

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 413**

51 Int. Cl.:

C07H 13/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.02.2012** **PCT/US2012/023610**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013** **WO13115817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2012** **E 12706726 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2809678**

54 Título: **Un proceso eficiente y escalable para la fabricación de fondaparinux sódico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.10.2017

73 Titular/es:

**RELIABLE BIOPHARMACEUTICAL
CORPORATION (100.0%)
1945 Walton Road
St. Louis, MO 63114, US**

72 Inventor/es:

**PATEL, PAYAL PARTH;
MA, CHUN;
OHRH, KEVIN K. y
NADJI, SOURENA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 635 413 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

Un proceso eficiente y escalable para la fabricación de fondaparinux sódico

5 **Campo de la invención**

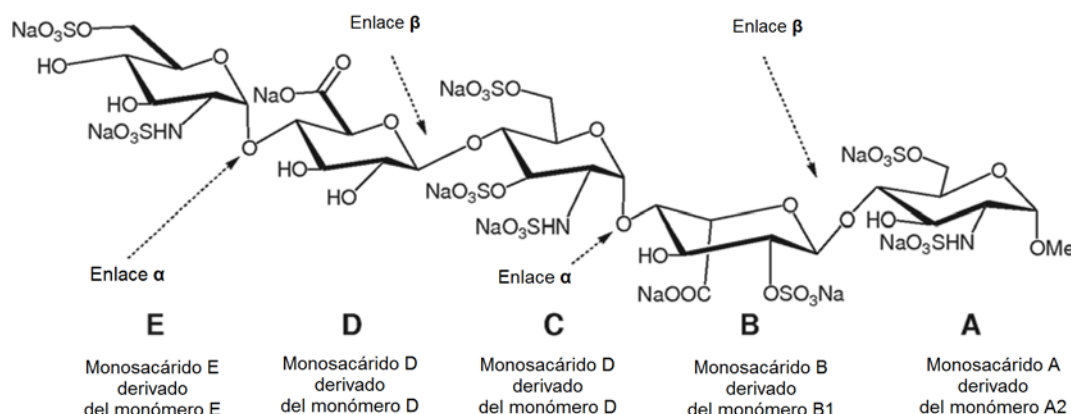
La presente invención se refiere a un proceso para la síntesis del factor Xa anticoagulante fondaparinux y compuestos relacionados. La invención se refiere además a procesos eficientes y escalables para la síntesis de diversos productos intermedios útiles en la síntesis de fondaparinux y compuestos relacionados.

10 **Antecedentes de la invención**

En la patente de EE.UU. N.º 7.468.358, fondaparinux sódico se describe como el "único anticoagulante pensado para estar completamente libre de riesgo de inducción de HIT-2". En *The biochemical and pharmacologic rationale for the development of a synthetic heparin pentasaccharide in Thromb. Res.*, 86(1), 1-36, 1997, Walenga *et al.* citaron el pentasacárido sintético recientemente autorizado el inhibidor del factor Xa fondaparinux sódico. Fondaparinux también se ha descrito en Walenga *et al.*, *Expert Opin. Investig. Drugs*, Vol. 11, 397-407, 2002 y Bauer, *Best Practice & Research Clinical Hematology*, Vol. 17, N.º 1, 89-104, 2004.

Fondaparinux sódico es una molécula de pentasacárido octasulfatado lineal (oligosacárido con cinco unidades de monosacárido) que tiene cinco ésteres de sulfato en el oxígeno (restos O-sulfatados) y tres sulfatos en un nitrógeno (restos N-sulfatados). Además, fondaparinux contiene cinco grupos hidroxilo en la molécula que no están sulfatados y dos carboxilatos de sodio. De los cinco sacáridos, hay tres derivados de glucosamina y un ácido glucurónico y uno L-idurónico. Los cinco sacáridos están conectados entre sí en enlaces glucosilados en α y β alternos, como se muestra a continuación.

Fondaparinux sódico

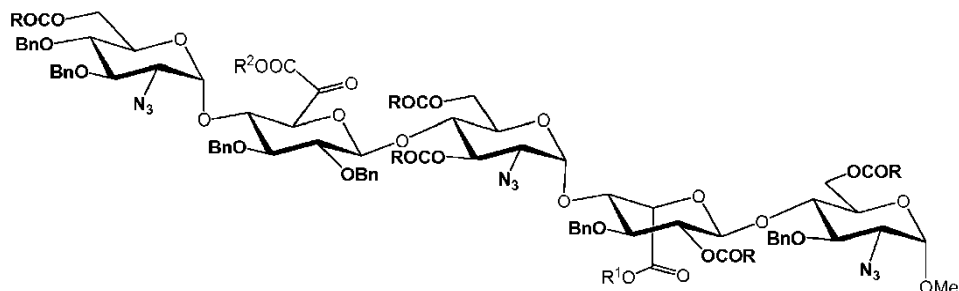


Fondaparinux sódico es un derivado de metilglucósido químicamente sintetizado de la secuencia de pentasacárido natural, que es el sitio activo de heparina que media en la interacción con antitrombina (Casu *et al.*, *J. Biochem.*, 197, 59, 1981). Tiene un patrón exigente de O- y N-sulfatos, estereoquímica glucosídica específica y unidades de repetición de glucosaminas y ácidos urónicos (Petitou *et al.*, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Product*, 60, 144-209, 1992).

Las unidades de monosacárido que comprenden la molécula de fondaparinux se marcan según la estructura mostrada anteriormente, con la unidad de glucosamina a la derecha denominada monosacárido A y la siguiente, una unidad de ácido urónico a su izquierda, B y unidades posteriores, C, D y E, respectivamente. La síntesis química de fondaparinux empieza con monosacáridos de estructuras definidas que ellas mismos se denominan elemento estructural A, elemento estructural B, elemento estructural de DC y monómero E, para la diferenciación y comodidad, y llegar a ser los monosacáridos correspondientes en fondaparinux sódico.

Debido a esta mezcla compleja de grupos hidroxilo libres y sulfatados, y la presencia de restos N-sulfatados, el diseño de una vía de síntesis para fondaparinux requiere una cuidadosa estrategia de protección y desprotección de grupos funcionales reactivos durante la síntesis de la molécula. Síntesis previamente descritas de fondaparinux adoptaron todas una estrategia similar para completar la síntesis de esta molécula. Puede concebirse que esta estrategia tenga cuatro etapas. La estrategia en la primera etapa requiere la desprotección selectiva de cinco de los diez grupos hidroxilo. Durante la segunda etapa, estos cinco hidroxilos se sulfonan selectivamente. La tercera etapa del proceso implica la desprotección de los cinco grupos hidroxilo restantes. La cuarta etapa del proceso es la

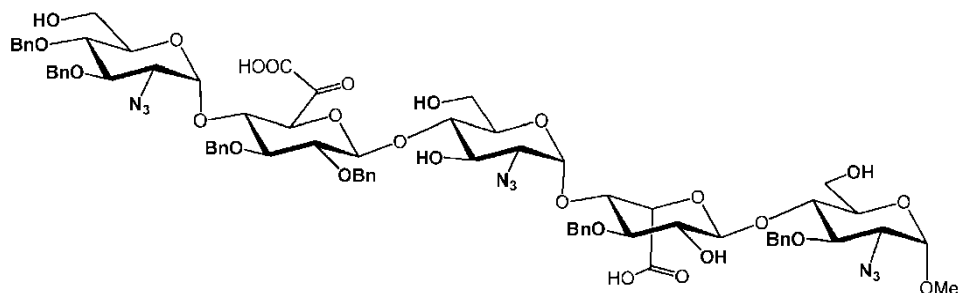
sulfonación selectiva de los 3 grupos amino, en presencia de cinco grupos hidroxilo que no están sulfatados, en la molécula final. Esta estrategia puede ser concebida a partir del siguiente pentasacárido completamente protegido, también denominado el producto intermedio de etapa tardía.



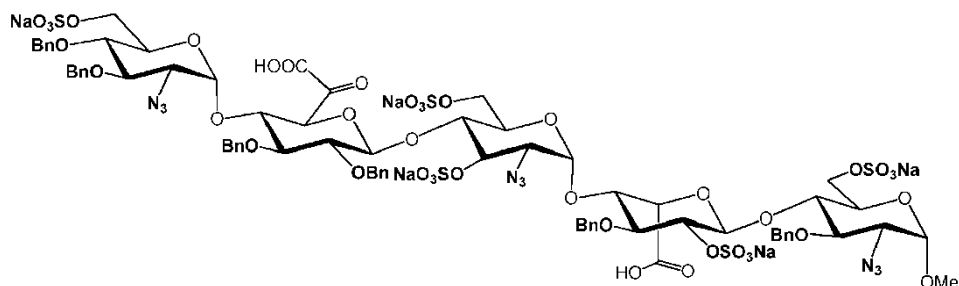
En esta estrategia, todos los grupos hidroxilo que van a ser sulfatados se protegen con un grupo protector de acilo, por ejemplo, como acetatos ($R = \text{CH}_3$) o benzoatos ($R = \text{arilo}$) (etapas 1 y 2). Todos los grupos hidroxilo que van a quedar como tales se protegen con grupo bencilo como bencil éteres (etapa 3). El grupo amino, que posteriormente se sulfona, se enmascara como un resto de azida (N_3) (etapa 4). R^1 y R^2 normalmente son sodio en el compuesto farmacéutico activo (por ejemplo, fondaparinux sódico).

Esta estrategia permite preparar el producto final siguiendo las operaciones sintéticas que se explican resumidamente a continuación:

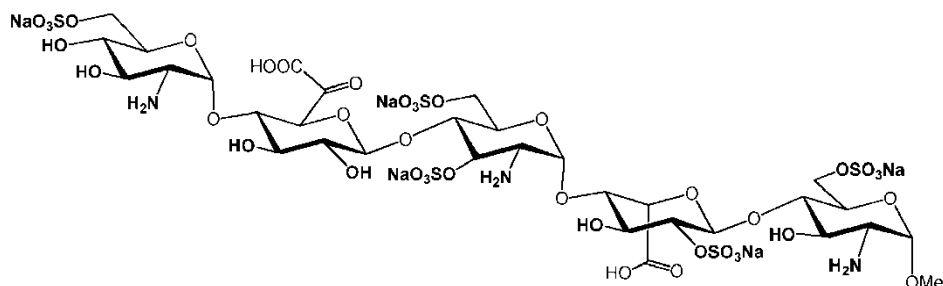
a) Tratamiento del producto intermedio de etapa tardía con base para hidrolizar (desproteger) los grupos éster de acilo para revelar los cinco grupos hidroxilo. Los dos grupos éster R^1 y R^2 se hidrolizan en esta etapa también.



b) Sulfonación de los grupos hidroxilo recientemente revelados.



c) Hidrogenación del pentasacárido O-sulfatado para desbencilar los cinco hidroxilos protegidos con bencilo, y al mismo tiempo, desenmascarar las tres azidas para los grupos amino correspondientes.



d) En la última etapa de la operación, los grupos amino se sulfatan selectivamente a un pH alto, en presencia de los cinco hidroxilos libres para dar fondaparinux.

Se han desarrollado varios enfoques sintéticos con el fin de preparar pentasacáridos completamente protegidos (EDCBA) que puedan usarse en la síntesis de fondaparinux sódico (véase, por ejemplo, el documento WO2011/014793 A1).

La síntesis del fragmento EDCBA, sin embargo, se complica por la presencia de diferentes grupos funcionales en posiciones variables en el pentasacárido que requieren una estrategia de protección - desprotección elaborada. Véase, por ejemplo, L. Poletti et al., Eur. J. Org. Chem., 2999-3024, 2003; W. Hague et al., Capítulo 17, "Modern Method in Carbohydrate Synthesis", Eds. Shaheer Khan and R. A. O'Neill; Harwood Academic Publisher GmbH, 403-436, 1996; M. Petitou et al., Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 60, 143-209, 1992, Springer-Verlag, New York, 1992).

Los actuales métodos para la síntesis de pentasacáridos completamente protegidos (EDCBA) normalmente requieren aproximadamente 60 etapas y producen, por tanto, bajo rendimiento de producto. Así, el aumento de escala del proceso es un problema importante, ya que esto afecta directamente el coste y tiempo requerido para completar la fabricación de fondaparinux sódico.

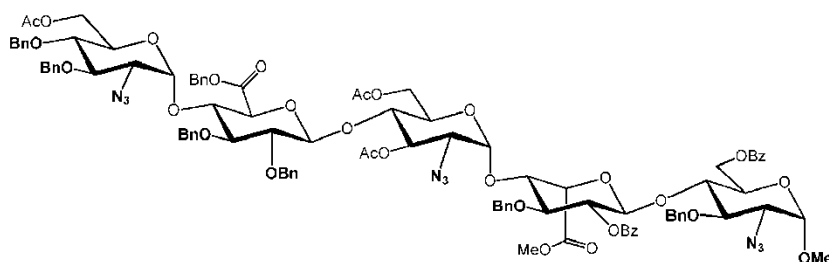
Por tanto, como se apreciará, hay una necesidad en la materia de nuevos procedimientos de síntesis que produzcan fondaparinux sódico y productos intermedios útiles en la síntesis de los mismos. Los procesos de la presente invención proporcionan una síntesis única, fiable y escalable de compuestos tales como fondaparinux sódico.

Sumario de la invención

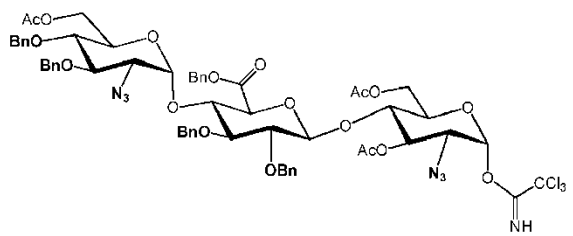
La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier divulgación que vaya más allá del alcance de dichas reivindicaciones está solo prevista para fines ilustrativos.

Los solicitantes han desarrollado estrategias sintéticas novedosas para la síntesis de fondaparinux sódico y productos intermedios útiles en la preparación de fondaparinux sódico. Los procesos descritos en el presente documento permiten el eficiente aumento de escala, requieren menos etapas sintéticas y siguen adelante con rendimientos más altos de producto. Los procesos descritos en el presente documento también proporcionan un mejor perfil de pureza debido a la contaminación reducida de β -metilglucósido en el producto final.

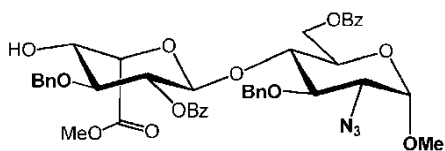
Una realización de la presente invención es un proceso para la preparación de un precursor de pentasacárido heparínico protegido para fondaparinux sódico que tiene la estructura



que comprende la etapa de acoplar un trímero EDC que tiene la estructura

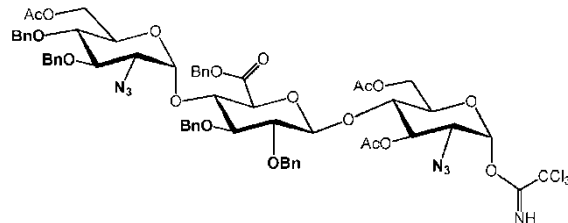


con un dímero BA que tiene la estructura



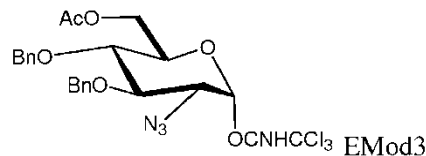
En otra realización, la presente invención se refiere a un proceso que comprende además convertir el precursor de pentasacárido heparínico protegido en fondaparinux sódico.

Otra realización de la presente invención es un proceso de preparación del trímero EDC que tiene la fórmula

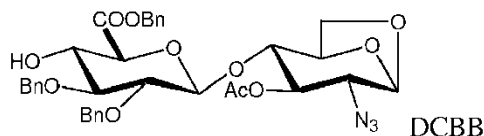


en la que el trímero EDC se prepara usando un proceso (glucosilación de Schmidt) que comprende las etapas:

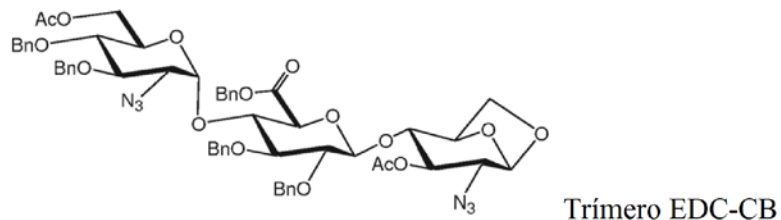
(a) Acoplar un monómero E que tiene la estructura



con un elemento estructural de DC que tiene la estructura



para obtener un precursor de EDC que tiene la estructura

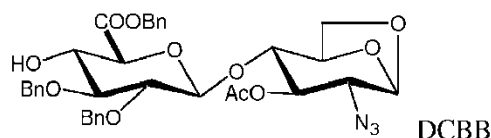


y

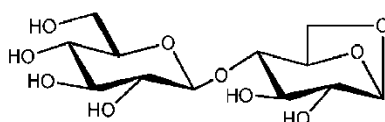
(b) convertir el precursor de EDC en el trímero EDC.

En otra realización, la presente invención se refiere a un proceso que comprende además convertir el trímero EDC en fondaparinux sódico.

Aún otra realización de la presente invención es un proceso de preparación del elemento estructural de DC que tiene la fórmula

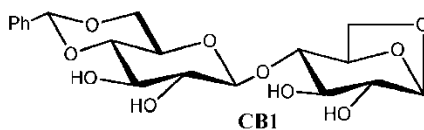


donde el elemento estructural de DC se prepara a partir de 1,6-anhidrocelobiosa que tiene la estructura

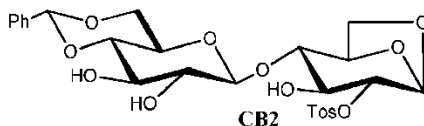


que comprende al menos cuatro de las siguientes etapas:

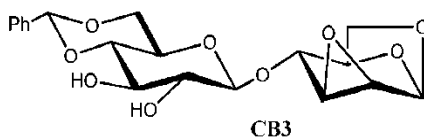
- (a) proteger la 1,6-anhidrocelobiosa para formar CB1 que tiene la estructura



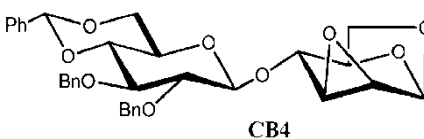
- (b) tosilar CB1 para formar CB2 que tiene la estructura



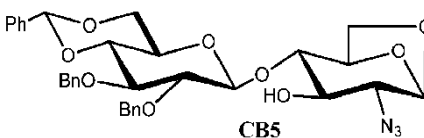
- (c) hacer reaccionar CB2 con base para formar CB3 que tiene la estructura



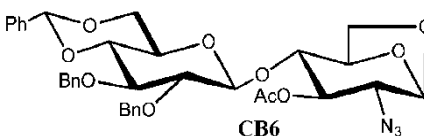
- (d) proteger CB3 para formar CB4 que tiene la estructura



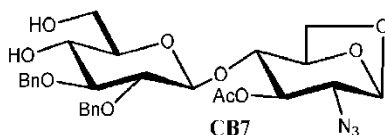
- (e) hacer reaccionar CB4 con azida para formar CB5 que tiene la estructura



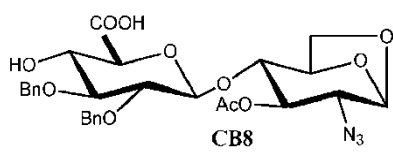
- (f) acetilar CB5 para formar CB6 que tiene la estructura



- (g) desproteger CB6 para formar CB7 que tiene la estructura



- (h) oxidar CB7 para formar CB8 que tiene la estructura



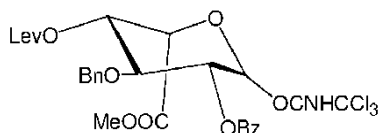
y

- (i) bencilar CB8 para formar el dímero DC.

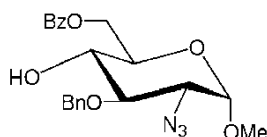
En ciertas realizaciones, el proceso incluye al menos seis etapas de las etapas (a)-(i).

En realizaciones adicionales, el proceso incluye todas las etapas (a)-(i).

- 5 Otra realización de la presente invención es un proceso en el que el dímero BA se prepara usando una glucosilación de Schmidt que comprende la etapa de acoplar un monómero B que tiene la estructura

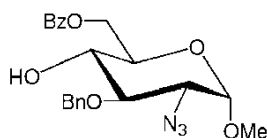


- 10 donde Lev es levulinilo, Bn es bencilo, Bz es benzoilo y TCA es tricloroacetimidato, a un monómero A que tiene la estructura



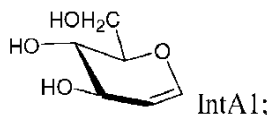
- 15 para formar el dímero BA.

Otra realización de la presente invención es un proceso de preparación de AMod5 [también denominado en el presente documento el elemento estructural A] que tiene la fórmula:



20

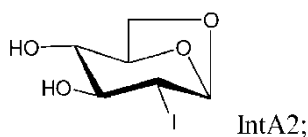
en el que el monómero A se prepara a partir de un compuesto de fórmula IntA1



25

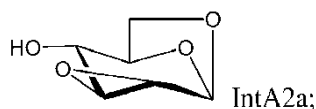
comprendiendo el proceso una o más de las siguientes etapas:

- (a) ciclar (1,6-yodociclado oxidativo) un compuesto de fórmula IntA1 para formar un compuesto de fórmula IntA2:



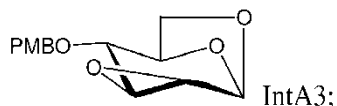
30

- (b) epoxidar un compuesto de fórmula IntA2 para formar un epóxido de Cerny en un compuesto de fórmula IntA2a:



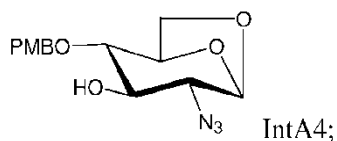
35

- (c) convertir (p-metoxibencilar) un compuesto de fórmula IntA2a en un compuesto de fórmula IntA3:



40

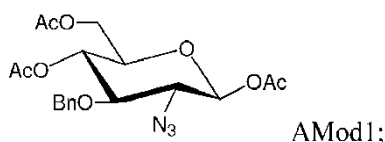
- (d) convertir (apertura de anillo asistida por azida del epóxido de Cerny) un compuesto de fórmula IntA3 en un compuesto de fórmula IntA4



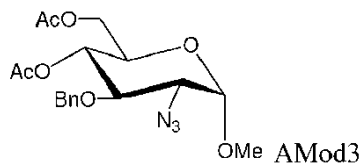
(e) convertir (bencilar) un compuesto de fórmula IntA4 en un compuesto de monómero de fórmula A2 [también denominado IntA5]



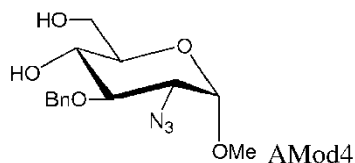
(f) convertir (por ejemplo, desproteger PMB, apertura del anillo de anhídrido y acetilar) un compuesto de monómero de fórmula A2 [también denominado IntA5] en un compuesto de fórmula AMod1:



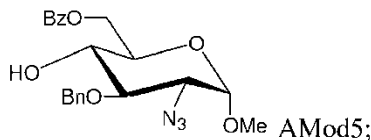
(g) convertir (α-metilglucosilar) un compuesto de fórmula AMod1 en un compuesto de fórmula AMod3:



(h) convertir (desacetilar) un compuesto de fórmula AMod3 en un compuesto de fórmula AMod4:



(i) convertir (benzoilar) un compuesto de fórmula AMod4 en AMod5 [también denominado elemento estructural A]



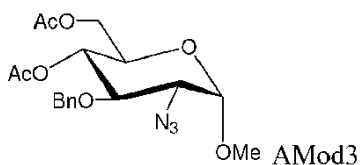
y

(j) recristalizar AMod5.

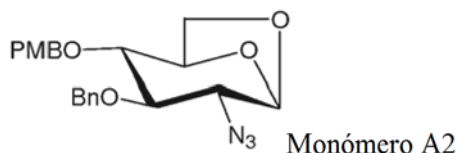
Una realización de la presente invención es un proceso en el que el AMod5 [también denominado elemento estructural A] que se forma está sustancialmente libre de β-metilglucósido.

Realizaciones adicionales de la presente invención incluyen un proceso donde el pentasacárido heparínico protegido que se forma contiene menos de aproximadamente el 1 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,11 %, menos de aproximadamente el 0,05 % o menos de aproximadamente el 0,01 % de β-metilglucósido.

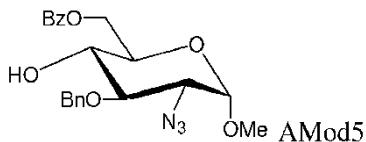
Otra realización de la presente invención es un proceso de preparación de un monosacárido de fórmula AMod3



que comprende desproteger PMB, apertura del anillo de anhidro, acetilar y α -metilglucosilar un compuesto de monómero de fórmula A2 (también denominado IntA5)



Otra realización de la presente invención es un proceso de purificación de un monosacárido de fórmula Amod5:



que comprende recristalizar el monosacárido en un disolvente orgánico.

Breve descripción de los dibujos

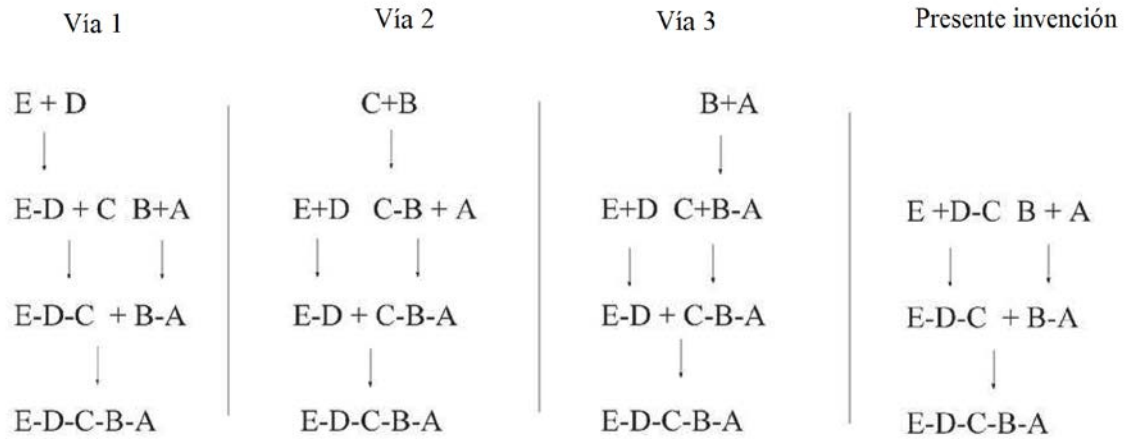
Las Figuras 1A y 1B son cromatogramas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fondaparinux sódico.

Descripción detallada de la invención

Los solicitantes han desarrollado novedosas estrategias sintéticas para la síntesis de fondaparinux sódico y productos intermedios útiles en la preparación de fondaparinux sódico. Los procesos descritos en el presente documento permiten el eficiente aumento de escala, requieren menos etapas sintéticas y siguen adelante con rendimientos más altos de producto que los procesos actuales. Los procesos descritos en el presente documento también proporcionan un perfil de pureza más alto debido a contaminación de β -metilglucósido reducida en el producto final.

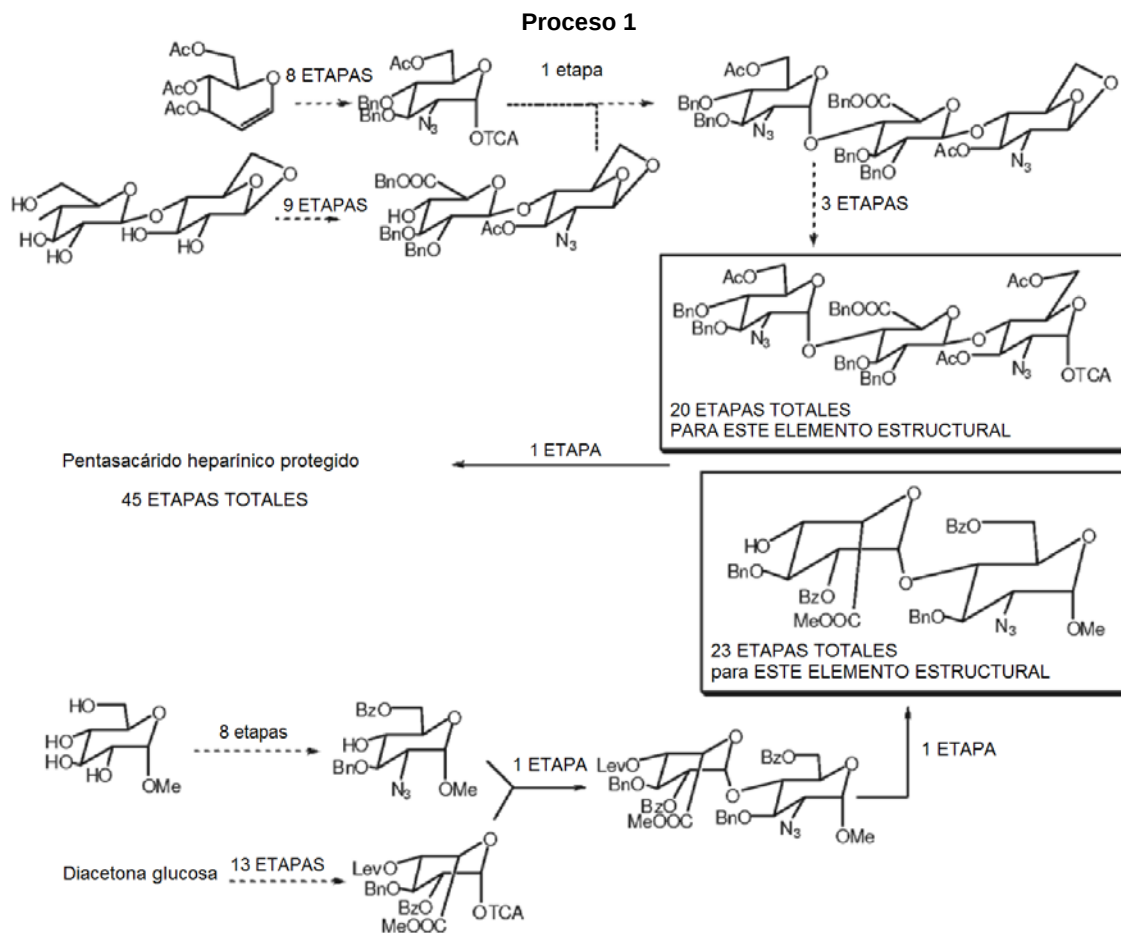
Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de fondaparinux sódico en una manera novedosa y eficiente para proporcionar el compuesto deseado con buen rendimiento y de un modo que sea escalable y reproducible en una escala industrial. El proceso de la presente invención comprende una estrategia única que ha sido desarrollada para obtener un proceso sintético que es tan convergente como sea posible.

La vía 1, vía 2 y vía 3 mostradas a continuación representan estrategias informadas en la bibliografía para la síntesis del pentasacárido EDCBA. A diferencia, un ejemplo de un proceso novedoso para la producción de fondaparinux sódico según la presente invención también se muestra a continuación.



Los procesos de la presente invención, como se explican resumidamente en el esquema anterior, proporcionan el producto de pentasacárido (EDCBA) deseado en menos etapas sintéticas. Las menos etapas sintéticas aumentan la viabilidad económica del proceso. Esto es particularmente importante para producir decenas de kilogramos de fondaparinux por año. Para una revisión del aumento de escala del proceso, véase, por ejemplo, van Boeckel et al., Angew. Chem. Intl. Ed., 32 1671-1818, 1993.

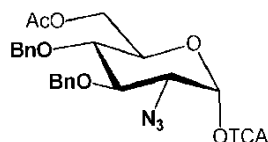
Un aspecto de un proceso de la presente invención, Proceso 1, se resume en el esquema a continuación:



donde Ac es acetilo, Bn es bencilo, Lev es levulinilo y TCA es tricloroacetimidato.

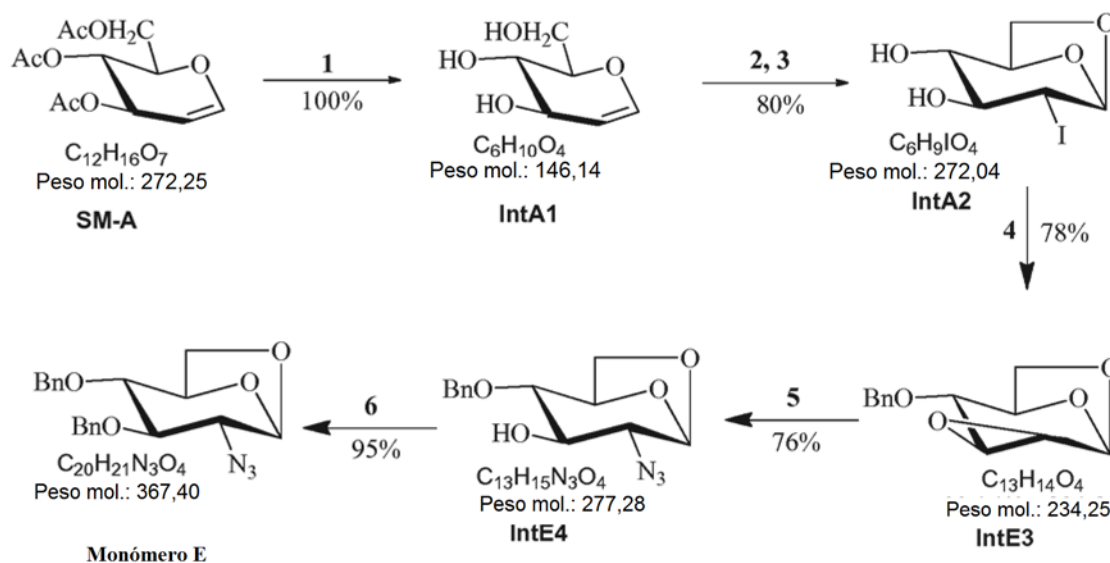
Síntesis:

Seguindo la estrategia resumidamente explicada para el Proceso I en el esquema anterior, los siguientes elementos estructurales han sido preparados para su uso en la preparación de fondaparinux sódico.

Síntesis del monosacárido E

donde Ac es acetilo, Bn es bencilo y TCA es tricloroacetimidato.

En una realización, el monómero E puede prepararse por el proceso mostrado a continuación. Este método se ha usado en los procesos de la presente invención a una escala de varios kilogramos y ha conducido a una selectividad de α -glucosilación >95 %. Véase, por ejemplo, Zhe et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 1900-1934, 2009. El monómero E se prepara en 8 etapas a partir del triacetato de glucal comercialmente disponible. La introducción de la azida se logra mediante un producto intermedio de epóxido de Cerny (M. Cerny et. al, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1977, 34, 23-127), como se explica resumidamente en el siguiente esquema.



Reactivos: 1. NaOMe, MeOH, TA, 2 h, resina 50wx; 2. $(\text{Bu}_3\text{Sn})_2\text{O}$ (0,8 equiv.), ACN, MS, reflujo, 3 h; 3. I_2 (1,5 equiv.), 5 °C a TA, 2 h; 4. NaH (2 equiv.), DMF, BnBr (2,5 equiv), -20 °C a TA, 3 h; 5. NaN_3 , DMF, 120 °C, 12 h; 6. NaH, DMF, BnBr (2,5 equiv), 0 °C a TA, 3 h.

Síntesis del elemento estructural de DC

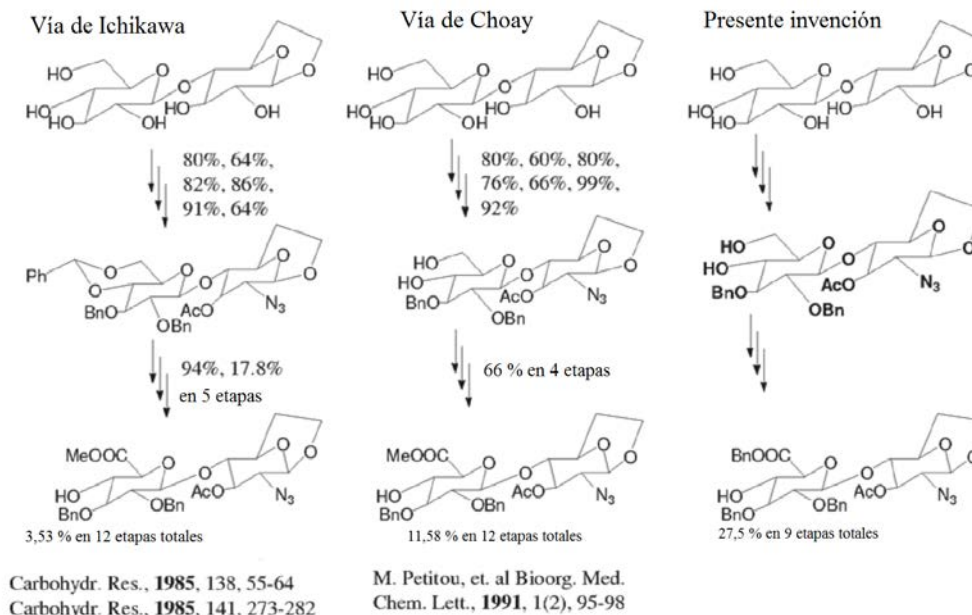
La celobiosa es un disacárido natural que tiene un enlace β -glucosídico entre azúcares. Ambos disacáridos, DC y BA, en fondaparinux sódico están conectados mediante enlaces β -glucosídicos. Además, el uso de celobiosa como elemento estructural ofrece una síntesis más convergente y así un número apreciablemente reducido de etapas en la síntesis de fondaparinux sódico.

Se ha informado de celobiosa para la síntesis de elementos estructurales de los disacáridos DC y BA. Véanse, por ejemplo, H. Kuzuhara et al., *Carbohydr. Res.*, 1988, 172, 73-64, 1988; H. Kuzuhara et al., *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 611-614, 1986; H. Kuzuhara, *Carbohydr. Res.*, 1985, 141, 273-282, 1985 y M. Petitou et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1991, 1 (2), 95-98. Sin embargo, su uso para la preparación del disacárido BA no fue particularmente satisfactorio, ya que el rendimiento para la inversión del centro C-5 para convertir glucosa en idosa fue decepcionantemente bajo (18 %). Por tanto, este enfoque no fue práctico. Como se representa en el esquema a continuación, el rendimiento global del disacárido DC en la síntesis de Kuzuhara también fue bajo (solo 3,5 % en las 12 etapas). La modificación de Petitou (uso de una tosilación selectiva de 2-OH en el resto de C) produce un ligero aumento en el rendimiento (11,58 % en 12 etapas). Sin embargo, el rendimiento es todavía muy bajo.

Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que las modificaciones químicas novedosas permiten la síntesis del elemento estructural de DC [disacárido DC] en rendimientos más altos, que implica menos etapas sintéticas (por ejemplo, 27,5 % de rendimiento en 9 etapas). Este enfoque se explica resumidamente en el esquema a continuación.

5

Elemento estructural de celobiosa – Síntesis de dímero de DC

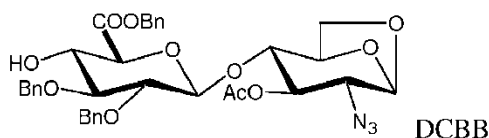


La anhidrocelobiosa está comercialmente disponible; Synthesis : Carbohydr. Res., 1982 (101), 148-151

Síntesis de pentasacárido: Tetrahedron Lett., 1986, 27(5), 611-614

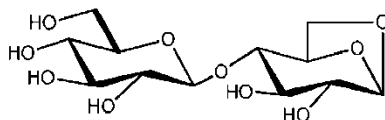
Así, otra realización de la presente invención es un proceso de preparación del elemento estructural de DC que tiene la fórmula

10



donde el elemento estructural de DC se prepara a partir de 1,6-anhidrocelobiosa que tiene la estructura

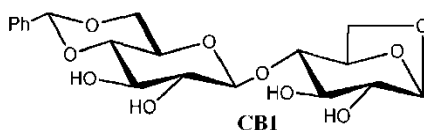
15



que comprende al menos cuatro de las siguientes etapas:

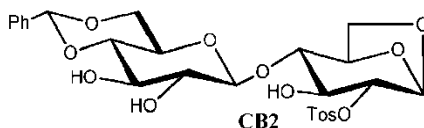
20

(a) proteger la 1,6-anhidrocelobiosa para formar CB1 que tiene la estructura

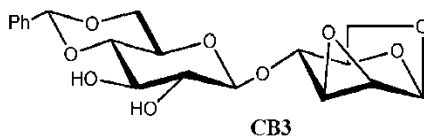


(b) tosilar CB1 para formar CB2 que tiene la estructura

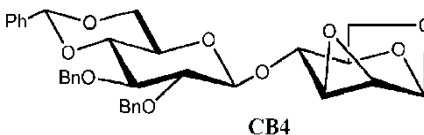
25



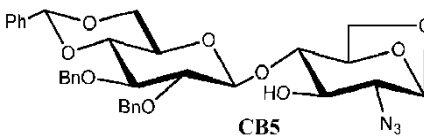
(c) hacer reaccionar CB2 con base para formar CB3 que tiene la estructura



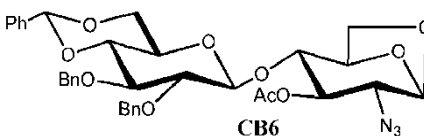
5 (d) proteger CB3 para formar CB4 que tiene la estructura



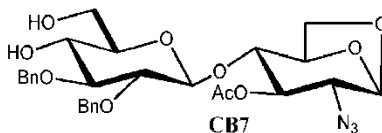
10 (e) hacer reaccionar CB4 con azida para formar CB5 que tiene la estructura



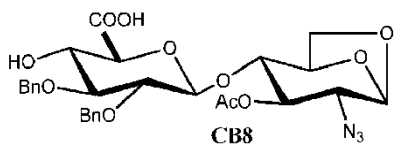
(f) acetilar CB5 para formar CB6 que tiene la estructura



(g) deproteger CB6 para formar CB7 que tiene la estructura



(h) oxidar CB7 para formar CB8 que tiene la estructura



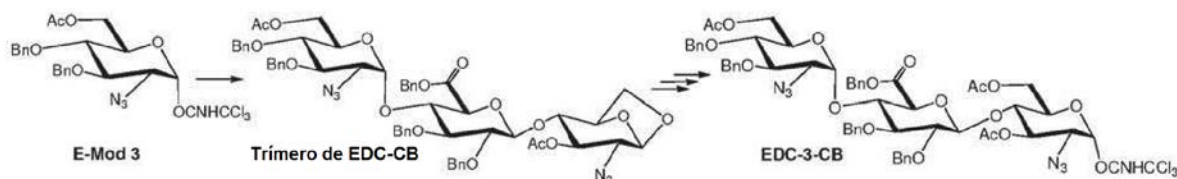
y

(i) bencilar CB8 para formar el dímero DC.

En ciertas realizaciones, el proceso incluye al menos seis etapas de las etapas (a)-(i). En realizaciones adicionales, el proceso incluye todas las etapas (a)-(i).

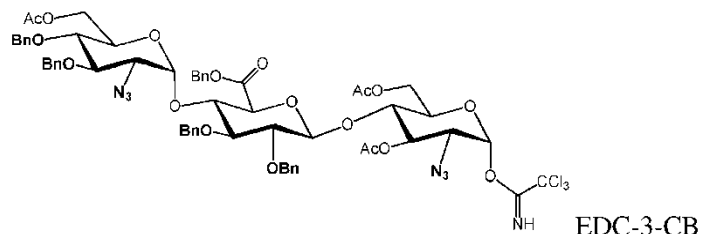
El proceso de la presente invención para la síntesis del dímero DC emplea un procedimiento de oxidación más suave usando una oxidación con TEMPO/NaOCl que elimina la necesidad de las tres etapas del proceso de Choay: tritilación, levulinación y deslevulinación. Este proceso mejorado de la presente invención también proporciona rendimientos mejorados del dímero DC (hasta el 27,5 %).

Síntesis del elemento estructural de trisacárido EDC



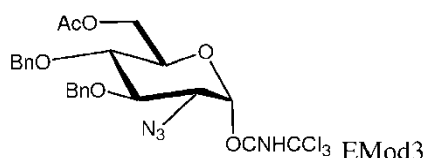
- 5 La síntesis del fragmento de EDC [EDC-3-CB] se logra en 8 etapas y en ~40 % de rendimiento global. Véase la solicitud provisional de EE.UU. N.º de serie 61/230.557 presentada el 31 de julio de 2009 y la solicitud de patente de EE.UU. N.º 12/847.719 presentada el 30 de julio de 2010, que se incorporan por este documento por referencia en sus totalidades. La estereoquímica del α -acoplamiento deseada del enlace de glucosilo entre el monómero E y el elemento estructural de disacárido DC se obtiene mediante química de acetimidato de Schmidt, que proporciona el trisacárido. No podría detectarse β -isómero por RMN ^1H en el producto aislado. El trisacárido anhidro puede convertirse en el aceptor de tricloroacetimidato correspondiente usando los métodos descritos en el presente documento o mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica (J. Choay et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 1, 95-98, 1991).

- 15 Así otra realización de la presente invención es un proceso de preparación del trímero EDC que tiene la fórmula

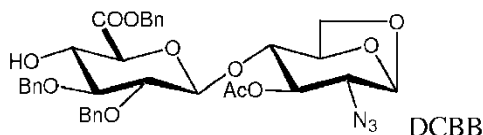


- 20 en la que el trímero EDC se prepara por un proceso (por ejemplo, una glucosilación de Schmidt) que comprende las etapas:

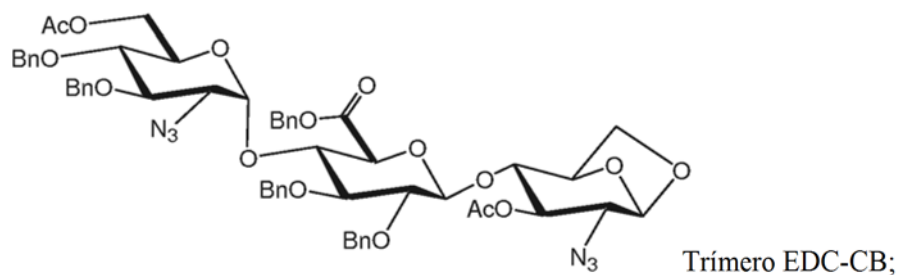
(a) acoplar un monómero E que tiene la estructura



- 25 con un elemento estructural de DC que tiene la estructura



- 30 para obtener un precursor de EDC que tiene la estructura



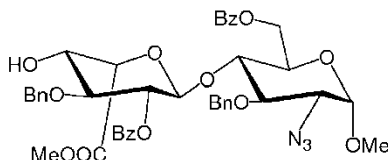
y

(b) convertir el precursor de EDC en el trímero EDC.

En otra realización, la presente invención se refiere a un proceso que comprende además convertir el trímero EDC en fondaparinux sódico.

5

Síntesis del elemento estructural de disacárido BA



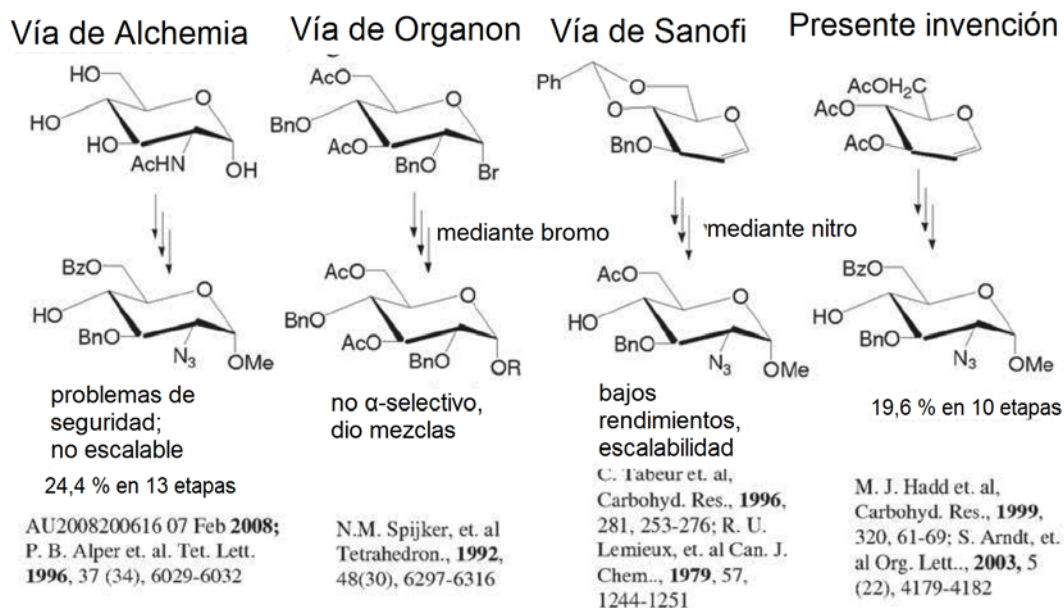
(j) Síntesis del elemento estructural A (AMod5)

Una estrategia general eficiente para la síntesis del pentasacárido EDCBA usando el proceso de conexión E + DC + BA requiere un proceso eficiente para la síntesis de tanto los elementos estructurales de monosacárido B como A. Varias publicaciones científicas describen métodos para la síntesis del derivado de α -metilglucosamina glucósido el monosacárido A. Véanse, por ejemplo, S. Y. Luo et al. *Tetrahedron Lett.*, 43, 4889-4892, 2002; M. Petitou et al. *Carbohydr. Res.*, 281, 253-276, 1996; T. Suami et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 55, 1574-1578, 1982; y M. J. Hadd et al., *Carbohydr. Res.*, 1999, 320, 61-69, 1999.

15

Elemento estructural A - Síntesis

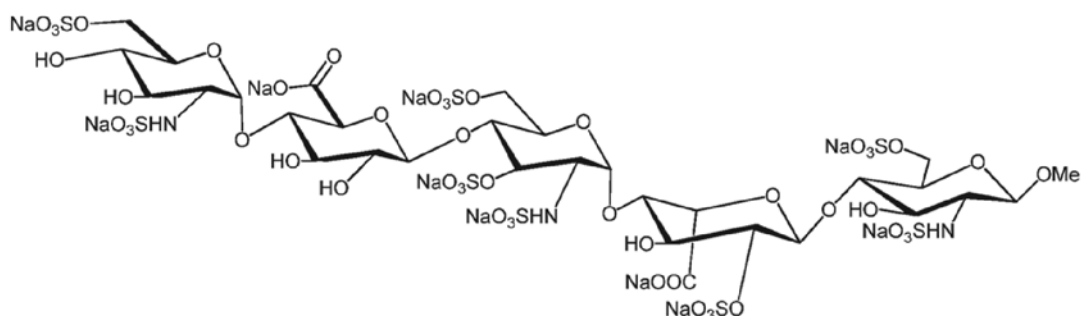
20



Sin embargo, un grave inconveniente en todos los enfoques sintéticos conocidos para fondaparinux es la contaminación por algún porcentaje del isómero de β -metilglucósido no deseado [Compuesto P1].

25

Compuesto P1



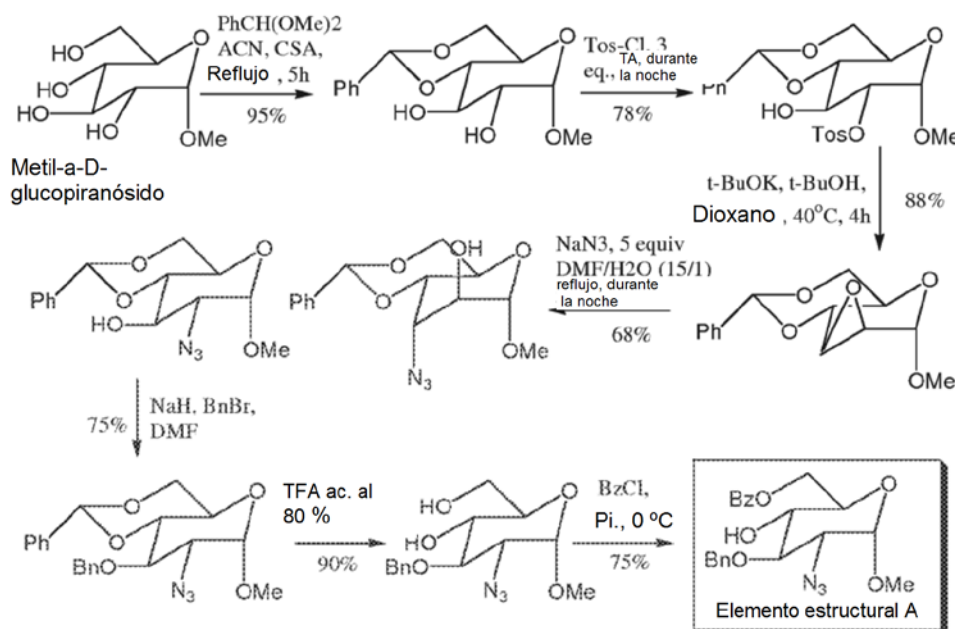
- 5 Las Figuras 1A y 1B representan el cromatograma de HPLC para fondaparinux sódico, y muestran la proximidad del pico para el β -anómero (Compuesto P1) al producto α -anómico deseado (Fondaparinux sódico).

La contaminación por incluso una pequeña cantidad de Compuesto P1 [β -anómero] es problemática para la síntesis global de fondaparinux, ya que se requiere la separación de este contaminante no deseado del α -anómero deseado.

- 10 Esfuerzos para efectuar la separación del β -anómero no deseado producen una pérdida de producto sustancial, como se demuestra por los bajos rendimientos. Los solicitantes han desarrollado dos enfoques que vencen este problema.

En el primer enfoque, la presente invención emplea metil- α -D-glucopiranosido altamente purificado (Aldrich, mín. 99 % de pureza) como material de partida para la síntesis del monómero A. Este proceso elimina la posibilidad de la presencia de cualquier β -anómero en el producto final. Así, el metil- α -D-glucopiranosido se convierte en el elemento estructural deseado según el esquema representado a continuación. Durante las manipulaciones sintéticas adicionales hacia la preparación de fondaparinux a partir del elemento estructural A no hay operaciones sintéticas que puedan epimerizar el centro anomérico en este monómero. Esta estrategia proporciona α -metil-2-azido-3-bencil-6-benzoil-D-glucósido libre a partir de su β -anómero.

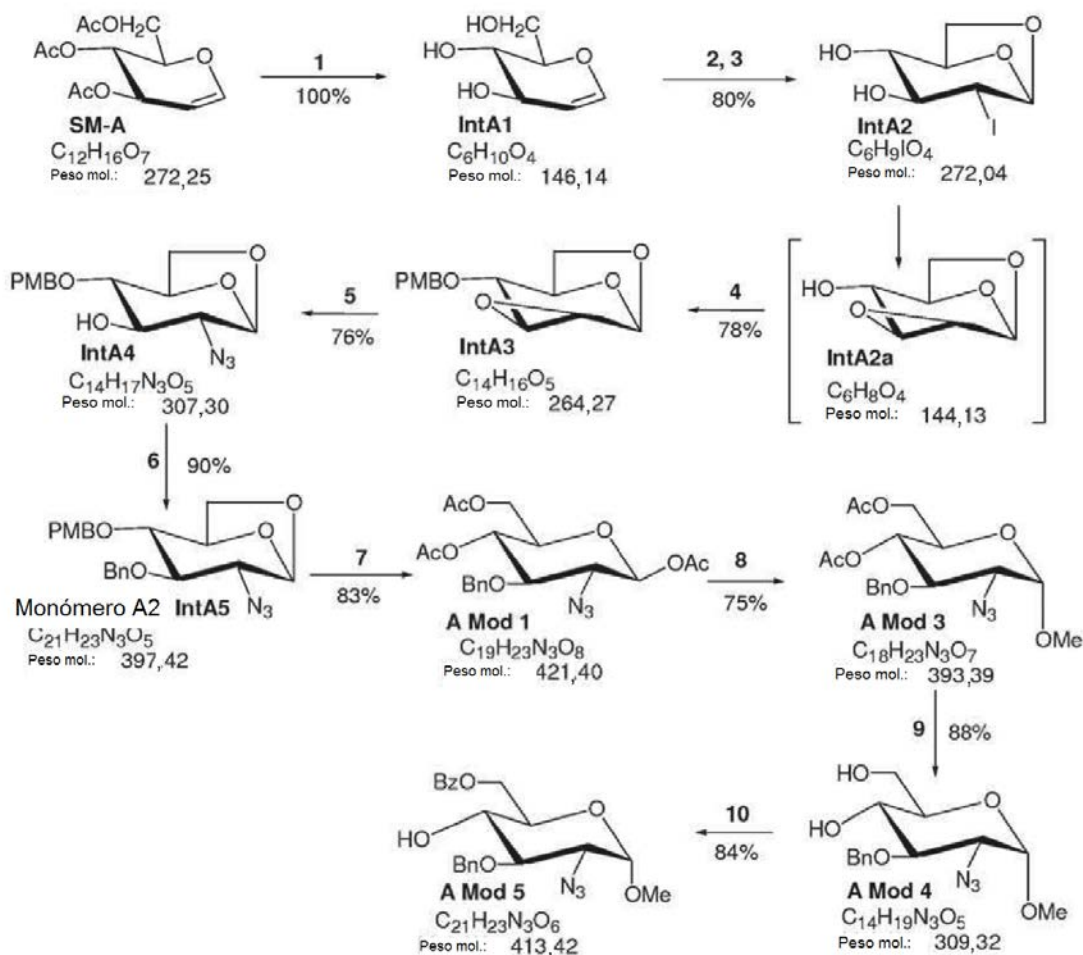
15
20



- 25 En un segundo enfoque, la presente invención se refiere a un proceso de preparación del elemento estructural A que implica las etapas mostradas en el siguiente esquema. El elemento estructural A [también denominado AMod5] puede prepararse a partir de triacetil-D-glucal [también denominado SM-A]. El triacetil-D-glucal se hidroliza para formar D-glucal [también denominado IntA1]. La 1,6-yodociclación oxidativa de IntA1 da IntA2. Epoxidación del compuesto IntA2 para formar el compuesto [el epóxido de Cerny] IntA2a [no aislado] que está p-metoxibencilado para formar el compuesto IntA3. La apertura de anillo asistida por azida del epóxido de Cerny IntA3 proporciona el derivado de azida IntA4. El bencilar el resto de hidroxilo C-3 en IntA4 da el monómero A2 [también denominado IntA5]. El monómero A2 se α -metilglucosila para formar el compuesto AMod3, que tras la desacetilación da el
- 30

compuesto AMod4. El resto de hidroxilo C-5 en AMod4 se benzoíla selectivamente para dar el compuesto AMod5 [Elemento estructural A] que se recrystaliza para dar exclusivamente el α -ánomero de AMod5. Esto se muestra en el esquema a continuación.

ESQUEMA 1 – Síntesis del monómero A-2 y Amod5 [Elemento estructural A]



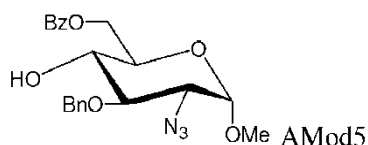
Reactivos: 1. NaOMe, MeOH, TA, 2 h, resina 50wx; 2. (Bu₃Sn)₂O (0,8 equiv.), ACN, MS, reflujo, 3 h; 3. I₂ (1,5 equiv.), 5 °C a TA, 2 h; 4. NaH (2 equiv.), DMF, p-MeOC₆H₄CH₂Br (PMB-Br, 2,5 equiv), -20 °C a TA, 2 h; 5. NaN₃, DMF, 120 °C, 12 h; 6. NaH, DMF, BnBr, 0 °C a TA, 3 h; 7. BF₃·Et₂O, Ac₂O, DCM, -20 °C a TA. 8. (a) TMS-I, TBAI, TA, 2 h; (b) DIPEA, MeOH, 16 h, TA; 9. NaOMe, forma H⁺ de la resina Dowex 50WX8-100, TA, 3 h; 10. Piridina, Bz-Cl, -40 °C a -10 °C, 2 h;

El proceso descrito anteriormente permite la síntesis completa del elemento estructural A en 10 etapas y aproximadamente con un rendimiento global del 20 % (M. J. Hadd et. al, Carbohydr. Res., 1999, 320, 61-69; S. Arndt, et. al Org. Lett., 2003, 5 (22), 4179-4182). Este proceso tiene el número más bajo de etapas y a nuestro leal saber es el método más eficiente y seguro de producción de cantidades de varios kilogramos de derivados de 2-azido-1-alfa-metilglucopiranosido que evita la azidonitración de Lemieux de glucales que ofrecen una mala selectividad α/β (véanse, por ejemplo, R. U. Lemieux, et al., Can. J. Chem., 1979, 57, 1244-1251; C. Tabeur et al., Carbohydr. Res., 1996, 281, 253-276, patente de EE.UU. N.º 4.818.816; N.M. Spijker, et al., Tetrahedron, 1992, 48(30), 6297-6316) y la peligrosa transferencia de diazo catalizada por metal para la incorporación de azida en la posición 2 que posee una grave seguridad se refiere a la fabricación a escala de varios kilogramos (véanse, por ejemplo, P. B. Alper et. al. Tet. Lett. 1996, 37 (34), 6029-6032; patente australiana N.º AU 2008 200616).

El proceso desvelado en el presente documento produce el elemento estructural A de la pureza más alta ($\geq 99\%$) que se ha informado hasta la fecha. En una realización, el proceso implica un procedimiento de cristalización que produce la pureza potenciada del α -ánomero de AMod5 [Elemento estructural A]. En ciertas realizaciones, AMod5 [Elemento estructural A] recrystaliza en un disolvente seleccionado de hidrocarburos C5 a C7. En una realización, el disolvente es heptano. La cristalización de AMod5 se lleva a cabo disolviendo AMod5 en un disolvente (tal como un disolvente de hidrocarburo C5-C7) a temperaturas entre aproximadamente 50 y aproximadamente 80 °C. En una

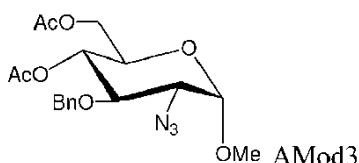
realización, la cristalización de AMod5 se lleva a cabo disolviendo AMod5 en heptano a temperaturas entre aproximadamente 50 y aproximadamente 60 °C. En ciertas realizaciones, la solución de AMod5 se enfría entonces a temperatura ambiente y se deja reposar (por ejemplo, durante aproximadamente 16 horas) a esta temperatura.

- 5 En realizaciones adicionales, el elemento estructural A se prepara en más de aproximadamente el 95 %, más de aproximadamente el 96 %, más de aproximadamente el 97,5 %, más de aproximadamente el 98 %, más de aproximadamente el 99 %, más de aproximadamente el 99,5 %, o superior a aproximadamente el 99,9 % de la forma de α -anómero.
- 10 En realizaciones adicionales, el elemento estructural A preparado contiene menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 2,5 %, menos de aproximadamente el 2 %, menos de aproximadamente el 1 %, menos de aproximadamente el 0,5 %, menos de aproximadamente el 0,1 % o menos de aproximadamente el 0,05 % de la forma de β -anómero.
- 15 En otra realización, la presente invención se refiere a un método de purificación de un monosacárido de fórmula

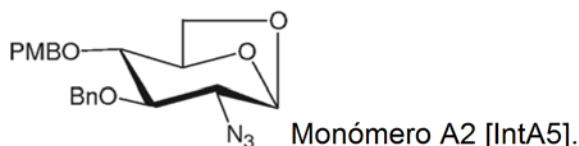


- 20 cristalizando el monosacárido en un disolvente orgánico seleccionado de hidrocarburos C5 a C7, tales como heptano.

En todavía una realización adicional, la presente invención se refiere a un método de preparación de un monosacárido AMod3



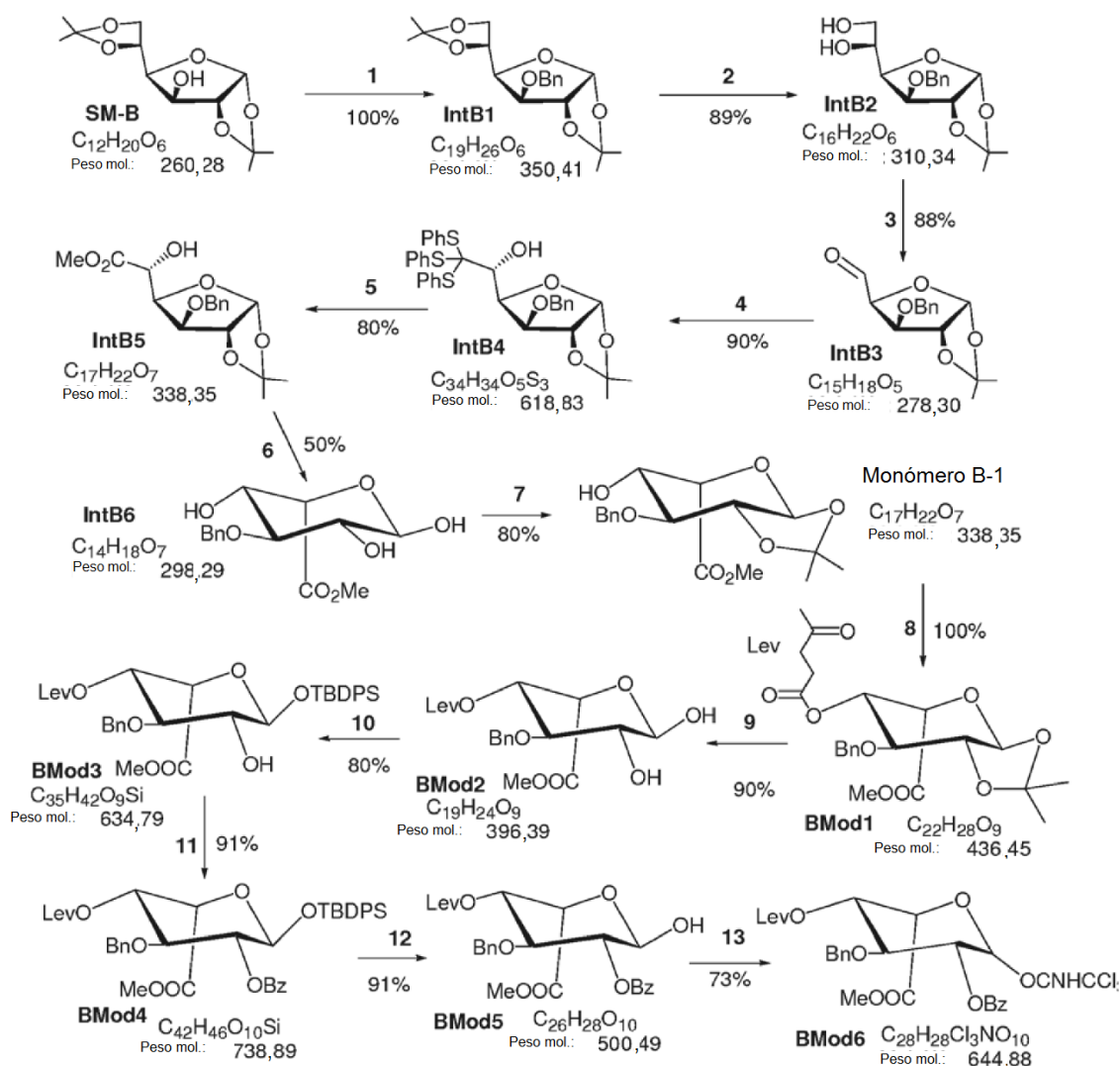
- 25 que comprende α -metilglucosilar el compuesto el monómero A2 [también denominado IntA5]



- 30 (ii) Síntesis del elemento estructural B

- 35 Otro problema exigente en la síntesis de fondaparinux sódico es una fuente accesible del azúcar idosa. Este problema surge debido a que no se conoce fuente natural para este hidrato de carbono. Además, materiales de partida comercialmente disponibles son de costes prohibitivos para las aplicaciones industriales a gran escala.

En una realización de la presente invención, el elemento estructural B [también denominado BMod6] puede prepararse según como se muestra en el esquema a continuación.

Esquema 2 – Síntesis del Monómero B-1 y BMod6 [Elemento estructural B]

Reactivos: **1.** NaH, BnBr, THF, DMF, 0 °C a 65 °C, 3 h; **2.** 66 % de ácido acético / H₂O, 40 °C, 16 h; **3.** NaIO₄, (Bu)₄NBr, DCM, H₂O, oscuridad, 3 h; **4.** (PhS)₃CH, n-BuLi, THF, -78 °C, 3 h; **5.** CuCl₂ / CuO, MeOH, H₂O, 3 h; **6.** 90 % de TFA/H₂O, DCM, TA, 2 h; **7.** DMF, CSA 2-metoxipropeno, 0 °C a TA, 16 h; MeOH, TEA. **8.** Lev₂O, DIPEA, TA, 16 h; **9.** 90 % de TFA, TA, 4 h; **10.** Imidazol, TBDPSi-Cl, TA, 3 h; **11.** Piridina, BzCl, TA, 3 h; **12.** TBAF, TA, 3 h; **13.** TCA, DBU, TA, 2 h;

Véanse también, por ejemplo, Bonnaffe et al., Tetrahedron Lett., 41, 307-311, 2000; Bonnaffe et al., Carbohydr. Res., 2003, 338, 681-686, 2003; y Seeberger et al., J. Org. Chem., 2003, 68, 7559-7561, 2003.

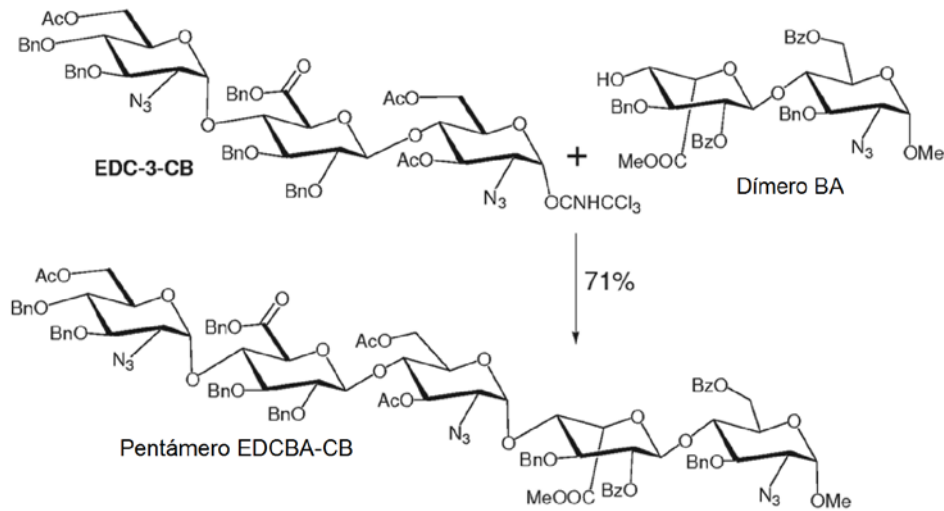
El método de la presente invención usa cloruro de t-butilidifenilsililo [TBDPS] en lugar de cloruro de t-butildimetilsililo [TBDMS] debido a la facilidad de migración del grupo protector de TBDMS a la posición 2 durante la etapa de siliación. El uso de TBDPS produce un aumento en el rendimiento de BMod6 [Elemento estructural B] de ~ 5 %. El rendimiento global de BMod6 [Elemento estructural B] de diacetona glucosa [SM-B] es, por ejemplo, ~11 %.

(iii) Síntesis del fragmento de dímero BA

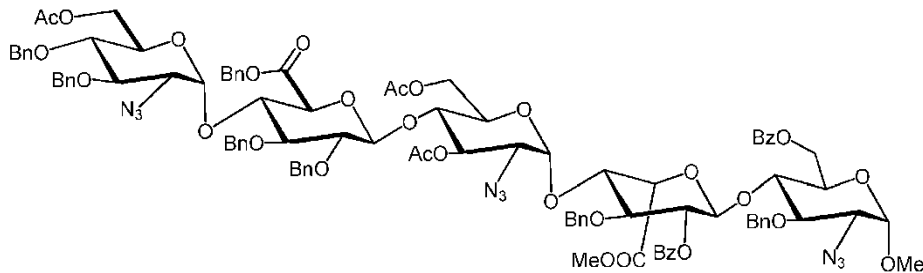
En otra realización de los procesos descritos en el presente documento, los monómeros A y B, preparados como se ha descrito anteriormente, pueden unirse para formar el dímero BA, con β-estereoespecificidad completa en el enlace glucosídico. Por ejemplo, el dímero BA puede prepararse con β-estereoespecificidad completa en el enlace glucosídico con ~ 72 % de rendimiento en una escala de varios kilogramos. La eliminación del grupo Lev (82 %) por métodos convencionales proporciona el dímero BA en una forma lista para el acoplamiento con el elemento estructural del trímero EDC.

Pentasacárido completamente protegido EDCBA

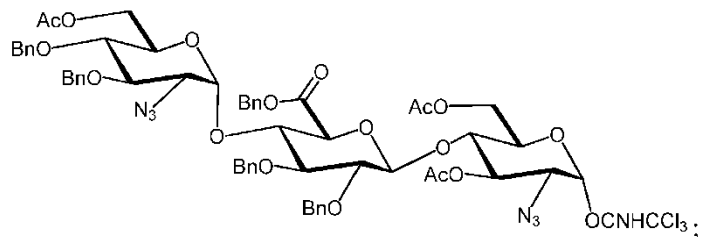
En otra realización de los procesos descritos en el presente documento, el acoplamiento del trímero EDC con el donante de disacárido BA produce el pentasacárido unido en α deseado (EDCBA, también denominado pentasacárido completamente protegido (FPP)), como se muestra en el esquema a continuación.



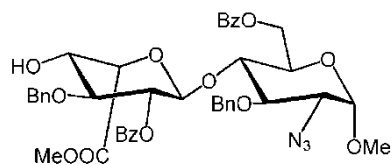
Así, otra realización de la presente invención es un proceso para la preparación de un precursor de pentasacárido heparínico completamente protegido para fondaparinux sódico que tiene la estructura



que comprende la etapa de acoplar un trímero EDC que tiene la estructura



con un dímero BA que tiene la estructura



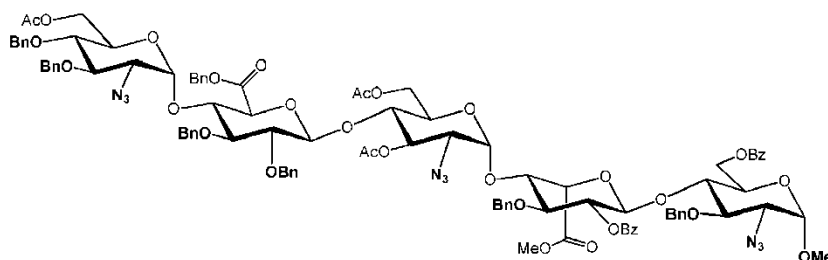
En otra realización, la presente invención se refiere a un proceso que comprende además convertir el precursor de pentasacárido heparínico completamente protegido en fondaparinux sódico.

Sumario sintético

Empleando los procesos de la presente invención, como se describe en el presente documento, el precursor de pentasacárido completamente protegido (EDCBA) puede prepararse en 44 etapas, que puede entonces convertirse en fondaparinux sódico en cuatro etapas (total de 48 etapas globales). Los procesos descritos en el presente documento permiten la síntesis de fondaparinux sódico en menos etapas sintéticas que aquellas previamente descritas. Los procesos descritos en el presente documento también proporcionan un mejor perfil de pureza debido a contaminación de β -metil glucósido reducida en el producto final.

Compuestos con cantidades reducidas de β -anómero

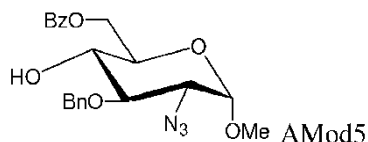
En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un precursor de pentasacárido heparínico completamente protegido para fondaparinux sódico que tiene la estructura



en el que la cantidad de β -metilglucósido correspondiente es inferior a aproximadamente el 0,5 %, tal como inferior a aproximadamente el 0,4 %, inferior a aproximadamente el 0,3 %, inferior a aproximadamente el 0,2 %, inferior a aproximadamente el 0,1 %, inferior a aproximadamente el 0,05 %, inferior a aproximadamente el 0,01 %, inferior a aproximadamente el 0,005 %, o inferior a aproximadamente el 0,001 %. En una realización, el precursor de pentasacárido heparínico completamente protegido está sustancialmente libre del β -metilglucósido correspondiente.

El término "sustancialmente libre de", como se usa en el presente documento cuando se refiere a una impureza (tal como un β -metilglucósido), significa que un compuesto deseado contiene menos de aproximadamente el 0,1 %, tal como menos de aproximadamente el 0,05 %, menos de aproximadamente el 0,01 %, menos de aproximadamente el 0,005 %, menos de aproximadamente el 0,001 % o menos de aproximadamente el 0,0005 % en peso de la impureza.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al elemento estructural A [también denominado AMod5, monosacárido A] que tiene la estructura



en el que la cantidad del anómero de β -metilo correspondiente es inferior a aproximadamente el 0,5 %, tal como inferior a aproximadamente el 0,4 %, inferior a aproximadamente el 0,3 %, inferior a aproximadamente el 0,2 %, inferior a aproximadamente el 0,1 %, inferior a aproximadamente el 0,05 %, inferior a aproximadamente el 0,01 %, inferior a aproximadamente el 0,005 %, o inferior a aproximadamente el 0,001 %. En una realización, el elemento estructural A [AMod5, monosacárido A] está sustancialmente libre del anómero de β -metilo correspondiente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a fondaparinux, o una sal del mismo (por ejemplo, fondaparinux sódico) y composiciones que contienen el mismo, en el que se reduce la cantidad de Compuesto P1 (beta-anómero de fondaparinux sódico).

En ciertas realizaciones, el Compuesto P1 está presente en una cantidad inferior a aproximadamente el 0,5 %, tal como inferior a aproximadamente el 0,4 %, inferior a aproximadamente el 0,3 %, inferior a aproximadamente el 0,2 %, inferior a aproximadamente el 0,1 %, inferior a aproximadamente el 0,05 %, inferior a aproximadamente el 0,01 %, inferior a aproximadamente el 0,005 %, o inferior a aproximadamente el 0,001 % basado en el peso total de fondaparinux o composición. En una realización, el fondaparinux sódico, o una composición que contiene fondaparinux sódico, está sustancialmente libre del Compuesto P1.

Puede administrarse cualquiera de las formas anteriormente mencionadas de fondaparinux (o una sal del mismo) o composiciones que contienen fondaparinux (o una sal del mismo) (por ejemplo, 2,5 mg, 5 mg, 7,5 mg, 10 mg, de solución para inyección) para la profilaxis de trombosis venosa profunda (TVP) que puede conducir a embolia pulmonar (EP) en pacientes que se someten a (i) cirugía de rotura de la cadera (incluyendo profilaxis prolongada),

(ii) cirugía de sustitución de la cadera, (iii) cirugía sustitución de la rodilla y (iv) cirugía abdominal (que está en riesgo de complicaciones tromboembólicas). Las formas y composiciones descritas en el presente documento también pueden administrarse conjuntamente con warfarina sódica para el tratamiento de TVP y EP aguda.

5 Definiciones

Ejemplos de grupos alquilo que tienen uno a seis átomos de carbono son metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, y todas las formas isoméricas y lineales y ramificadas de los mismos.

10 El término "alilo", a menos que se defina de otro modo, se refiere al grupo químico $-C(O)R$. R puede ser, por ejemplo, arilo (por ejemplo, fenilo) o alquilo (por ejemplo, alquilo C_1-C_6).

El término "arilo" se refiere a un grupo aromático que tiene 6 a 14 átomos de carbono tal como, por ejemplo, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo y bifenilo. El término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático que tiene 5 a 14 átomos, donde al menos uno de los carbonos se ha sustituido con N, O o S. Ejemplos adecuados incluyen, por ejemplo, piridilo, quinolinilo, dihidroquinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, dihidroquinazolilo y tetrahidroquinazolilo.

20 Será evidente para aquellos expertos en la materia que grupos funcionales sensibles pueden necesitar ser protegidos y desprotegidos durante la síntesis de un compuesto de la invención. Esto puede lograrse por métodos convencionales, por ejemplo, como se describe en "Protective Groups in Organic Synthesis" por Greene and Wuts, John Wiley & Sons Inc (1999), y referencias en su interior que pueden añadirse o quitarse usando los procedimientos expuesto en el presente documento. Ejemplos de grupos hidroxilo protegidos (es decir, grupos protectores de hidroxilo) incluyen silil éteres tales como aquellos obtenidos haciendo reaccionar un grupo hidroxilo con un reactivo tal como, pero no se limita a, t-butildimetil-clorosilano, trimetilclorosilano, triisopropilclorosilano, trietilclorosilano; metil y etil éteres sustituidos tales como, pero no se limitan a, metoxi metil éter, metiltiometil éter, benciloximetil éter, t-butoximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, tetrahidropirranil éteres, 1-etoxietil éter, alil éter, bencil éter; ésteres tales como, pero no se limitan a, benzoilformiato, formiato, acetato, tricloroacetato y trifluoroacetato. Ejemplos de grupos amina protegidos (es decir, grupos protectores de amino) incluyen, pero no se limitan a, amidas tales como formamida, acetamida, trifluoroacetamida y benzamida; imidas, tales como ftalimida y ditiosuccinimida; y otros. Ejemplos de grupos sulfhidrido protegidos incluyen, pero no se limitan a, tioéteres tales como S-bencil tioéter y S-4-picolil tioéter; derivados de S-metilo sustituidos tales como hemitio, ditio y aminotio acetales; y similares.

35 Un grupo protector que puede eliminarse mediante hidrogenación es, a modo de ejemplo, bencilo o un grupo bencilo sustituido, por ejemplo bencil éteres, bencilidenacetales. Aunque el grupo bencilo es él mismo un grupo protector comúnmente usado que puede eliminarse mediante hidrogenación, un ejemplo de un grupo protector de bencilo sustituido es *p*-metoxibencilo.

40 En toda la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra "comprender" y otras formas de la palabra, tales como "que comprende" y "comprende", significa que incluye, pero no se limita a, y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes en plural, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Así, por ejemplo, referencia a "un componente" incluye mezclas de dos o más componentes.

45 Los intervalos pueden expresarse en el presente documento como de "aproximadamente" un valor particular, y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa un intervalo tal, otro aspecto incluye de un valor particular y/o al otro valor particular. Similarmente, cuando los valores se expresan como aproximaciones, por el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, e independientemente del otro punto final. También se entiende que hay varios valores desvelados en el presente documento, y que cada valor también se desvela en el presente documento como "aproximadamente" ese valor particular, además del propio valor. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", entonces también se desvela "aproximadamente 10". También se entiende que también se desvela cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13 y 14.

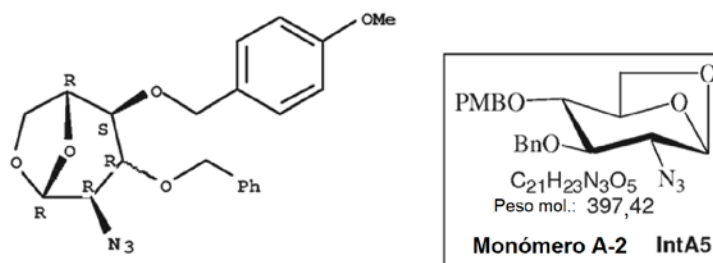
60 En toda esta memoria descriptiva, se referencian diversas publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en sus totalidades se incorporan por este documento por referencia en la presente solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la técnica al que se refiere la materia desvelada. Las referencias desveladas también se incorporan individualmente y específicamente por referencia en el presente documento para el material contenido en ellas que se trata en la frase en la que se basa la referencia.

65 Los siguientes ejemplos son simplemente ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse de ningún modo como limitante del alcance de la invención, ya que muchas variaciones y equivalentes que están englobados por la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de la presente divulgación.

Ejemplos

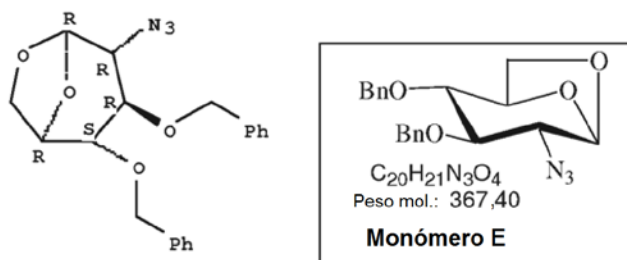
- Se usan las siguientes abreviaturas: Ac es acetilo; ACN es acetonitrilo; MS es tamices moleculares; DMF es dimetilformamida; PMB es *p*-metoxibencilo; Bn es bencilo; DCM es diclorometano; THF es tetrahidrofurano; TFA es ácido trifluoroacético; CSA es ácido canforsulfónico; TEA es trietilamina; MeOH es metanol; DMAP es dimetilaminopiridina; TA es temperatura ambiente; CAN es nitrato de amonio cérico; Ac₂O es anhídrido acético; HBr es bromuro de hidrógeno; TEMPO es N-óxido de tetrametilpiperidina; TBAC1 es cloruro de tetrabutilamonio; EtOAc es acetato de etilo; HOBT es hidroxibenzotriazol; DCC es dicitclohexilcarbodiimida; Lev es levunililo; TBDPS es terc-butildifenilsililo; TBDMS es terc-butildimetilsililo; TCA es tricloroacetnitrilo; O-TCA es O-tricloroacetimidato; Lev₂O es anhídrido levulínico; DIPEA es diisopropiletilamina; Bz es benzoílo; TBAF es fluoruro de tetrabutilamonio; DBU es diazabicycloundecano; BF₃•Et₂O es trifluoruro de boro-eterato; TMSI es yoduro de trimetilsililo; TBAI es yoduro de tetrabutilamonio; TES-Tf es trifluorometanosulfonato de trietilsililo (triflato de trietilsililo); DHP es dihidropirano; PTS es ácido *p*-toluenosulfónico.
- La preparación de ciertos monómeros usados en los procesos descritos en el presente documento es tanto conocida en la técnica como puede prepararse usando los métodos descritos en el presente documento.

Monómero A-2



- La síntesis del monómero A-2 (Número de registro CAS 134221-42-4) se ha descrito en las siguientes referencias: Arndt et al., Organic Letters, 5(22), 4179-4182, 2003; Sakairi et al., Bulletin of the Chemical Society of Japan, 67(6), 1756-8, 1994; y Sakairi et al., Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, (5), 289-90, 1991, y las referencias citadas en su interior, que se incorporan por este documento por referencia en sus totalidades.
- El monómero A2 también puede obtenerse en 6 etapas sintéticas a partir de tri-O-acetil D-glucal. El triacetato, SM-A, se desacetiló con metóxido de sodio en metanol dando el producto intermedio, IntA1. El grupo hidroxilo primario se convirtió en el derivado anhídrido con óxido de tributilestaño y entonces se yodó en un procedimiento de un recipiente de dos etapas dando el derivado de yodo se convirtió en el derivado de bisanhidro [también conocido como epóxido] y el C4-hidroxilo se protegió como su éter de PMB IntA3 mediante tratamiento con hidruro de sodio y bromuro de *p*-metoxibencilo. El epóxido de IntA3 se abrió en el anillo con azida de sodio dando el derivado de C2-azido IntA4. El hidroxilo libre en la posición C3 se alquiló entonces con bromuro de bencilo para formar el compuesto de biséter el monómero A2.

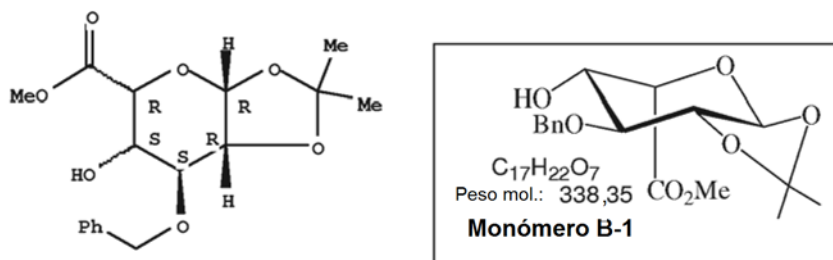
Monómero E



- El monómero E (Número de registro CAS 55682-48-9) puede sintetizarse usando los métodos descritos en las siguientes referencias bibliográficas: Hawley et al., European Journal of Organic Chemistry, (12), 1925-1936, 2002; Dondoni et al., Journal of Organic Chemistry, 67(13), 4475-4486, 2002; Van der Klein et al., Tetrahedron, 48(22), 4649-58, 1992; Hori et al., Journal of Organic Chemistry, 54(6), 1346-53, 1989; Sakairi et al., Bulletin of the Chemical Society of Japan, 67(6), 1756-8, 1994; Tailler et al., Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic

and Bio-Organic Chemistry, (23), 3163-4, (1972-1999) (1992); Paulsen et al., Chemische Berichte, 111(6), 2334-47, 1978; Dasgupta et al., Synthesis, (8), 626-8, 1988; Paulsen et al., Angewandte Chemie, 87(15), 547-8, 1975; y referencias citadas en su interior, que se incorporan por este documento por referencia en sus totalidades.

Monómero B-1



5

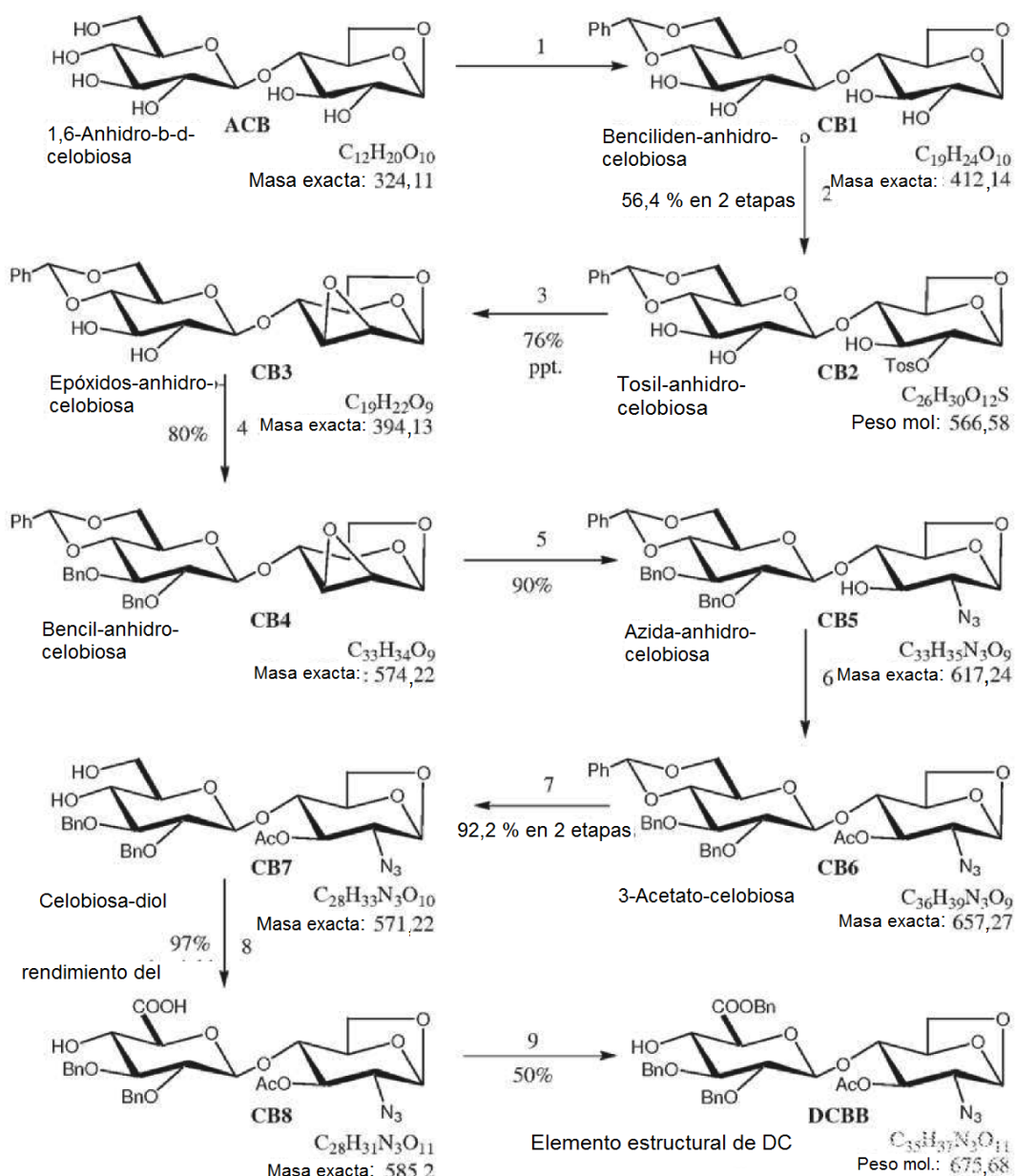
El monómero B-1 (Número de registro CAS 444118-44-9) puede sintetizarse usando los métodos descritos en las siguientes referencias bibliográficas: Lohman et al., Journal of Organic Chemistry, 68(19), 7559-7561, 2003; Orgueira et al., Chemistry--A European Journal, 9(1), 140-169, 2003; Manabe et al., Journal of the American Chemical Society, 128(33), 10666-10667, 2006; Orgueira et al., Angewandte Chemie, International Edition, 41(12), 2128-2131, 2002; y referencias citadas en su interior, que se incorporan por este documento por referencia en sus totalidades.

El monómero B1 también puede obtenerse en 7 etapas sintéticas a partir de diacetona glucosa [SM-B]. El resto de C3-hidroxilo en la diacetona glucosa (SM-B) se protegió como el bencil éter mediante reacción con bromuro de bencilo dando IntB1. El resto de isopropilideno C5-C6 se desprotegió selectivamente con ácido acético acuoso dando el producto intermedio de diol IntB2. El diol C5-C6 se escindió entonces de forma oxidativa con peryodato de sodio dando el derivado de aldehído IntB3. El aldehído IntB3 se convirtió en el derivado de ortoéster IntB4 con tris[fenil]metano y butil-litio. Entonces se convirtió IntB4 en el derivado de yodofuranonato IntB5 en presencia de cloruro de cobre (II) y óxido de cobre (II). El resto de isopropilideno C1-C2 se desprotegió con ácido trifluoroacético acuoso dando el diol de glucopiruranonato IntB6. El diol C1-C2 IntB6 se protegió entonces como su derivado de isopropilideno dando el monómero B1.

Síntesis del elemento estructural de DC (dímero DC) de EDCBA (que es equivalente al dímero EF del pentasacárido DEFGH)

Se preparó el elemento estructural de DC [DCBB] en 9 etapas sintéticas a partir de anhidrocelobiosa usando el siguiente procedimiento: Se protegieron los restos de alcohol C4 y C6 del anillo 'D' de anhidrocelobiosa [ACB] como el derivado de bencilideno [CB1] usando benzaldehído dimetilacetal en acetonitrilo y ácido canforsulfónico como catalizador. El C2-hidroxilo en el anillo de 'C' del disacárido CB1 se hizo reaccionar con cloruro de p-toluenosulfonilo en piridina con una cantidad catalítica de DMAP dando el derivado tosilado CB2. El derivado de tosilato CB2 se hizo reaccionar con t-butoxido de potasio en terc-butanol y diclorometano dando el producto intermedio de epóxido CB3. Los restos de hidroxilo C-2 y C-3 en el anillo 'D' se protegieron como los bencil éteres mediante la reacción con bromuro de bencilo en DMF e hidruro de sodio como base, dando el producto intermedio de dibencilo CB4. Se abrió el anillo de epóxido de CB4 con azida de sodio en agua y DMF dando el derivado de azido, CB5. El C3-hidroxilo en el anillo 'C' del disacárido CB5 se hizo reaccionar con anhídrido acético en diclorometano y una cantidad catalítica de DMAP dando el derivado de acetato CB6. El resto de bencilideno de CB6 se desprotegió usando 8 % de TFA en tetrahydrofurano dando el producto intermedio de diol CB7. El C6-hidroxilo del anillo 'D' en CB7 se oxidó usando TEMPO con hipoclorito de sodio en acetonitrilo y tampón NaH2PO4 dando el producto intermedio de ácido carboxílico CB8. El resto de ácido carboxílico en CB8 se esterificó usando alcohol bencílico en presencia del agente de acoplamiento EDC, DMAP y diclorometano dando el elemento estructural de DC, DCBB.

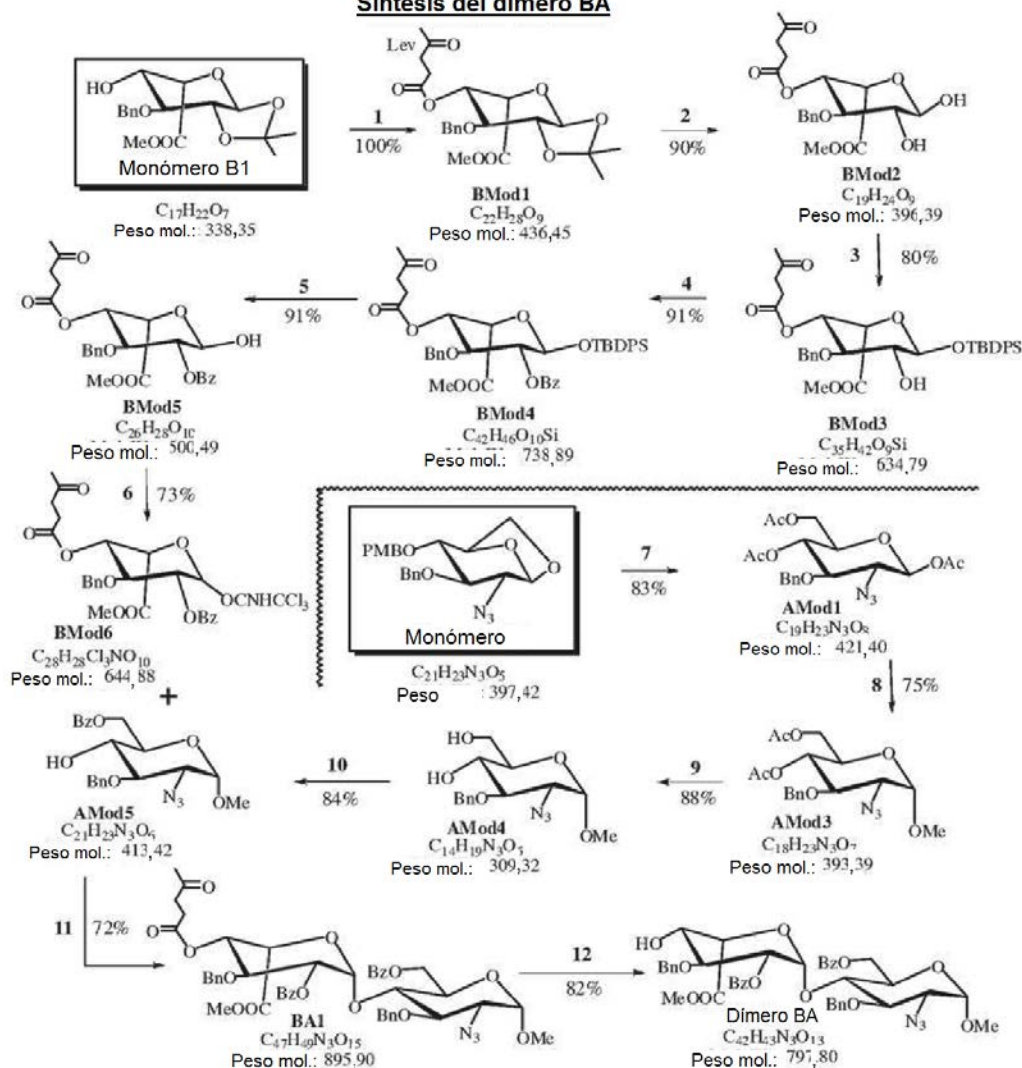
Conversión de anhidrocelobiosa en el elemento estructural de DC:



Reactivos: 1. $PhCH(OMe)_2$ (1,3 eq), CSA (0,1 eq) ACN; 2. *p*-TosCl (3 eq), DMAP, piridina; 3. *t*-BuOH, $KOtBu$ (3 eq), DCM; 4. NaH (3,3 eq), BnBr (3 eq), DMF; 5. NaN_3 (7 eq), DMF/ H_2O (10 %); 6. Ac_2O (5 eq), DCM, DMAP; 7. TFA ac al 80 %, THF; 8. TEMPO (1,0 eq), 10 % de NaOCl, DCM, H_2O , tampón NaH_2PO_4 ; 9. EDC (2 eq), DMAP (0,1 eq), bencil-OH (5 eq), DCM

Síntesis del dímero BA

Se preparó el dímero BA en 12 etapas sintéticas a partir del monómero B1 y el monómero A2 usando el siguiente procedimiento:

Síntesis del dímero BA

Reactivos: 1. Lev₂O, DIPEA, TA, 16 h; 2. 90 % de TFA, TA, 4 h; 3. Imidazol, TBDPSi-Cl, TA, 3 h; 4. Piridina, BzCl, TA, 3 h; 5. TBAF, TA, 3 h; 6. TCA, DBU, TA, 2 h; 7. BF₃·Et₂O, Ac₂O. DCM, -20 °C a TA, 3 h; 8. (a) TMS-I, TBAI, TA, 2 h; (b) DIPEA, MeOH, 16 h, TA; 9. NaOMe, forma H⁺ de la resina Dowex 50WX8-100, TA, 3 h; 10. Piridina, Bz-Cl, -40 °C a -10 °C, 2 h; 11. BF₃·Et₂O. DCM. -20 °C-TA; 12. NH₂NH₂·H₂O. TA, 3 h.

El C4-hidroxilo del monómero B-1 se levulinó usando anhídrido levulínico y diisopropiletilamina (DIPEA) con mezcla a temperatura ambiente durante 16 horas dando el éster de levulinato BMod1, que fue seguido de hidrólisis del acetónido con 90 % de ácido trifluoroacético y mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas dando el diol BMod2. El C1-hidroxilo del diol BMod2 se silió con cloruro de *tert*-butildifenilsililo mezclando a temperatura ambiente durante 3 horas dando el derivado de sililo BMod3. El C2-hidroxilo se benzoió entonces con cloruro de benzoílo en piridina, y se mezcló a temperatura ambiente durante 3 horas dando el compuesto BMod4. El grupo sililo en BMod4 se desprotegió entonces con fluoruro de *tert*-butilamonio y se mezcló a temperatura ambiente durante 3 horas dando el C1-hidroxilo BMod5. El C1-hidroxilo se dejó reaccionar entonces con tricloroacetronitrilo en presencia de diazobicloudodecano (DBU) y mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas dando el derivado de tricloroacetamidato (TCA) BMod6, que era adecuado para el acoplamiento, por ejemplo, con el monómero A-2.

Se preparó el monómero A-2 para el acoplamiento por apertura del resto de anhídrido con BF₃·Et₂O seguido de acetilación de los grupos hidroxilo resultantes dando el derivado de triacetato AMod1.

Se preparó el monómero A-2 para la reacción de acoplamiento por apertura del resto de anhídrido y acetilación de los grupos hidroxilo resultantes dando el derivado de triacetato AMod1. Esta transformación se produce usando trifluoruro de boro-eterato, anhídrido acético y diclorometano, entre -20 °C y temperatura ambiente durante 3 horas. El C1-acetato de AMod1 se hidrolizó entonces y se metiló en dos etapas dando el diacetato AMod3. Es decir, primero se hizo reaccionar AMod1 con yoduro de trimetilsililo y se mezcló a temperatura ambiente durante 2 horas,

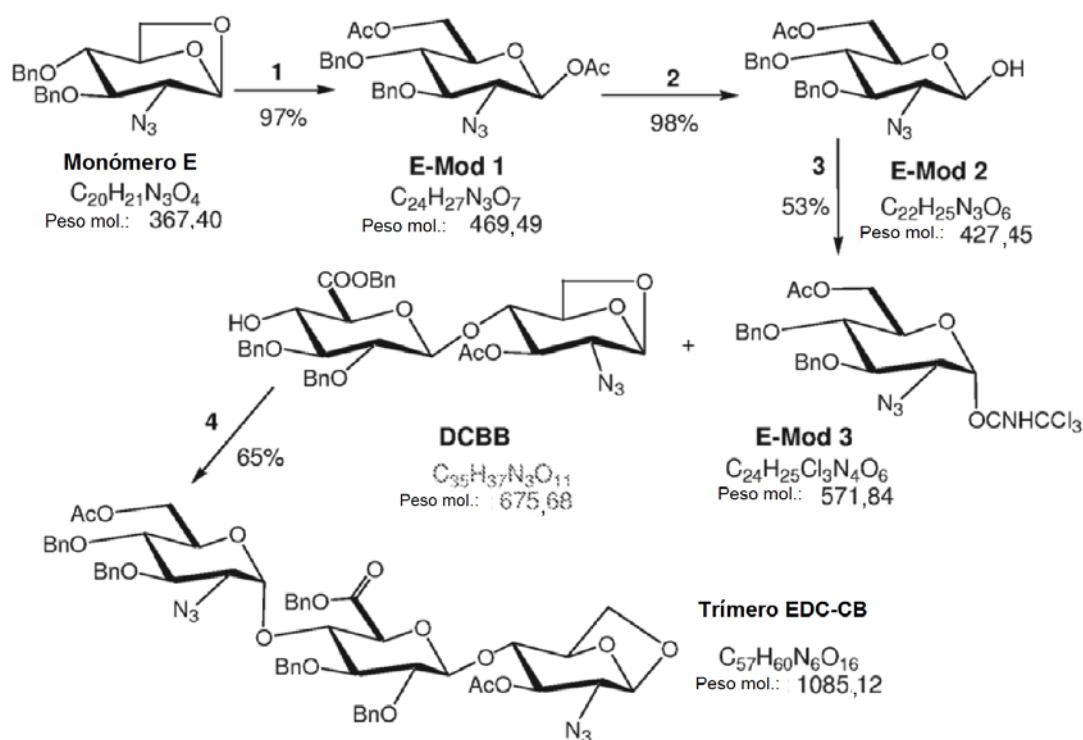
luego se hizo reaccionar con yoduro de tetrabutilamonio. Esta mezcla se hizo reaccionar con diisopropiletilamina y metanol y se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente, formando así AMod3. Los C4 y C6-acetatos de AMod3 se hidrolizan con metóxido de sodio dando el diol Amod4. La mezcla de AMod3 también se sometió a mezcla a temperatura ambiente durante 3 horas con la resina Dowex 50 Wx4X8-100 en forma de ácido para la neutralización. Esto formó Amod4. El C6-hidroxilo de AMod4 se benzoíla entonces tratando con cloruro de benzoílo en piridina a -40 °C y luego dejándolo calentar a -10 °C durante 2 horas dando AMod5.

El acoplamiento del monómero AMod5 con el grupo C4-hidroxilo libre de BMod6 se realizó en presencia de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ y diclorometano con mezcla entre -20 °C y temperatura ambiente durante 3 horas para proporcionar el disacárido BA1. El resto C4-levulinilo del disacárido se hidrolizó entonces con hidracina dando el dímero BA, que es adecuado para las posteriores reacciones de acoplamiento.

Síntesis del trímero EDC

Se preparó el trímero EDC en 4 etapas sintéticas a partir del monómero E y el elemento estructural de DC usando el siguiente procedimiento:

Preparación de Trímero EDC-CB:



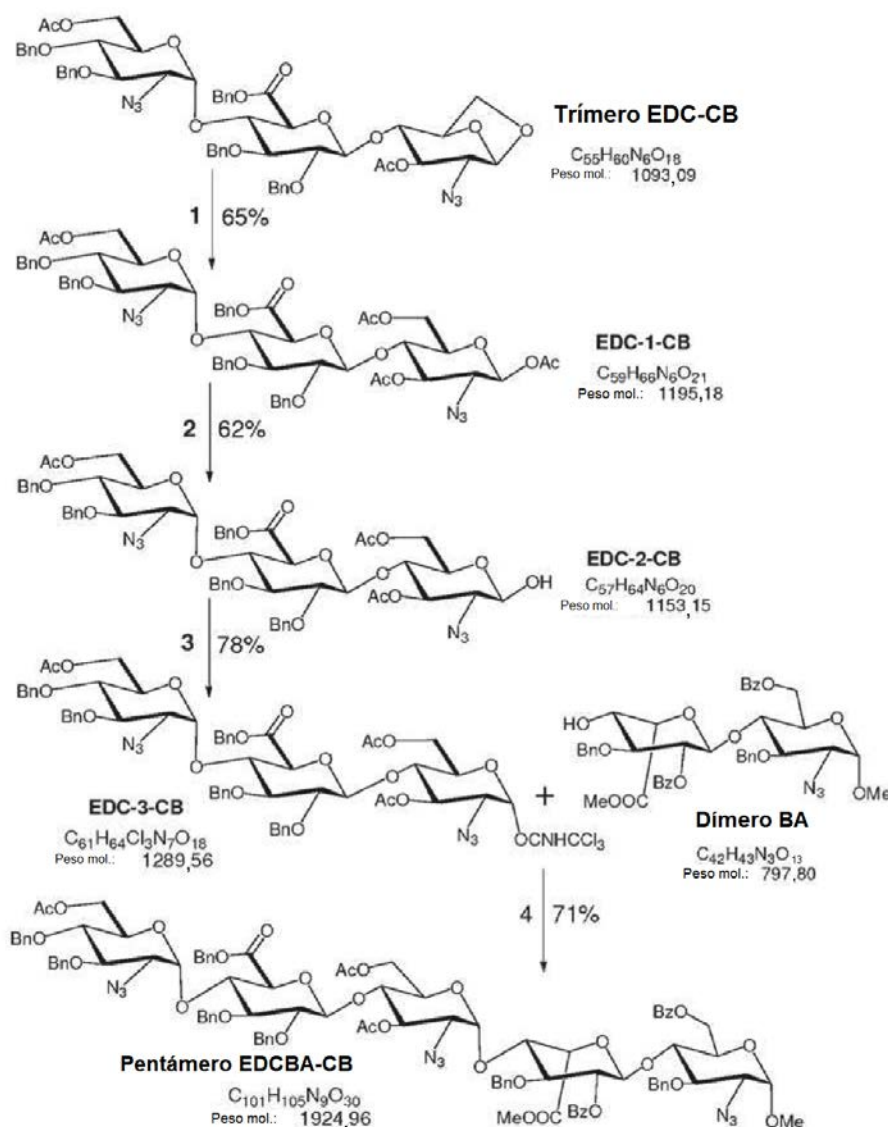
Reactivos: 1. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, Ac_2O , DCM, 0 °C-TA, 3 h; 2. $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{Ac}$, DMF, TA, 3 h; 3. TCA, DBU, DCM, TA, 2 h; 4. DCBB (1 eq), E-Mod 3 (3,0 eq), TES-OTf, -40 °C, 2 h;

Se preparó el monómero E para el acoplamiento por apertura del resto anhidro con $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ seguido de acetilación de los grupos hidroxilo resultantes dando el diacetato EMod1. Esto se produce mediante la adición de monómero E con trifluoruro de boro-eterato, anhídrido acético y diclorometano a -10 °C, y dejando que la reacción se caliente a temperatura ambiente con agitación durante 3 horas. El C1-acetato de EMod1 se hidroliza entonces dando el alcohol, EMod2. Esto se produce haciendo reaccionar Emod1 con acetato de hidracina y dimetilformamida y mezclando a temperatura ambiente durante 3 horas. El C1-hidroxilo de Emod2 se hace reaccionar entonces con tricloroacetnitrilo dando el derivado de tricloroacetamido (TCA) EMod3 adecuado para el acoplamiento, reacción que también emplea diazabicicoundecano y diclorometano y mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. El elemento estructural de DC [DCBB], que tiene un grupo C4-hidroxilo libre en el anillo 'D', se acopló entonces con el derivado de TCA EMod3 en presencia de triflato de trietilsililo dando el trisacárido trímero EDC-CB

Síntesis del pentámero EDCBA

Se preparó el pentámero EDCBA usando el siguiente procedimiento:

Preparación del pentámero completamente protegido:



Reactivos: **1.** $BF_3 \cdot Et_2O$ (0,8 eq), Ac_2O , DCM, $-10^\circ C$ a TA, 6 h; **2.** $BnNH_2$ (6 eq), THF, $-10^\circ C$, 4 h; **3.** TCA (20 eq), DBU (0,5 eq), TA, 2 h; **4.** TES-Tf (0,5 eq), $-30^\circ C$, 2 h;

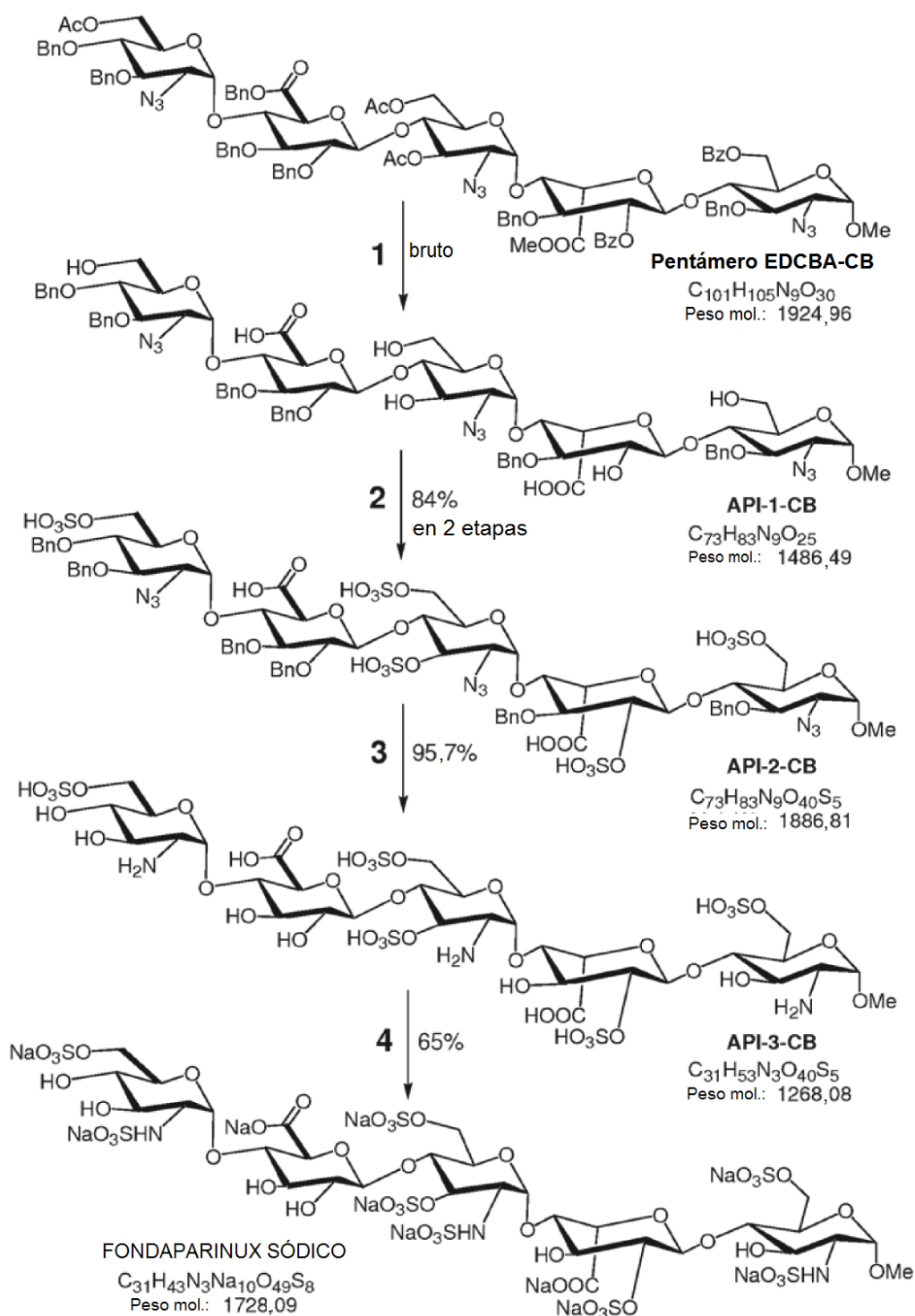
La preparación de pentámero EDCBA-CB se lleva a cabo del siguiente modo. Se prepara el trímero EDC-CB, un producto intermedio de diacetato, para la reacción de acoplamiento con el dímero BA abriendo inicialmente el resto anhidro y acetilación de los grupos hidroxilo resultantes dando el derivado de tetraacetato EDC1-CB. Esto se produce haciendo reaccionar el trímero EDC con trifluoruro de boro-eterato, anhídrido acético y diclorometano, y agitación entre $-10^\circ C$ y temperatura ambiente durante 6 horas. El C1-acetato de EDC1-CB se hidroliza entonces dando el alcohol, EDC2-CB, haciendo reaccionar EDC1-CB con bencilamina [$BnNH_2$] y tetrahidrofurano y mezclando a $-10^\circ C$ durante 4 horas. El C1-hidroxilo de EDC2-CB se hace reaccionar entonces con tricloroacetnitrilo y diazabicycloundecano, con mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas, dando el derivado de tricloroacetamidato (TCA) EDC3-CB adecuado para el acoplamiento.

El dímero BA, que tiene el grupo C4-hidroxilo libre, se acopla con el trisacárido EDC3-CB en presencia de trietilsililtriflato a $-40^\circ C$ mezclando durante 2 horas dando el pentasacárido pentámero EDCBA-CB.

Síntesis de fondaparinux

Se preparó fondaparinux usando el siguiente procedimiento:

Conversión de FPP (también denominado un pentámero completamente protegido) en fondaparinux sódico:



Reactivos: **1.** NaOH, H_2O_2 , LiOH, dioxano, TA, 24-48 h; **2.** $PI.SO_3$, DMF, 60 °C, 2 h, purificación en CG-161; **3.** 10 % de Pd/C, H_2 , 72 h; **4.** (a) $PI.SO_3$, NaOH, NH_4OAc , 12 h, (b) intercambio iónico de $NH_4OAc/NaCl$ HiQ, desalación en Sephadex y (c) intercambio iónico de NaCl HiQ, desalación en Sephadex

Se hidrolizaron los restos de éster en el pentámero EDCBA-CB con hidróxido de sodio y de litio en presencia de peróxido de hidrógeno en dioxano mezclando a temperatura ambiente durante 24-48 horas dando el producto intermedio de pentasacárido API1-CB. Los cinco restos hidroxilo en API1-CB se sulfataron usando un complejo de piridina-trióxido de azufre en dimetilformamida, mezclando a 60 °C durante 2 horas y luego se purificaron usando cromatografía en columna (CG-161), dando el pentasacárido API2-CB pentasulfatado. El producto intermedio API2-CB se hidrogenó entonces para reducir las tres azidas en los azúcares E, C y A a aminas y la desprotección reductora de los seis bencil éteres a sus grupos hidroxilo correspondientes para formar el producto intermedio API3-

CB. Esta transformación se produce haciendo reaccionar API2-CB con catalizador de 10 % de paladio/carbono con gas hidrógeno durante 72 horas. Las tres aminas en API3-CB se sulfataron entonces usando el complejo de piridina-trióxido de azufre en hidróxido sódico y acetato de amonio, permitiendo que la reacción avanzara durante 12 horas. El fondaparinux en bruto se purifica y posteriormente se convierte en su forma de sal. La mezcla en bruto se purificó usando una columna cromatográfica de intercambio iónico (resina HiQ), seguido de desalación usando una resina de exclusión de tamaño o filtración en gel (Biorad Sephadex G25) dando el producto final, fondaparinux sódico.

Síntesis del monómero A2

Etapa 1: Formación de IntA1 por desacetilación de tri-O-acetil-D-glucal

Se disuelve el tri-O-acetil-D-glucal [SM-A] (100 g, 367 mmoles) en MeOH seco [1,5 l], y entonces se añade NaOMe (110 mmoles, 5,95 g) a la mezcla de reacción. En el plazo de aproximadamente 20 minutos, la CCF (40 % de EtOAc/60 % de hexanos y 100 % de EtOAc) confirmó el glucal desacetilado. La reacción se inactiva con la resina de catión intercambio 50WX4 hasta que el pH sea próximo a 7,0 por papel en tiras de pH. La mezcla se filtra y se evapora a sequedad a vacío dando el producto intermedio de glucal como jarabe IntA1 (59 g). Rendimiento teórico = $100 \text{ g} \times (146/272) = 53,7 \text{ g}$. CCF R_f de IntA1 = 0,1, SiO₂, 100 % de acetato de etilo

Etapa 2 y 3: Conversión en 1,6-anhidro-2-desoxi-2-yodo-β-D-glucopiranososa [IntA2]

Se trata el D-glucal como jarabe desacetilado IntA1 de la etapa 1 (53,7 g, basado en rendimiento cuantitativo, 367 mmoles) con óxido de bis(tributilestaño) (175 g, 150 ml, 294 mmoles, 0,8 eq) y tamices moleculares de 3A en polvo activados [150 g] en acetonitrilo seco a reflujo [3,5 l] durante 16 horas. A la mañana siguiente, la mezcla se enfría a 5 °C bajo N₂ y se añade I₂ [140 g, 551 mmoles] en una porción. La mezcla marrón oscura se agita durante 15 minutos a 5 °C, luego durante 3 horas a temperatura ambiente. La CCF (tanto 1/1:tolueno/acetona como 100 % de EtOAc) mostró la conversión completa de D-glucal (R_f 0,14) en derivado de yodo (R_f 0,45). La mezcla se filtró a través de Celite y se concentró. A este residuo se añade tiosulfato de sodio acuoso saturado (200 ml) y hexanos (200 ml). La mezcla bifásica se mezcla vigorosamente durante 16 horas. La fase acuosa se extrae entonces continuamente con DCM (1,5 l) durante 24 horas (hasta que no se detectó producto en la fase acuosa). El extracto orgánico se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra. Al residuo se añadieron 500 ml de acetona. El material insoluble amarillo se filtró y se desechó. La solución de acetona se evaporó a sequedad. El residuo se trató con EtOAc para separar el derivado de yodo-1,6-anhidro, IntA2, como un sólido blanco. Rendimiento: 76 g. CCF R_f de IntA2 = 0,7, SiO₂, 100 % de acetato de etilo.

Etapa 4: Conversión en 1,6:2,3-bisanhidro-4-O-p-metoxibencil-β-D-glucopiranososa [IntA3]

Se co-evaporó dos veces el derivado de yodo, IntA2 (152 g, 279 mmoles) de la etapa previa usando acetonitrilo seco [¿volumen?], se disolvió en DMF (2 l) y se enfrió a -20 °C en baño de hielo seco. Se añade cloruro de 4-metoxibencilo [94 ml, 698 mmoles, 2,5 eq.] y NaH (60 % en aceite mineral) [22,4 g, 559 mmoles, 2,0 eq.] y la mezcla de reacción se agita durante 2 horas (-20 °C hasta temperatura ambiente). La CCF (20 % de EtOAc/80 % de hexanos) confirmó la conversión completa del material de partida en epóxido y algo de epóxido no bencilado (<10 %). La reacción se extinguió vertiendo la mezcla en 2000 g de hielo picado. La mezcla se diluye con 2 l de THF y 4 l de EtOAc. La fase acuosa se extrae cuatro veces con EtOAc. La fase orgánica combinada se lava con NaCl acuoso saturado (2 l), se seca con Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se elimina a vacío. La cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (hexanos:EtOAc/6:4) proporcionó 143 g del epóxido deseado, IntA3. CCF R_f de IntA3 = 0,8, SiO₂, 100 % de acetato de etilo; R_f de IntA2 = 0,7, SiO₂, 100 % de acetato de etilo.

Etapa 5: Conversión en 1,6-anhidro-2-azido-4-O-p-metoxibencil-2-desoxi-β-D-glucopiranososa [IntA4]

Se disuelve el derivado de epóxido, IntA3 [142 g, 537 mmoles] en DMF [5,68 l] y agua [625 ml]. Entonces se añade azida de sodio [210 g, 3224 mmoles, 6 eq.]. La mezcla se calienta a 120 °C durante 12 horas, se enfría hasta temperatura ambiente y se vierte en una mezcla de agua y EtOAc. La fase acuosa se extrae cuatro veces con acetato de etilo y las fases orgánicas combinadas se lavan con salmuera y se secan sobre sulfato de sodio, se filtran y se concentran. El producto en bruto se purifica por gel de sílice dando 124 g de derivado de azúcar de azida puro, IntA4. CCF R_f de IntA4 = 0,6, SiO₂, 50 % de acetato de etilo y 50 % de hexanos; R_f de IntA3 = 0,7, SiO₂, 50 % de acetato de etilo y 50 % de hexanos.

Etapa 6: Conversión en 1,6-anhidro-2-azido-3-bencil-4-O-p-metoxibencil-2-desoxi-β-D-glucopiranososa [Monómero A2]

Se disuelve el derivado de azido-PMB-azúcar IntA4 [2,865 g, 9,32 mmoles] en DMF seca [30 ml] y se enfría a 0 °C. Se añade hidruro de sodio (60 % en aceite mineral) [0,45 g, 11,2 mmoles, 1,2 eq.] en una porción, seguido de bromuro de bencilo [1,33 ml, 11,2 mmoles, 1,2 eq.] gota a gota. La mezcla se agita a 0 °C hasta que se acabó toda la adición, entonces se dejó calentar a temperatura ambiente. La CCF (30 % de EtOAc / 70 % de hexanos) mostró la conversión completa de S.M en el producto deseado en una hora (R_f de 0,2 a 0,7). Después de una hora la mezcla de reacción se vierte en hielo/agua. Entonces se diluye con DCM y NH₄Cl acuoso saturado. La fase acuosa se retro-

extrae con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavan con NH_4Cl acuoso saturado, salmuera y agua, se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se evaporan dando el residuo aceitoso. El residuo se somete a cromatografía en gel de sílice dando el derivado de biséter puro, el monómero A2 con un rendimiento del 90 %. CCF R_f de monómero A2 = 0,7, SiO_2 , 30 % de acetato de etilo y 70 % de hexanos; R_f de IntA4 = 0,2, SiO_2 , 30 % de acetato de etilo y 70 % de hexanos

La conversión del monómero A2 en AMod5, etapas 7 a 10, se informa en la sección que detalla la preparación del dímero BA.

Síntesis del monómero B1

Etapas 1. Preparación de 3-O-bencil-diacetonaglucosa [IntB1]

Se enfriaron 35 ml de THF en un baño de hielo/metanol. También se ajustaron un condensador, embudo de adición a presión y tabique al matraz. El sistema se purgó con nitrógeno seco mientras que se enfriaba. Se añadió lentamente hidruro de sodio (60 % en aceite mineral) [5,769 g, 144,23 mmoles] a este matraz. La diacetona glucosa [SM-B, 30 g, 115,38 mmoles] se disolvió en una mezcla 1 a 1 de DMF [172,5 ml] y THF [172,5 ml]. Ésta se cargó en el embudo de adición a presión y se añadió lentamente gota a gota en el hidruro de sodio durante 20 minutos. Una vez se había añadido toda la diacetona glucosa, la mezcla se agitó durante 20 minutos antes de la adición de bromuro de bencilo [17,27 ml, 144,23 mmoles]. Con todo el bromuro de bencilo añadido la solución se sacó del baño de hielo y se calentó lentamente a reflujo (65 °C). El progreso de la reacción se comprobó por CCF (20 % de EtOAc/hexanos). Tras completarse la reacción se inactivó vertiendo el contenido sobre hielo y añadiendo 100 ml de H_2O y 100 ml de cloruro de amonio saturado. Se añadieron 350 ml de acetato de etilo y la mezcla se separó. La fase acuosa se re-extrajo con 125 ml de EtOAc y una vez con 100 ml de 1:1 de EtOAc/THF. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron en rotavapor dando un jarabe amarillo. El material en bruto se usó en la siguiente etapa. Rendimiento: se supuso cuantitativo. CCF de IntB1 - R_f = 0,45 en tampón de elución: 20 % de acetato de etilo y 80 % de hexanos

Etapas 2. Hidrólisis selectiva de 5,6-isopropilideno [IntB2]

Se disolvió el material en bruto (suponiendo rendimiento cuantitativo) de la etapa una en 66 % de ácido acético [112,5 ml] / agua [62,5 ml] y se calentó a 40 °C durante la noche. A la mañana siguiente se comprobó la CCF usando 30 % de EtOAc/hexanos y la reacción se extinguió por la cuidadosa adición de carbonato de potasio saturado (~250 ml) hasta que el pH de la solución alcanzó 7. La solución se diluyó con agua y se transfirió a un embudo de decantación. Ésta se extrajo tres veces con DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavaron dos veces con salmuera antes de secarse sobre sulfato de sodio. Ésta se filtró y se evaporó en rotavapor antes de re-disolverse en una cantidad mínima de DCM para cromatografía en gel de sílice. Se usaron 2 l de sílice y se eluyeron con 2 l de 30 %, 3 l de 40 %, 3 l de 50 %, 1 l de 60 % y 2 l de 65 % de EtOAc/hexanos. Rendimiento del 88,5 % en dos etapas, 1. CCF de IntB2 - R_f = 0,16 en tampón de elución: 30 % de acetato de etilo y 70 % de hexanos

Etapas 3: Escisión oxidativa de 5,6-hidroxi por peryodato de sodio en 3-O-bencil-5,6-dihidroxi-1,2-isopropilidenglucofuranosa [IntB3]

Se dispuso el azúcar de partida de 5,6-hidroxi [IntB2, 31,2 g, 100,61 mmoles] en un matraz y se disolvió en DCM [375 ml]. A éste se añadieron 375 ml de agua y bromuro de tetrabutylamonio [3,24 g, 10,06 mmoles]. La mezcla se cubrió con lámina de aluminio para excluir tanta luz como fuera posible de ella con el fin de prevenir la descomposición del peryodato. Se pesó el peryodato de sodio [25,82 g, 120,7 mmoles] y se añadió a la mezcla en tres porciones. Una vez se completó la adición, se dejó que el matraz se calentara lentamente hasta temperatura ambiente. El progreso de la reacción se comprobó por CCF (40 % de EtOAc/hexanos). Una vez se completó la reacción se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo. La fase acuosa se re-extrajo con 3X200 ml de DCM. Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron dos veces con 150 ml de H_2O y una vez con 200 ml de salmuera. La cromatografía en gel de sílice dio el producto puro. Rendimiento: 87,7 %. CCF de IntB3 - R_f = 0,55 en tampón de elución: 40 % de acetato de etilo y 60 % de hexanos.

Etapas 4: Conversión en tio-orto éster configurado por L-idosa [IntB4]

Se secó todo el material de vidrio en un horno durante la noche para garantizar que estuviera seco. A un matraz secado se añadió tris(fenilitio) metano [54,62 g, 160,4 mmoles, 1,8 eq.] y THF seco (125 ml). Éste se enfrió entonces en un baño de nieve carbónica/ acetona a -78 °C. Una vez a -78 °C, se añadió el n-butil-litio (1,6 M en hexanos, 100 ml, 160,4 mmoles, 1,8 eq.) gota a gota. La solución amarilla brillante se dejó calentar a -50 °C durante una hora y luego se enfrió a -78 °C durante 30 minutos antes de la adición del bruto de la etapa tres.

El material en bruto IntB3 (24,8 g, 89,11 mmoles) de la etapa 3 se disolvió en 125 ml de THF seco y se cargó en un embudo de adición a presión. Éste se añadió gota a gota, mientras que se mantenía a -78 °C, durante los 15 minutos siguientes. La reacción se agitó durante una hora adicional a -78 °C antes de dejar que se calentara a temperatura ambiente. Éste se inactivó con una solución de cloruro de amonio saturado (660 ml). La solución se

transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se re-extrajo tres veces con 100 ml de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El material en bruto se usó en la siguiente etapa. Rendimiento: 90 %. CCF de IntB4 - R_f = 0,70 en tampón de elución: 40 % de acetato de etilo y 60 % de hexanos.

Etapas 5: 3-O-bencil-1,2-isopropiliden- α -L-idofuranuronato de metilo [IntB5]

Se dispuso en un matraz cloruro de cobre (II) (43,51 g, 323,62 mmoles) y óxido de cobre (II) (10,94 g, 137,54 mmoles) junto con metanol (600 ml) y agua (50 ml) en una relación 12 a 1. Se disolvió el IntB4 en bruto (50 g, 80,9 mmoles) de la etapa 4 en una cantidad mínima de DCM y se añadió lentamente a la mezcla. La reacción se agitó hasta que se completó como se indica por CCF (40 % de EtOAc/hexanos). Una vez se completó la reacción, se pasó a través de un lecho de Supercel [agente de filtración] para eliminar el óxido de cobre (II). La mezcla de reacción se concentró entonces a presión reducida y el producto blanco verdoso se extrajo con EtOAc y H_2O . La fase acuosa se re-extrajo con 2X150 ml de EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 2X100 ml de H_2O y 2X100 de salmuera antes de secarse sobre sulfato de sodio. La purificación por cromatografía en gel de sílice dio el producto puro (2 l de sílice y se eluyó con 2 l de cada uno de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 % de EtOAc/hexanos) como un aceite amarillo claro. Rendimiento: 80 %. CCF de IntB5 - R_f = 0,3 en tampón de elución: 40 % de acetato de etilo y 60 % de hexanos.

Etapas 6: Escisión del 1,2-isopropilideno en 3-O-bencil-1,2-isopropiliden- α -L-idofuranuronato [IntB6]

Se disolvió el material de partida IntB5 (22 g, 65 mmoles) en una cantidad mínima de DCM. A ésta se añadió 90 % de TFA/agua (200 ml) y se agitó a temperatura ambiente. La reacción se comprobó por CCF (30 % de EtOAc/hexanos para el material de partida y 60 % de EtOAc/hexanos para el producto) y se encontró que estaba completa después de 30 min. Entonces ésta se diluyó con tolueno y se evaporó en rotavapor a casi sequedad. Se co-evaporó con tolueno 3X40 ml. La cromatografía en gel de sílice (2 l de sílice y se eluyó con 2 l de 30 %, 40 %, 50 %, 60 % de EtOAc/hexanos) proporcionó el producto como un sólido de blanco a blanquecino. El rendimiento del producto deseado en la mezcla fue del 55 %. CCF de IntB6 - R_f = 0,25 en tampón de elución: 60 % de acetato de etilo y 40 % de hexanos

Etapas 7: 3-O-Bencil-1,2-isopropiliden- α -D-glucopirranuronato de metilo [Monómero B1]

Se disolvió el derivado de azúcar IntB6 (230 g, 0,8 moles, 1 eq.) en 1 l de DMF en un matraz redondo de tres bocas dotado de agitación magnética. Se tapó la boca central. Las otras dos bocas se dotaron de una sonda de temperatura y controlador y un embudo de adición a presión. La mezcla de reacción se enfrió a cero en un baño de hielo/agua/sal. Se añadió 2-metoxipropeno (766,11 ml, 8 moles, 10 eq.) cuando la mezcla estuvo a aproximadamente 4-5 °C. Entonces ésta se agitó hasta que se alcanzó una temperatura de cero. Se disolvió el CSA (18,58 g, 0,08 moles, 0,1 eq.) en 125 ml de DMF y se cargó en un embudo de goteo. Con la temperatura a cero empezó la adición gota a gota lenta de CSA. Cuando se observó que la temperatura ascendía, y continuaba aumentando rápidamente, se detuvo la adición y se dejó que el sistema se enfriara a cero otra vez. Después de la exotermia inicial se encontró que el CSA adicional no causó que la mezcla se calentara. Con todo el CSA añadido, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente. A medida que se calienta la reacción, el color de la reacción avanza para volverse muy oscuro. El progreso de la reacción fue seguido de CCF (40 % de E-H), se encontró que el producto iba más alto. Una vez se completó la reacción, se añadieron 800 ml de metanol y se agitó durante una hora antes de que la reacción se inactivara con 200 ml de TEA. Cuando se añadió TEA la mezcla llegó a ser de color mucho más claro. La mezcla de reacción se evaporó para eliminar el exceso de metanol antes de la extracción. La extracción se hizo usando EtOAc/ H_2O . La fase orgánica se lavó 2X con agua. La fase acuosa se lavó una vez con EtOAc. La fase orgánica combinada se lavó una vez con salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. El sulfato de sodio se filtró antes de la concentración a presión reducida en la preparación para una columna de sílice. La columna de sílice se hizo en 15 l de sílice (10 % de E-H). El producto se eluyó con 20 l de cada uno: 10 %, 15 %, 20 % y 40 l de 30 % seguido de 20 l de 40 %. La piranosa se separó de la furanosa. Las fracciones puras se reunieron y se concentraron. CCF de monómero B1 - R_f = 0,40 en tampón de elución: 60 % de acetato de etilo y 40 % de hexanos

La conversión del monómero B1 en BMod6, etapas 8 a 13, se informa en la sección que detalla la preparación del dímero BA.

Conversión de anhidrocelobiosa [ACB] en el elemento estructural de DC [DC BB]

Etapas 1 Preparación de benciliden-anhidro-celobiosa (CB1) - Formación de bencilideno

A una suspensión de 800 gramos (2468,30 mmoles, 1 eq) de 1,6-anhidro- β -D-celobiosa (ACB) comercialmente disponible en 12 litros de acetonitrilo se añadieron 57,33 gramos (246,83 mmoles, 0,1 eq) de ácido canforsulfónico (CSA). Entonces se añadieron gota a gota 481,38 ml (3208,79 mmoles, 1,3 eq) de benzaldehído dimetilacetil y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2 horas. La suspensión blanca llegó a ser una solución transparente después de 30 minutos de reacción. La CCF (20 % de metanol/acetato de etilo) indicó que la reacción se había

completado. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a vacío usando un evaporador rotatorio. El residuo (~570 g) de CB1 se usó para la etapa 2 sin más purificación.

Etapas: 2 Preparación de tosil-anhidro-celobiosa (CB2): Tosilación

Se disolvió el producto de la etapa 1 benciliden-anhidro-celobiosa (CB1) en bruto ~570 gr, (1382,15 mmoles, 1 eq) en 2,5 litros de piridina. Entonces se añadieron 34 gramos (276,44 mmoles) de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) y 789,70 gramos (4146,46 mmoles, 3 eq) de cloruro de *p*-toluenosulfonilo. La mezcla de reacción se agitó durante 6 h bajo una atmósfera de N₂ a temperatura ambiente. La CCF (5 % y 20 % de metanol/acetato de etilo) indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se inactivó en metanol (400 ml) y se concentró a vacío, el residuo se diluyó con acetato de etilo (4 litros) y se lavó con H₂O (2 X 1,5 litros). La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a vacío. El residuo se co-evaporó con tolueno (2 x 1,5 litros) a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 80 % de acetato de etilo / 20 % de heptano a 100 % de acetato de etilo) dando tosil-anhidro-celobiosa (CB2) como una espuma blanca (442,0 gramos, rendimiento del 56,4 % en 2 etapas).

Etapas: 3 Preparación de epóxido-anhidro-celobiosa (CB3) - Formación de epóxido

Se añadió lentamente una solución de 262,82 gramos (2342,14 mmoles, 3 eq) de terc-butóxido de potasio en 1,8 litros de alcohol terc-butílico a una solución de 442,0 gramos (780,72 mmoles, 1 eq) de tosil-anhidro-celobiosa (CB2) disuelta en 5 litros de diclorometano seco a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó y se dejó a reflujo suavemente durante aproximadamente 2 horas bajo una atmósfera de N₂. El análisis de CCF (100 % de acetato de etilo) mostró conversión del material de partida en el producto. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se vertió lentamente en 5 litros de solución saturada de cloruro de amonio y se extrajo con diclorometano (2 X 2,5 litros). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a vacío dando un sólido amarillo (~234 g, 76,06 % de rendimiento del bruto), que se usó para la etapa 4 sin más purificación.

Etapas: 4 Preparación de bencil-epóxido-celobiosa (CB4) - Bencilación.

A una suspensión de 78,30 gramos (1958,0 mmoles, 3,3 eq) de hidruro de sodio (60 % de aceite) en 600 ml de DMF seca a -28 °C se añadió lentamente una solución de 234,0 gramos (593 mmoles, 1 eq) de derivado de epóxido-anhidro (CB3) en 800 ml de DMF seca, manteniendo la temperatura por debajo de -15 °C. Tras completarse la adición, la mezcla se calentó lentamente hasta temperatura ambiente y se añadió una solución de 211,71 ml (1780,0 mmoles, 3 eq) de bromuro de bencilo en 500 ml de DMF seca. Después de agitar la reacción durante 16 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂, el análisis de CCF (40 % de acetato de etilo/60 % de heptano) mostró conversión del material de partida en el producto. La mezcla de reacción se inactivó en hielo y se extrajo con acetato de etilo (2 X 4 litros), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 10 % de acetato de etilo/90 % de heptano) con 5 % de gradiente para proporcionar el producto (CB4) (275,0 g, 80 %).

Etapas: 5 Preparación de azida-anhidro-celobiosa (CB5) - Reacción de azidación.

Se disolvieron 275,0 gramos (478,58 mmoles, 1 eq) de dibencil-epóxido-celobiosa (CB4) en 9,56 litros de DMF, se añadieron 1,06 litros de H₂O y 217,75 gramos (3350,04 mmoles, 7 eq) de azida de sodio. La mezcla de reacción se calentó a reflujo. La CCF (40 % de acetato de etilo/heptano) mostró la completitud de la reacción después de 16 horas. Tras completarse, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (5 litros) y se lavó con agua (1 X 1,5 litros) y se evaporó a vacío. El residuo se co-evaporó con tolueno (3 x 2 litros) a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 30 % de acetato de etilo / 70 % de heptano) para proporcionar el producto (CB5) como un sólido blanco (266,0 gramos, 90 %).

Etapas: 6 Preparación de acetato-anhidro-celobiosa (CB6) - Acetilación

Se disolvieron 266,0 gramos (430,66 mmoles, 1 eq) de azida-anhidro-celobiosa (CB5) en 2 litros de diclorometano seco y se añadieron 78,92 gramos (64,60 mmoles) de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). La solución se enfrió a 0 °C y se añadieron 203,57 ml (2153,32 mmoles, 5 eq) de anhídrido acético. La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 h o hasta que la reacción estaba completa por CCF (40 % de acetato de etilo/heptano). La reacción se inactivó con metanol (1,5 litros), se concentró a vacío y dio 284,0 gramos de producto en bruto de espuma blanca. El producto en bruto de acetato-anhidro-celobiosa (CB6) se usó para la etapa 7 sin más purificación.

Etapas: 7 Preparación del producto intermedio CB7 - Desprotección del resto bencilideno

Se disolvieron 284,0 gramos (430,51 mmoles, 1 eq) de acetato-anhidro-celobiosa (CB6) en 2,16 litros de tetrahidrofurano (THF). La solución se enfrió a 0 °C y se añadieron lentamente 5,68 litros de ácido trifluoroacético (TFA) acuoso al 80 %. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas.

La CCF (60 % de acetato de etilo/heptano) mostró la completitud de la reacción. La mezcla de reacción se enfrió a -5,0 °C y añadiendo 8,2 litros de trietilamina (TEA, 5963,13 gramos, 58,93 moles, 1,0 equiv/TFA) lentamente en la solución hasta que el pH fue 7,0. Durante la adición de TFA mantener la temperatura entre -5,0 °C y 5,0 °C. Entonces el residuo se diluyó con CH₂Cl₂ (3 litros) y se lavó con H₂O (1 X 1,5 litros). La fase orgánica se extrajo con solución al 10 % de bicarbonato sódico (3 X 1,0 litro), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 60 % de acetato de etilo en heptano) como espuma blanca de celobiosa-diol (CB7) (227,0 g, 92,2 %).

Etapas: 8 Preparación de ácido carboxílico - celobiosa (CB8) - Oxidación de 6-hidroxilo

Se disolvieron 227,0 gramos (397,15 mmoles, 1 eq) de celobiosa-diol (CB7) en 12,5 litros de acetonitrilo (ACN) y 8,2 litros de tampón (1:1) de Na₂HPO₄ 0,67 M y NaH₂PO₄ 0,67 M a pH 6,5. La mezcla de reacción se calentó a 35 °C. Entonces se añadieron 62,05 gramos (397,15 mmoles, 1 eq) de reactivo de 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-1-oxilo (TEMPO) y se añadieron 415 ml de solución de NaOCl que contenía 10-13 % de cloro disponible. La mezcla de reacción se agitó a 35 °C hasta que la reacción estaba completa por CCF (5 % de metanol / acetato de etilo). Después de 16 horas la reacción se enfrió a 0 °C, se diluyó con agua (2 litros) y el pH se ajustó a pH 8,5 - 9,0 usando NaOH 1 N (2,5 litros). La mezcla de reacción se vertió entonces en 500 ml de solución de sulfito de sodio fría en hielo (30 gramos en 500 ml de agua). La reacción se extrajo con metil t-butil éter (MTBE) (2 litros) y se desechó la fase orgánica. La fase acuosa se acidificó con HCl 1,0 N (6 litros) a pH 2,5. La reacción se extrajo entonces con diclorometano, se secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó dando un jarabe (212,0 gramos). El producto en bruto de ácido carboxílico-celobiosa (CB8) se usó para la etapa 7 sin más purificación.

Etapas: 9 Preparación de éster bencílico-anhidro-celobiosa (DCBB) - Bencilación de ácido carboxílico

Se disolvieron 212 gramos (362,05 mmoles, 1 eq) de ácido carboxílico-celobiosa (CB8) de la etapa 8 en 3,5 litros de DCM seco y se añadieron 11,05 gramos (90,52 mmoles) de N,N-dimetilaminopiridina (DMAP). Se añadieron lentamente 138,80 gramos (724,09 mmoles, 2 eq) de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 177,90 ml (1810,24 mmoles, 5 eq) de alcohol bencílico y la reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N₂. La CCF (60 % de acetato de etilo/heptano) mostró la completitud de la reacción después de 16 h. El residuo se diluyó con DCM (2,5 litros) y se extrajo con agua (1 X 1,5 ml), seguido de solución saturada de bicarbonato sódico (1 X 1,5 ml) y salmuera (1 X 1,5 ml). La mezcla se secó entonces sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 5 % de acetato de etilo en heptano) y dio 124,0 gramos de producto de éster bencílico-anhidro-celobiosa DCBB (rendimiento del 50 %).

Síntesis del dímero BA - Etapa 1. Preparación de BMod1, levulinación del monómero B1

Se cargó un reactor de 100 l con 7,207 kg del monómero B1 (21,3 moles, 1 equiv), 20 l de tetrahidrofurano (THF) seco y se agitó hasta disolverse. Cuando fue clara, se purgó con nitrógeno y se cargaron 260 g de dimetilaminopiridina (DMAP, 2,13 moles, 0,1 equiv) y 11,05 l de diisopropiletilamina (DIPEA, 8,275 kg, 63,9 moles, 3 equiv) en el reactor. El reactor se enfrió a 10-15 °C y se transfirieron 13,7 kg de anhídrido levulínico (63,9 moles, 3 equiv) al reactor. Cuando la adición se completó, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche o 12-16 horas. La completitud de la reacción se monitorizó por CCF (40:60 de acetato de etilo/hexano) y HPLC. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 20 l de 10 % de ácido cítrico, 10 l de agua y 25 l de acetato de etilo al reactor. La mezcla se agitó durante 30 min y las capas se separaron. La fase orgánica (capa de EtOAc) se extrajo con 20 l de agua, 20 l de 5 % de bicarbonato sódico y 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. La solución de acetato de etilo se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C) y se secó durante la noche. El rendimiento del jarabe aislado de BMod1 fue del 100 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 2. Preparación de BMod2, hidrólisis por TFA de BMod1

Se cargó un reactor de 100 l con 9,296 kg del monómero B1 de 4-Lev (BMod1) (21,3 moles, 1 equiv). El enfriador del reactor se giró a < 5 °C y la agitación empezó, después de lo cual se transfirieron 17,6 l de solución al 90 % de TFA (TFA, 213 moles, 10 equiv) al reactor. Cuando la adición se completó, la reacción se monitorizó por CCF y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 2-3 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, el reactor se enfrió y se transfirieron 26,72 l de trietilamina (TEA, 19,4 kg, 191,7 moles, 0,9 equiv) al reactor. Se transfirieron 20 l de agua y 20 l de acetato de etilo adicionales al reactor. Éste se agitó durante 30 min y las capas se separaron. La fase orgánica se extrajo (capa de EtOAc) con 20 l de 5 % de bicarbonato sódico y 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. La solución de acetato de etilo se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 50:50, 80:20 (EtOAc/heptano), 100 % de EtOAc, 5:95, 10:90 (MeOH/EtOAc). Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron dando un jarabe. El rendimiento del jarabe aislado, BMod2 fue del 90 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 3. Preparación de BMod3, sililación de BMod2

Se cargó un reactor de 100 l con 6,755 kg del monómero B1 de 4-Lev-1,2-DiOH (BMod2) (17,04 moles, 1 equiv), 2328 g de imidazol (34,2 moles, 2 equiv) y 30 l de diclorometano. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a -20 °C, entonces se transfirieron 5,22 l de *tert*-butildifenilcloro-silano (TBDPS-Cl, 5,607 kg, 20,4 moles, 1,2 equiv) al reactor. Cuando se completó la adición, el enfriador se apagó y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por CCF (40 % de acetato de etilo/hexano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 3 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 20 l de agua y 10 l de DCM al reactor y se agitó durante 30 min, después de lo cual se separaron las capas. La fase orgánica (capa de DCM) se extrajo con 20 l de agua y 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. Se secó la solución de diclorometano en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El rendimiento de BMod3 fue aproximadamente del 80 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 4. Preparación de BMod4, benzoilación

Se cargó un reactor de 100 l con 8,113 kg del monómero B1 de 4-Lev-1-Si-2-OH (BMod3) (12,78 moles, 1 equiv), 9 l de piridina y 30 l de diclorometano. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a -20 °C, después de lo cual se transfirieron 1,78 l de cloruro de benzoilo (2155 g, 15,34 moles, 1,2 equiv) al reactor. Cuando se completó la adición, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por CCF (40 % de acetato de etilo/heptano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 3 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 20 l de agua y 10 l de DCM al reactor y se agitó durante 30 min, después de lo cual las capas se separaron. La fase orgánica (capa de DCM) se extrajo con 20 l de agua y 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. La solución de DCM se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El jarabe aislado BMod4 se obtuvo con un rendimiento del 91 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 5. Preparación de BMod5, desililación

Se cargó un reactor de 100 l con 8,601 kg del monómero B1 de 4-Lev-1-Si-2-Bz (BMod4) (11,64 moles, 1 equiv) en 30 l de tetrahidrofurano. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a 0 °C, después de lo cual se transfirieron 5,49 kg de fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF, 17,4 moles, 1,5 equiv) y 996 ml (1045 g, 17,4 moles, 1,5 equiv) de ácido acético glacial al reactor. Cuando se completó la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por CCF (40:60 de acetato de etilo/hexano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 6 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 20 l de agua y 10 l de DCM al reactor y se agitó durante 30 min, después de lo cual se separaron las capas. La fase orgánica (capa de DCM) se extrajo con 20 l de agua y 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. La solución de diclorometano se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 (EtOAc/heptano) y 200 l de 100 % de EtOAc. Se reunieron las fracciones puras y se evaporaron dando un jarabe. El producto intermedio BMod5 se aisló como un jarabe con un rendimiento del 91 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 6: Preparación de BMod6, formación de TCA

Se cargó un reactor de 100 l con 5,238 kg del monómero B1 de 4-Lev-1-OH-2-Bz (BMod5) (10,44 moles, 1 equiv) en 30 l de DCM. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a 10-15 °C, después de lo cual se transfirieron 780 ml de diazabicycloundeceno (DBU, 795 g, 5,22 moles, 0,5 equiv) y 10,47 l de tricloroacetnitrilo (TCA, 15,08 kg, 104,4 moles, 10 equiv) al reactor. La agitación continuó y la reacción se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno. Después de la adición de reactivo, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por HPLC y CCF (40:60 de acetato de etilo/heptano). La reacción necesitó aproximadamente 2 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 20 l de agua y 10 l de diclorometano al reactor. Éste se agitó durante 30 min y se separaron las capas. La fase orgánica (capa de DCM) se separó con 20 l de agua y 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. La solución de diclorometano se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 (EtOAc/heptano). Se reunieron las fracciones puras y se evaporaron dando un jarabe. El rendimiento aislado de BMod6 fue del 73 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 7. Preparación de AMod1, acetilación del monómero A2

Se cargó un reactor de 100 l con 6,772 kg del monómero A2 (17,04 moles, 1 eq.), 32,2 l (34,8 kg, 340,8 moles, 20 eq.) de anhídrido acético y 32 l de diclorometano. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a -20 °C. Cuando la temperatura alcanzó -20 °C, se transfirieron 3,24 l (3,63 kg, 25,68 moles, 1,5 equiv) de trifluoruro de boro-eterato (BF₃.Et₂O) al reactor. Después de la adición completa de trifluoruro de boro-eterato, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La completitud de la reacción se monitorizó por HPLC y CCF (30:70 de acetato de etilo/heptano). La reacción necesitó aproximadamente 3-5 horas para completarse. Cuando la reacción se completó, se realizó extracción con 3x15 l de 10 % de bicarbonato sódico y 20 l de agua. La fase orgánica (DCM) se evaporó

dando un jarabe (temp. del baño 40 °C) y se dejó secar durante la noche. El jarabe se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 5:95, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 (EtOAc/heptano). Se reunieron las fracciones puras y se evaporaron dando un jarabe. El rendimiento aislado de AMod1 fue del 83 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 8. Preparación de AMod3, 1-metilación de AMod1

Se cargó un reactor de 100 l con 5891 g de monómero A2 de acetilo (AMod1) (13,98 moles, 1 eq.) en 32 l de diclorometano. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a 0 °C, después de lo cual se transfirieron 2598 ml de yoduro de trimetilsililo (TMSI, 3636 g, 18 moles, 1,3 equiv) al reactor. Cuando se completó la adición, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La completitud de la reacción se monitorizó por HPLC y CCF (30:70 de acetato de etilo/heptano). La reacción necesitó aproximadamente 2-4 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, la mezcla se diluyó con 20 l de tolueno. La solución se evaporó dando un jarabe y se co-evaporó con 3 x 6 l de tolueno. El reactor se cargó con 36 l de diclorometano (DCM), 3,2 kg de tamices moleculares de 4A secos, 15505 g (42 moles, 3 equiv) de yoduro de tetrabutilamonio (TBAI) y 9 l de metanol seco. Ésta se agitó hasta que el TBAI se disolvió completamente, después de lo cual se transfirieron 3630 ml de diisopropil-etilamina (DIPEA, 2712 g, 21 moles, 1,5 equiv) al reactor en una porción. La completitud de la reacción se monitorizó por HPLC y CCF (30:70 de acetato de etilo/heptano). La reacción necesitó aproximadamente 16 horas para completarse. Cuando la reacción se completó, los tamices moleculares se eliminaron por filtración. Se añadieron 20 l de EtOAc y se extrajeron con 4x20 l de 25 % de tiosulfato de sodio y 20 l de soluciones al 10 % de NaCl. La fase orgánica se separó y se secó con 8-12 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 5:95, 10:90, 20:80, 30:70 y 40:60 (EtOAc/heptano). Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron dando el producto intermedio AMod3 como un jarabe. El rendimiento aislado fue del 75 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 9. Preparación de AMod4, desacetilación de AMod3

Se cargó un reactor de 100 l con 4128 g del monómero A2 de 1-metil-4,6-diacetilo (AMod3) (10,5 moles, 1 equiv) y 18 l de metanol seco y se disolvió, después de lo cual se transfirieron 113,4 g (2,1 moles, 0,2 equiv) de metóxido de sodio al reactor. La reacción se agitó a temperatura ambiente y se monitorizó por CCF (40 % de acetato de etilo/hexano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 2-4 horas para completarse. Cuando la reacción se completó, se añadió la resina catiónica Dowex 50W x 8 en porciones pequeñas hasta que el pH alcanzó 6-8. Se filtró la resina Dowex 50W x 8 y la solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El jarabe se diluyó con 10 l de acetato de etilo y se extrajo con 20 l de salmuera y 20 l de agua. La solución de acetato de etilo se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C) y se secó durante la noche a la misma temperatura. El rendimiento aislado del jarabe AMod4 fue aproximadamente del 88 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 10. Preparación de AMod5, 6-benzoilación

Se cargó un reactor de 100 l con 2858 g del monómero A2 de metil-4,6-diOH (AMod4) (9,24 moles, 1 equiv) y se co-evaporó con 3 x 10 l de piridina. Cuando se completó la evaporación, se transfirieron 15 l de diclorometano, 6 l de piridina al reactor y se disolvieron. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a -40 °C. El reactor se cargó con 1044 ml (1299 g, 9,24 moles, 1 equiv) de cloruro de benzoilo. Cuando se completó la adición, la reacción se dejó calentar a -10 °C durante un periodo de 2 horas. La reacción se monitorizó por CCF (60 % de acetato de etilo/hexano). Cuando la reacción se completó, la solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). Éste se co-evaporó con 3x15 l de tolueno. El jarabe se diluyó con 40 l de acetato de etilo. La extracción se llevó a cabo con 20 l de agua y 20 l de solución de salmuera. La solución de acetato de etilo se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 5:95, 10:90, 20:80, 25:70 y 30:60 (EtOAc/heptano). Las fracciones puras se reunieron y se evaporaron dando un jarabe. El rendimiento aislado del producto intermedio AMod5 fue del 84 %.

Etapa 11: Cristalización de AMod5.

Se disolvió el sólido en bruto (10 gramos) de AMod5 en 500 ml de heptano a 50 - 60 °C. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 16 horas a esta temperatura. El cristal blanco resultante se aisló por filtración dando 9,10 gramos (92 %).

Síntesis del dímero BA - Etapa 11. Preparación de BA1, acoplamiento de AMod5 con BMod6

Se cargó un reactor de 100 l con 3054 g del monómero A2 de metil-4-hidroxi- (AMod5) de la etapa 10 (7,38 moles, 1 equiv) y 4764 g del monómero B1 de 4-Lev-1-TCA- (BMod6) de la etapa 6 (7,38 moles, 1 equiv). Los monómeros combinados se disolvieron en 20 l de tolueno y se co-evaporaron a 40 °C. La co-evaporación se repitió con 2 x 20 l de tolueno adicionales, después de lo cual se transfirieron 30 l de diclorometano (DCM) al reactor y se disolvieron. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió por debajo de -20 °C. Cuando la temperatura estuvo entre -20 °C y -40 °C,

se transfirieron 1572 g (1404 ml, 11,12 moles, 1,5 equiv) de trifluoruro de boro-eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) al reactor. Después de la adición completa de trifluoruro de boro-eterato, la reacción se dejó calentar a 0 °C y la agitación continuó. La completitud de la reacción se monitorizó por HPLC y CCF (40:70 de acetato de etilo/heptano). La reacción requirió 3-4 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 926 ml (672 g, 6,64 moles, 0,9 equiv) de trietilamina (TEA) a la mezcla y se agitó durante 30 minutos adicionales, después de lo cual se transfirieron 20 l de agua y 10 l de diclorometano al reactor. La solución se agitó durante 30 min y las capas se separaron. La fase orgánica (capa de DCM) se separó con 2 x 20 l de agua y 20 l de solución al 25 % de 4:1 de cloruro sódico/bicarbonato sódico. La solución de diclorometano se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C) y se usó en la siguiente etapa. El rendimiento aislado del disacárido BA1 fue aproximadamente del 72 %.

Síntesis del dímero BA - Etapa 12, eliminación de levulinato ([*(2-O-benzoil-3-O-bencil- α -l-idopiranosiluronato de metilo)-(1 $\rightarrow$ 4)-2-azido-6-O-benzoil-3-O-bencil]-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de metilo)*])

Se cargó un reactor de 100 l con 4,104 kg del dímero BA de 4-Lev (BA1) (4,56 moles, 1 equiv) en 20 l de THF. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a -20 a -25 °C, después de lo cual se transfirieron 896 ml de hidrato de hidracina (923 g, 18,24 moles, 4 equiv) al reactor. La agitación continuó y la reacción se monitorizó por CCF (40 % de acetato de etilo/heptano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 2-3 horas para la completitud, después de lo cual se transfirieron 20 l de 10 % de ácido cítrico, 10 l de agua y 25 l de acetato de etilo al reactor. Ésta se agitó durante 30 min y las capas se separaron. La fase orgánica (capa de EtOAc) se extrajo con 20 l de soluciones al 25 % de salmuera. La solución de acetato de etilo se secó en 4-6 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 10:90, 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 (EtOAc/heptano). Se reunieron las fracciones puras y se evaporaron a sequedad. El rendimiento aislado del dímero BA fue del 82 %. Fórmula: $\text{C}_{42}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_{13}$; Peso mol. 797,80.

Síntesis del trímero EDC - Etapa 1. Preparación de EMod1, acetilación

Se cargó un reactor de 100 l con 16533 g del monómero E (45 moles, 1 eq.), 21,25 l de anhídrido acético (225 moles, 5 eq.) y 60 l de diclorometano. El reactor se purgó con nitrógeno y se enfrió a -10 °C. Cuando la temperatura fue a -10 °C, se transfirieron 1,14 l (1277 g) de trifluoruro de boro-eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, 9,0 moles, 0,2 eq) al reactor. Después de la adición completa de trifluoruro de boro-eterato, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La completitud de la reacción se monitorizó por CCF (30:70 de acetato de etilo/heptano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 3-6 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, la mezcla se extrajo con 3x50 l de 10 % de bicarbonato sódico y 50 l de agua. La fase orgánica (DCM) se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C) y se dejó secar durante la noche. El rendimiento aislado de EMod1 fue del 97 %.

Síntesis del trímero EDC - Etapa 2. Preparación de EMod2, desacetilación de azidoglucosa

Se cargó un reactor de 100 l con 21016 g de monómero E de 1,6-diacetilo (EMod1) (45 moles, 1 eq.), 5434 g de acetato de hidracina ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HOAc}$, 24,75 moles, 0,55 eq.) y 50 l de DMF (dimetilformamida). La solución se agitó a temperatura ambiente y la reacción se monitorizó por CCF (30 % de acetato de etilo/hexano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 2-4 horas para completarse. Cuando la reacción se completó, se transfirieron 50 l de diclorometano y 40 l de agua al reactor. Ésta se agitó durante 30 minutos y las capas se separaron. Ésta se extrajo con 40 l de agua adicionales y la fase orgánica se secó en 6-8 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C) y se secó durante la noche a la misma temperatura. El jarabe se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 20:80, 30:70, 40:60 y 50:50 (EtOAc/heptano). Se reunieron las fracciones puras y se evaporaron dando un jarabe. El rendimiento aislado de producto intermedio EMod2 fue del 100 %.

Síntesis del trímero EDC - Etapa 3. Preparación de EMod3, formación de 1-TCA

Se cargó un reactor de 100 l con 12752 g del monómero E de 1-hidroxi (EMod2) (30 moles, 1 eq.) en 40 l de diclorometano. El reactor se purgó con nitrógeno y empezó la agitación, después de lo cual se transfirieron 2,25 l de DBU (15 moles, 0,5eq.) y 15,13 l de tricloroacetronitrilo (150,9 moles, 5,03 eq) al reactor. La agitación continuó y la reacción se mantuvo bajo nitrógeno. Después de la adición de reactivo, la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó por CCF (30:70 de acetato de etilo/heptano) y HPLC. La reacción necesitó aproximadamente 2-3 horas para alcanzar la completitud. Cuando la reacción se completó, se cargaron 40 l de agua y 20 l de DCM al reactor. Éste se agitó durante 30 min y las capas se separaron. La fase orgánica (capa de DCM) se extrajo con 40 l de agua y la solución de DCM se secó en 6-8 kg de sulfato de sodio anhidro. La solución se evaporó dando un jarabe (temp. del baño 40 °C). El producto en bruto se purificó en una columna de sílice de 200 l usando 140-200 l de cada uno de los siguientes perfiles de gradiente: 10:90 (DCM/EtOAc/heptano), 20:5:75 (DCM/EtOAc/heptano) y 20:10:70 (DCM/EtOAc/heptano). Se reunieron las fracciones puras y se evaporaron dando el producto intermedio EMod3 como un jarabe. El rendimiento aislado fue del 53 %.

Síntesis del trímero EDC-CB - Etapa 4. (Glucosilación) Acoplamiento de E-TCA con el elemento estructural de DC

Se disolvieron 118,0 gramos (174,64 mmoles, 1 eq) de DCBB y 299,60 gramos (523,92 mmoles, 3 eq) de E-Mod 3 en 250 ml de tolueno y se evaporaron a sequedad. El jarabe resultante se co-evaporó con tolueno (3 X 300 ml) a sequedad y se puso a vacío durante 2 horas. Entonces se disolvió el jarabe secado en 1180 ml de diclorometano secado, y se enfrió a -40,0 °C. Entonces se añadieron 23,08 gramos (87,32 mmoles, 0,5 eq) de triflato de trietilsililo (TES-triflato) mientras que se mantenía la temperatura entre -40,0 °C y -25,0 °C. Cuando se completó la adición, la mezcla de reacción se calentó inmediatamente hasta temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas bajo atmósfera de argón. La CCF (35 % de acetato de etilo/heptano) indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se extinguió con 15,91 gramos (158 mmoles, 0,9 eq/triflato de TES) de trietilamina (TEA), se agitó durante 30 min adicionales. Se añadió agua (180 ml) y la reacción se extrajo con 150 ml adicionales de diclorometano. La fase orgánica se extrajo con una solución al 25 % (4:1) de cloruro sódico/bicarbonato sódico (2 X 180 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 5 % de acetato de etilo en heptano) como espuma blanca de trímero EDC-CB (122 g, 65 %).

Modificación del trímero EDC-CB.

Etapa: 1 Formación de EDC-1-C: Apertura del anillo de anhidro y acetilación

6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[bencil-2,3-O-dibencil- β -D-glucopiranosiluronato]-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-azido-2-desoxi-1,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranososa

Se disolvieron 122,0 gramos (112,43 mmoles, 1 eq) del trímero EDC-CB en diclorometano seco y se añadieron 307,45 ml (3372,90 mmoles, 30 eq) de anhídrido acético. La solución se enfrió a -45 a -35 °C y se añadieron lentamente 118,20 ml (899,44 mmoles, 8 eq) de trifluoruro de boro-eterato. Tras completarse de adición, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 6 horas hasta que la reacción se completó por CCF (35 % de acetato de etilo/heptano). La mezcla de reacción se enfrió a -10 °C y se extinguió cuidadosamente con solución saturada de bicarbonato sódico y se agitó durante 1 h adicional. Entonces, la mezcla se extrajo con 2 litros adicionales de diclorometano. La fase orgánica se extrajo con salmuera (1 x 1,5 litros), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío dando un jarabe. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (10 % de gradiente acetato de etilo en heptano) como espuma blanca de EDC-1-CB (86 gramos, 65 %).

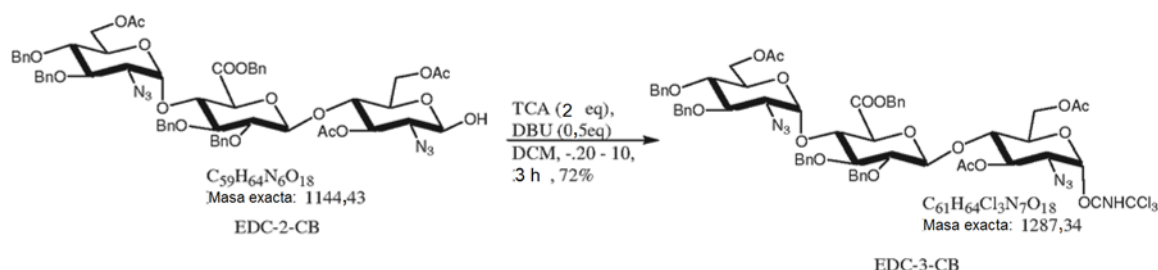
Etapa: 2 Preparación de EDC-2-CB: Desacetilación

6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[bencil-2,3-O-dibencil- β -D-glucopiranosiluronato]-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-azido-2-desoxi-3,6-di-O-acetil- β -D-glucopiranososa

Se disolvieron 86 gramos (72,44 mmoles, 1 eq) de EDC-1-CB en 360 ml de tetrahidrofurano (THF) seco y se enfrió a 5 - 10 °C. Entonces, se añadieron lentamente 77,62 gramos (724,39 mmoles, 10 eq) de bencilamina mientras que se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 15 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas. La CCF (40 % de acetato de etilo/heptano) indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con 1 litro de acetato de etilo y se extrajo con solución al 10 % de ácido cítrico (2 X 300 ml). La fase orgánica se extrajo entonces con solución saturada de bicarbonato sódico (1 X 200 ml), salmuera (1X 200 ml) y agua (1X 200 ml). La fase orgánica se secó usando sulfato de sodio anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente de 60 % de acetato de etilo en heptano) como espuma blanca de EDC-2-CB (52 gramos, 62 %).

Etapa: 3 Formación de EDC-3-CB: Formación de derivado de TCA

6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[bencil-2,3-O-dibencil- β -D-glucopiranosiluronato]-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-azido-2-desoxi-3,6-di-O-acetil-1-O-tricloroacetimidoil- β -D-glucopiranososa



A 52,0 gramos (45,40 mmoles, 1 eq) de EDC-2-CB en 300 ml de diclorometano (DCM) seco se añadieron 126,10 ml (899,43 mmoles, 20 eq) de tricloroacetnitrilo (TCA). La solución se enfrió a 0° - 5° C y se añadieron 3,36 ml (22,49 mmoles, 0,5 eq) de diazabicycloundeceno (DBU). La mezcla de reacción se dejó calentar a 10 °C y se agitó durante 3 horas o hasta que la reacción se completó. La mezcla de reacción se diluyó con 150 ml de agua y se extrajo con la adición de 250 ml de diclorometano. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a sequedad y se co-evaporó con tolueno (2 X 100 ml) dando un jarabe. La separación en columna cromatográfica usando gel de sílice y 5 - 50 % de acetato de etilo/heptano dio 46 gramos (78 %) de EDC-3-CB.

Síntesis del pentámero EDCBA-CB: Acoplamiento de EDC-3-CB con el dímero BA

O-6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[bencil-2,3-O-dibencil- β -D-glucopiranosiluronato]-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-azido-2-desoxi-3,6-di-O-acetil- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[2-O-benzoil-3-O-bencil- α -l-idopiranosiluronato de metilo]-(1 $\rightarrow$ 4)-2-azido-6-O-benzoil-3-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de metilo

Se evaporó a sequedad una solución de 46,0 gramos (35,67 mmoles, 1 eq) de EDC-3-CB y 56,92 gramos (74,34 mmoles, 2 eq) de dímero BA en 200 ml de tolueno. El jarabe resultante se co-evaporó con (2 x 300 ml) adicionales de tolueno. El jarabe secado se disolvió entonces en 185 ml de diclorometano (DCM) seco y se enfrió a -40 °C. La mezcla de reacción se añadió lentamente a 9,43 gramos (35,68 mmoles, 0,5 eq) de triflato de trietilsililo (triflato de TES). Cuando se completó la adición, la reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas bajo atmósfera de argón. La reacción se consideró completa por CCF (45 % de acetato de etilo/heptano). La mezcla de reacción se enfrió a 0 - 5 °C y se extinguió añadiendo lentamente 4,33 gramos (42,81 mmoles, 5,55 ml, 1,2 eq) de trietilamina (TEA). La mezcla de reacción se extrajo con 185 ml de agua y 100 ml de diclorometano. La fase orgánica se extrajo entonces con 25 % (4:1) de bicarbonato sódico saturado y solución de salmuera (2 X 150 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. La separación en columna cromatográfica usando gel de sílice y 5-50 % de acetato de etilo/heptano dio 49,0 gramos (71 %) de pentámero completamente protegido EDCBA-CB [también denominado pentámero completamente protegido, FPP] como forma blanca.

Conversión de FPP en fondaparinux sódico mediante celobiosa con Obn en C-2 del anillo D)

Etapas: 1 Preparación de API-1-CB: Saponificación del pentámero EDCBA-CB

Sal de disodio de O-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-bencil- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2,3-O-dibencil- β -D-glucopiranosiluronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-azido-2-desoxi- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-3-O-bencil- α -l-idopiranosiluronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-azido-3-O-bencil-2-desoxi- α -D-glucopiranosido de metilo

A una solución de 43,6 gramos (22,65 mmoles, 1 eq) del pentámero EDCBA-CB en 523 ml de dioxano y 785 ml de tetrahidrofurano (THF) se añadieron 872 ml de solución de hidróxido de litio 0,7 M (0,610 mmoles, 27 eq), seguido de 102 ml (1,0 mol, 44 eq) de 30 % de peróxido de hidrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas. Entonces, se añadieron 193 ml (0,77 moles, 34 eq) de solución de hidróxido sódico 4 N. La reacción se dejó con agitación durante 24-48 horas adicionales. La mezcla de reacción se extrajo entonces con 1,5 litros de acetato de etilo. La fase orgánica se extrajo con 900 ml de solución de salmuera y se secó con sulfato de sodio anhidro. Evaporación del disolvente a vacío y co-evaporación con tolueno (1 X 395 ml) para dar el jarabe de **API-1-CB**. El producto en bruto se usó para la siguiente etapa sin más purificación.

Etapas: 2 Preparación de API-2-CB: O-Sulfonación de API-1-CB:

O-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-bencil-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2,3-O-dibencil - β -D-glucopiranosiluronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-azido-2-desoxi-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-3-O-bencil-2-O-sulfo- α -l-idopiranosiluronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-azido-2-desoxi-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosido de metilo, sal de heptasodio

Se disolvió el producto en bruto 39,6 gramos (26,64 mmoles, 1 eq) de API-1-CB obtenido en la etapa previa 1 en 1,0 litro de dimetilformamida (DMF) seca. A ésta se añadió una solución previamente preparada que contenía 211,68 gramos (1,33 moles, 50 eq) del complejo trióxido de azufre-piridina en 205 ml de piridina y 512 ml de dimetilformamida (DMF). La mezcla de reacción se calentó a 60 °C durante 45 minutos adicionales. Después de agitar 2 horas a 60 °C, la reacción se enfrió a 20 °C y se inactivó en 3 litros de solución al 8 % de bicarbonato sódico que se mantuvo a 10 °C. El pH de la mezcla extinguida se mantuvo a pH 7 - 9 mediante la adición de solución de bicarbonato sódico. La mezcla extinguida se agitó durante 16 horas. Cuando el pH se estabilizó por encima de ~7, la solución se diluyó con agua y la mezcla resultante se purificó usando una columna de HPLC preparativa cargada con Amberchrom CG161-M y se eluyó con 90 % - 10 % de metanol/solución acuosa. La fracción pura se concentró a vacío dando un sólido blanco, 39,0 gramos de API-2-CB (rendimiento del 84,4 % en 2 etapas).

Etapas: 3 Preparación de API-3-CB: Hidrogenación

O-2-amino-2-desoxi-6-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-O-hidroxil- β -D-glucopiranosiluronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-amino-2-desoxi-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-O-sulfo- α -l-idopiranosiluronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-6-O-

sulfo- α -D-glucopiranosido de metilo, sal de heptasodio

Se trató una solución de 39,0 gramos (19,13 mmoles) del pentasacárido O-sulfatado API-2-CB en metanol y agua con 30 % en peso de paladio en carbono activo bajo 100 psi de presión de hidrógeno a temperatura ambiente durante 24 h o hasta la completitud de la reacción. La mezcla se concentró dando 26 g (95,67 %) de API-3-CB.

Se trató una solución de 1581 g (0,78 moles) del pentasacárido O-sulfatado API2 en 38 l de metanol y 32 l de agua con 30 % en peso de paladio en carbono activo bajo 100 psi de presión de hidrógeno a 60-65 °C durante 60 horas o hasta la completitud de la reacción. La mezcla se filtró entonces a través de cartuchos de filtro de 1,0 μ y 0,2 μ y el disolvente se evaporó a vacío dando 942 g (rendimiento del 80 %) de API3 [también denominado EDCBA(OSO₃)₅(NH₂)₃].

Preparación de fondaparinux sódico - Etapa 4: N-Sulfatación de API-3-CB:

O-2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucopiranuronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-desoxi-3,6-di-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-O-sulfo- α -l-idopiranuronosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2-desoxi-6-O-sulfo-2-(sulfoamino)- α -D-glucopiranosido de metilo, sal de decasodio

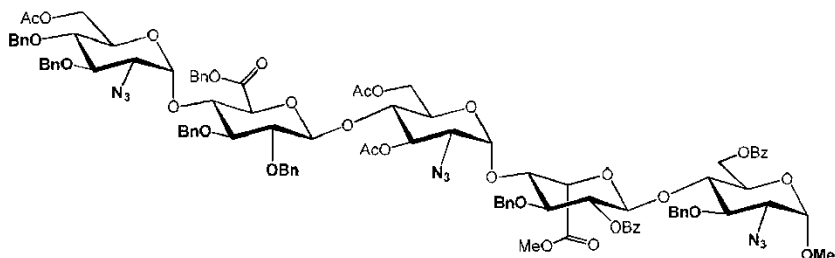
A una solución de 25,4 gramos (16,80 mmoles, 1 eq) de API-3-CB en 847 ml de agua se añadieron lentamente 66,85 gramos (446,88 mmoles, 25 eq) del complejo trióxido de azufre-piridina, manteniendo el pH de la mezcla de reacción a pH 9-9,5 durante la adición usando solución 2 N de hidróxido sódico. La reacción se dejó con agitación durante 4 horas a pH 9,0 - 9,5. Cuando la reacción se completó, el pH se ajustó a 7,0 usando 70 ml de 50 mmoles de solución de acetato de amonio a pH ~3,5. La mezcla de celobiosa N-sulfatada resultante se purificó usando columna cromatográfica de intercambio iónico, seguido de desalación usando resina de exclusión de tamaño para dar gramos (%) de la forma de fondaparinux sódico purificada.

A una solución de 942 g (0,63 moles) de API3 en 46 l de agua se añadieron lentamente 3,25 kg (20,4 moles, 32 eq) del complejo trióxido de azufre-piridina, manteniendo el pH de la mezcla de reacción a pH 9-9,5 durante la adición usando solución 2 N de hidróxido sódico. La reacción se dejó con agitación durante 4-6 horas a pH 9,0-9,5. Cuando la reacción se completó, el pH se ajustó a pH 7,0 usando solución 50 mM de acetato de amonio a pH 3,5. La mezcla de EDCBA(OSO₃)₅(NH₂)₃ N-sulfatada resultante se purificó usando columna cromatográfica de intercambio iónico (columna Varian Preparative 15 cm HiQ), seguido de desalación usando una resina de exclusión de tamaño o filtración en gel (Biorad G25). La mezcla resultante se trató entonces con carbón vegetal activo y se repitieron la purificación por intercambio iónico y la desalación dando 516 g (rendimiento del 47,6 %) de la forma de fondaparinux sódico purificada.

REIVINDICACIONES

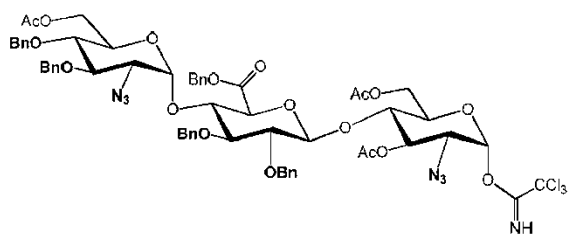
1. Un proceso para la preparación de un precursor de pentasacárido heparínico protegido para fondaparinux sódico que tiene la estructura

5



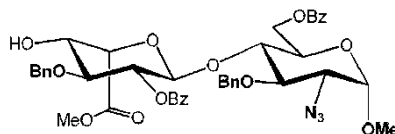
que comprende la etapa de acoplar un trímero EDC que tiene la estructura

10



con un dímero BA que tiene la estructura

15



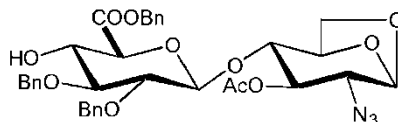
en el que el trímero EDC se prepara usando una glucosilación de Schmidt que comprende las etapas:

(a) acoplar un monómero E que tiene la estructura

20

EMod3

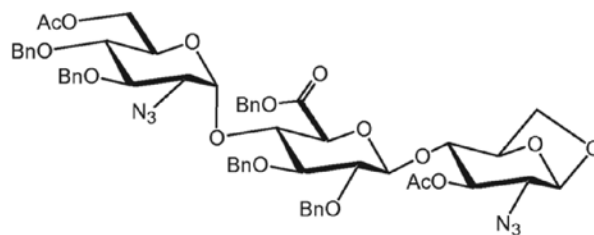
con un elemento estructural de DC que tiene la estructura



DCBB

25

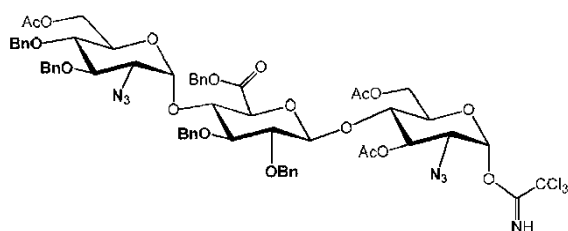
para obtener un precursor de EDC que tiene la estructura



Trímero EDC-CB; y

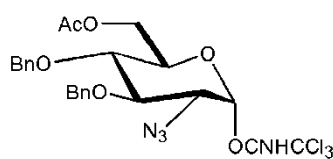
(b) convertir el precursor de EDC en el trímero EDC.

- 5 2. Un proceso de preparación del trímero EDC que tiene la fórmula



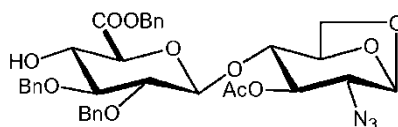
en el que el trímero EDC se prepara usando una glucosilación de Schmidt que comprende las etapas:

(a) acoplar un monómero E que tiene la estructura



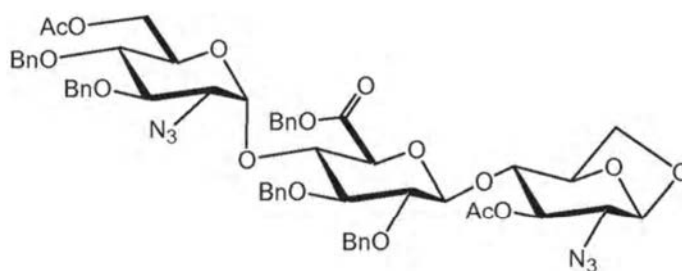
EMod3

con un elemento estructural de DC que tiene la estructura



DCBB

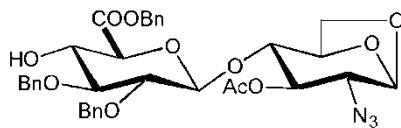
para obtener un precursor de EDC que tiene la estructura



Trímero EDC-CB; y

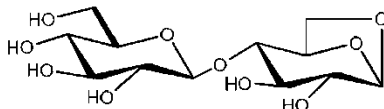
(b) convertir el precursor de EDC en el trímero EDC.

3. Un proceso de preparación del elemento estructural de DC que tiene la fórmula



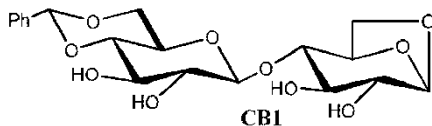
DCBB

5 donde el elemento estructural de DC se prepara a partir de 1,6-anhidrocelobiosa que tiene la estructura

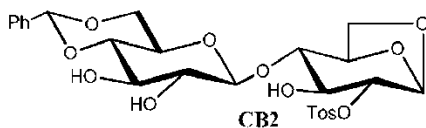


que comprende al menos cuatro de las siguientes etapas:

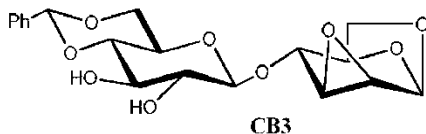
(a) proteger 1,6-anhidrocelobiosa para formar CB1 que tiene la estructura



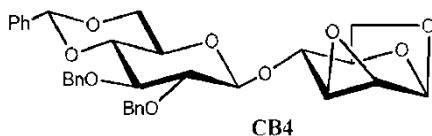
(b) tosilar CB1 para formar CB2 que tiene la estructura



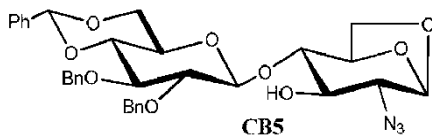
(c) hacer reaccionar CB2 con base para formar CB3 que tiene la estructura



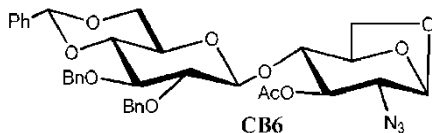
(d) proteger CB3 para formar CB4 que tiene la estructura



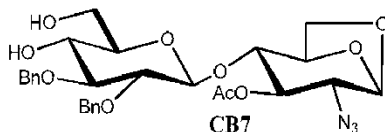
(e) hacer reaccionar CB4 con azida para formar CB5 que tiene la estructura



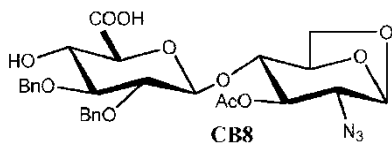
(f) acetilar CB5 para formar CB6 que tiene la estructura



(g) deproteger CB6 para formar CB7 que tiene la estructura



5 (h) oxidar CB7 para formar CB8 que tiene la estructura

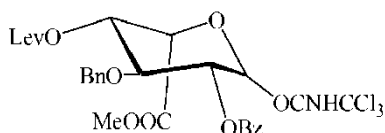


y
(i) bencilar CB8 para formar el dímero DC.

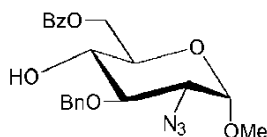
10 4. El proceso de la reivindicación 3, en el que el proceso incluye al menos seis etapas de las etapas (a) - (i).

5. El proceso de la reivindicación 3, en el que el proceso incluye todas de las etapas (a) - (i).

15 6. El proceso de la reivindicación 1, en el que el dímero BA se prepara usando una glucosilación de Schmidt que comprende la etapa de acoplar un monómero B que tiene la estructura

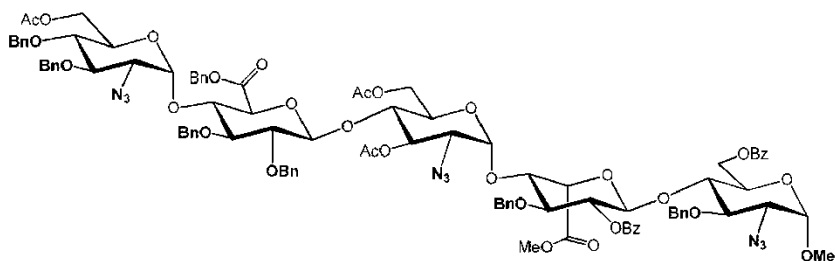


20 donde Lev es levulinilo, Bn es bencilo, Bz es benzoilo y TCA es tricloroacetimidato, con un monómero A que tiene la estructura



25 para formar el dímero BA.

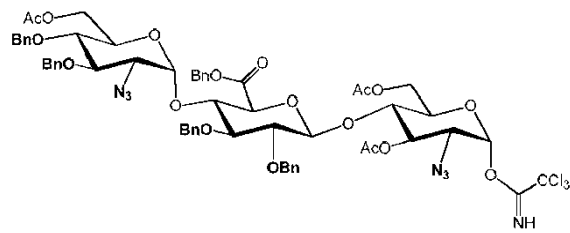
7. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además convertir el compuesto de fórmula



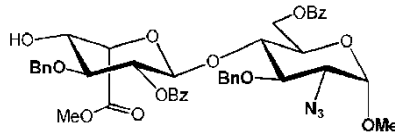
30 en fondaparinux sódico.

8. El proceso de la reivindicación 2, que comprende además

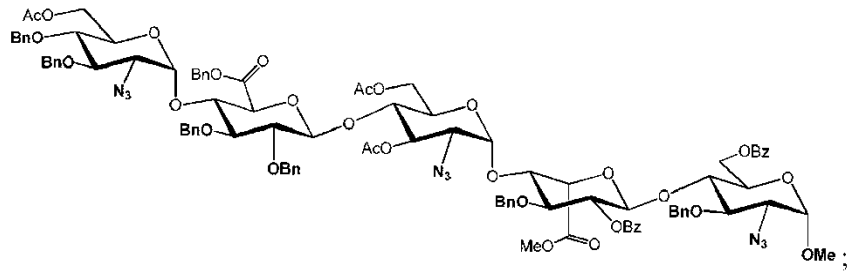
35 (c) acoplar el compuesto trímero EDC de fórmula



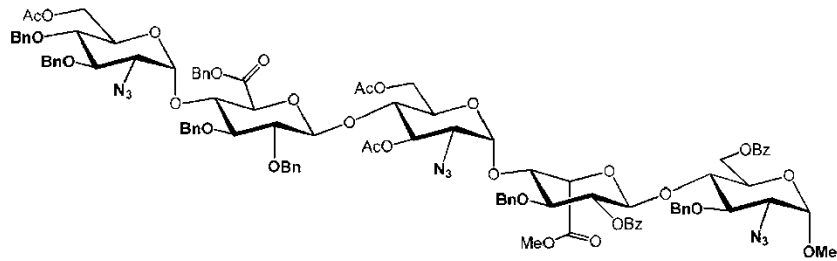
con un dímero BA que tiene la estructura



para formar un compuesto que tiene la estructura



y
(c) convertir el compuesto de fórmula



en fondaparinux sodico.

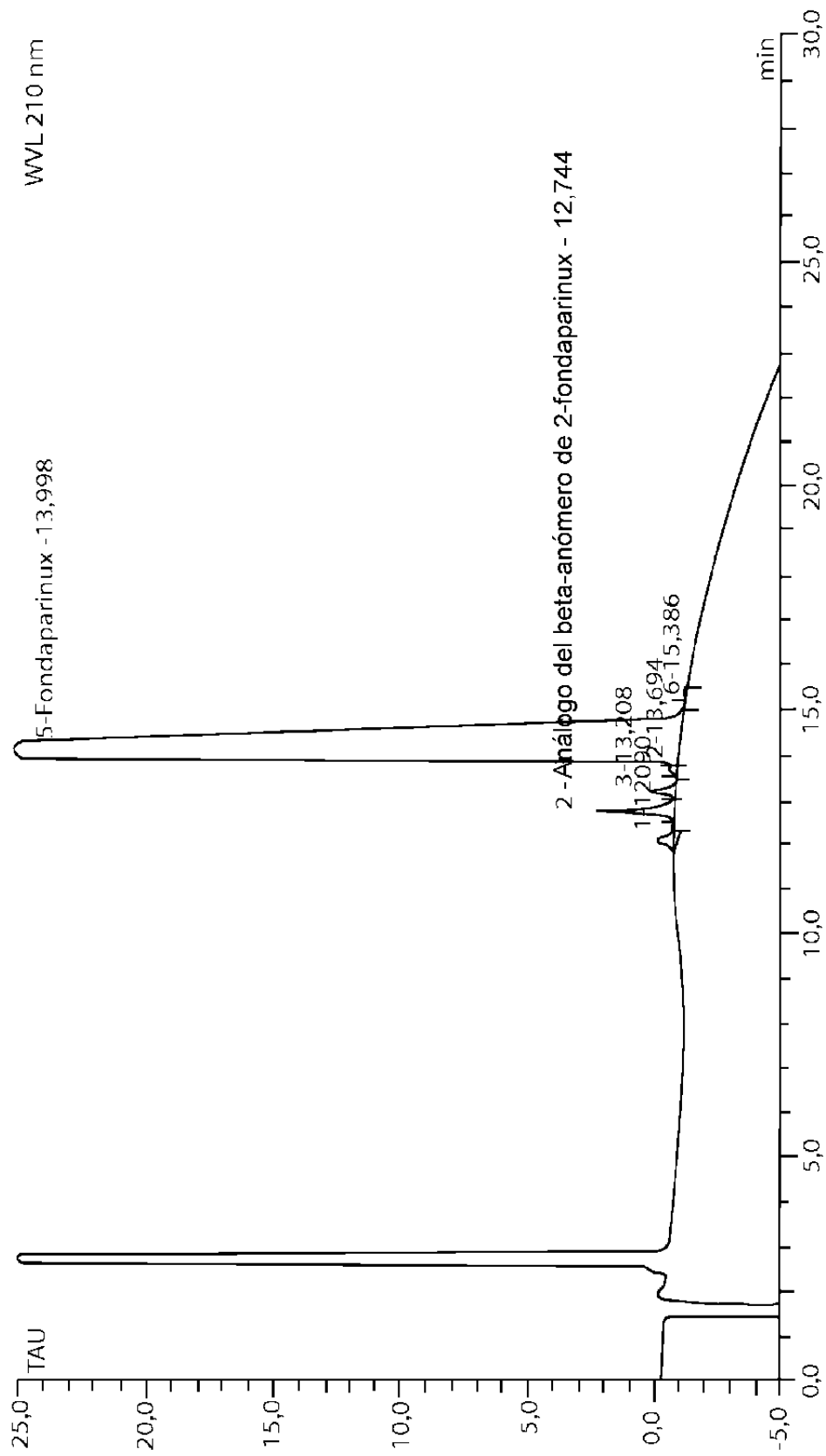


FIGURA 1A

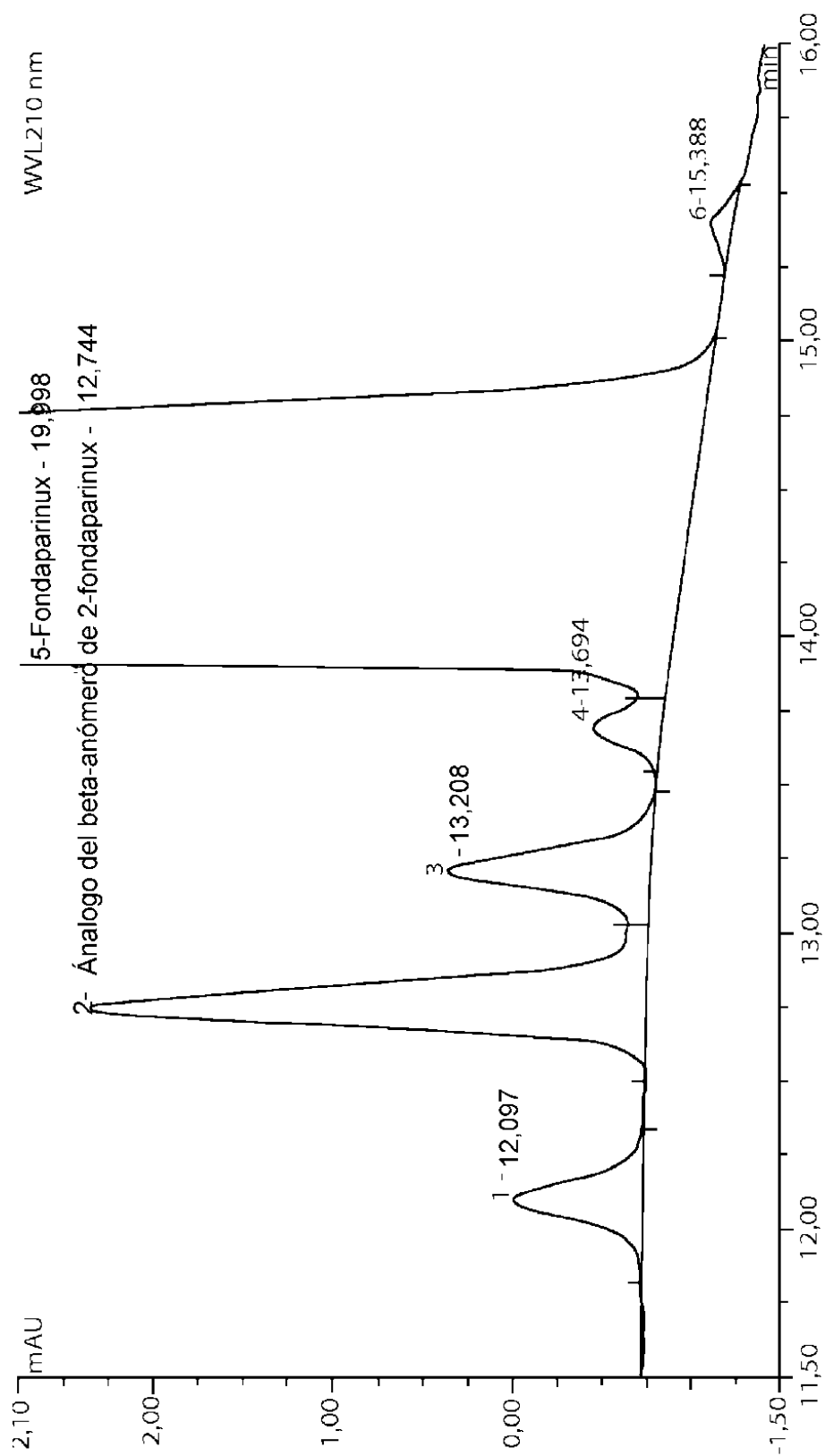


FIGURA 1B