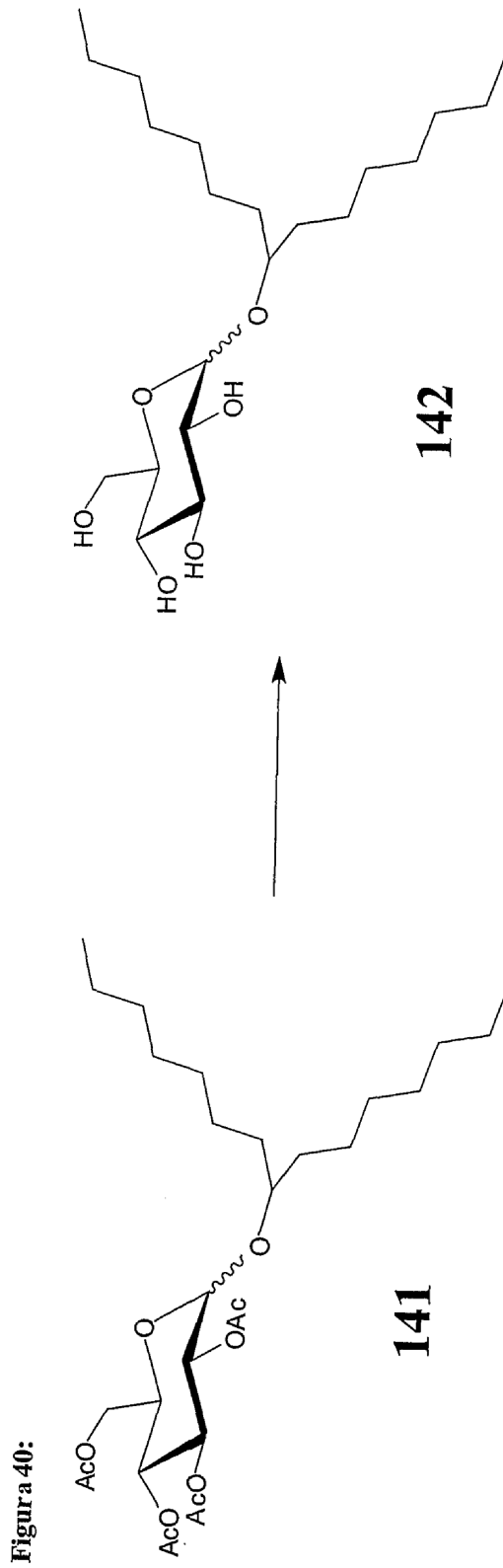


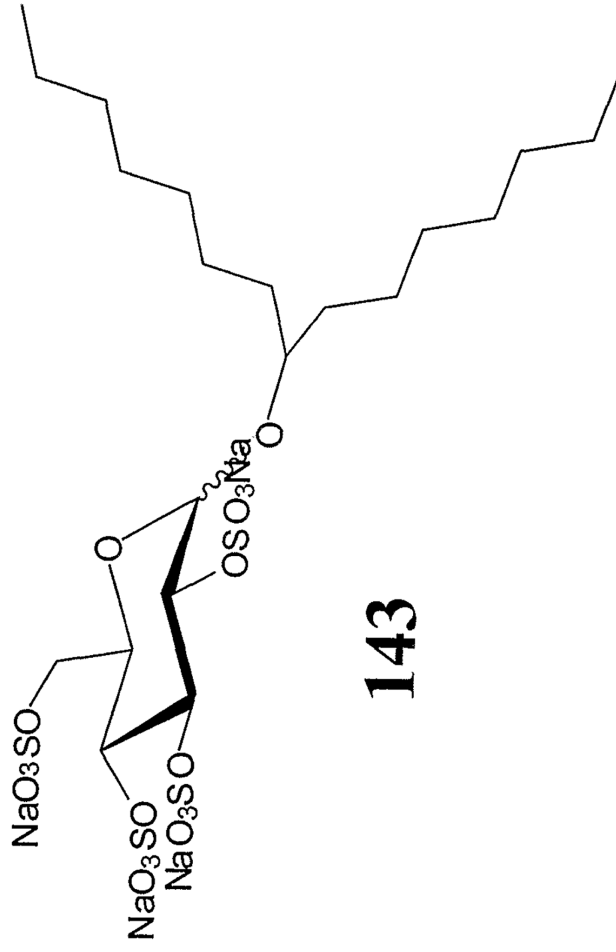
Figura 39:



64

140





142

143