

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 475**

51 Int. Cl.:

A61K 31/351	(2006.01)	C07D 309/08	(2006.01)
A61K 31/36	(2006.01)	A61P 31/14	(2006.01)
A61K 31/4025	(2006.01)	A61P 31/16	(2006.01)
A61K 31/403	(2006.01)		
A61K 31/41	(2006.01)		
A61K 31/4192	(2006.01)		
C07D 405/14	(2006.01)		
C07D 309/28	(2006.01)		
C07D 405/04	(2006.01)		
C07D 407/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2015 PCT/AU2015/050526**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16033660**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2015 E 15837720 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 3189050**

54 Título: **Agentes antivirales y usos de estos**

30 Prioridad:

05.09.2014 NL 2013420

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

21.10.2020

73 Titular/es:

**GRIFFITH UNIVERSITY (100.0%)
170 Kessels Road
Nathan, Queensland 4111, AU**

72 Inventor/es:

**VON ITZSTEIN, MARK;
EL-DEEB, IBRAHIM;
DIRR, LARISSA;
GUILLON, PATRICE y
WINGER, MORITZ**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

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

ES 2 788 475 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

Agentes antivirales y usos de estos

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo del tratamiento médico. Más particularmente, esta invención se refiere a novedosos agentes antivirales y su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección causada por una infección viral. En particular, la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, como se define en la reivindicación 1. La invención se refiere, además, a un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente eficaz de este, como se define en la reivindicación 11, para usar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal en un paciente. La invención además se refiere a un método in vitro para modular la actividad de una enzima hemaglutinina y/o neuraminidasa de un virus paragripal que incluye la etapa de poner en contacto la enzima con un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente eficaz de este, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

Los virus son responsables de una amplia gama de enfermedades de mamíferos que representan un gran coste para la sociedad. Los efectos de una infección viral pueden variar desde síntomas comunes de gripe hasta problemas respiratorios graves y pueden provocar la muerte, particularmente entre los miembros jóvenes, ancianos e inmunodeprimidos de la comunidad.

Los virus de la familia *Orthomyxoviridae*, incluidos los virus de la gripe tipos A, B y C, y la familia *Paramyxoviridae* son los organismos patógenos responsables de una cantidad importante de infecciones humanas anualmente.

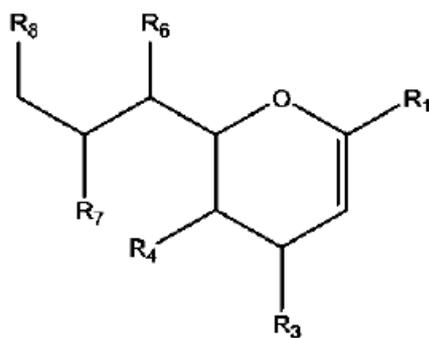
Si se toma a la familia *Paramyxoviridae* como ejemplo, los virus paragripales de humanos tipos 1 a 3 (hPIV-1, 2 y 3) son la causa principal de las enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior en bebés y niños pequeños y también afectan a los ancianos y los inmunodeprimidos. De manera importante, se estima que solo en los Estados Unidos ocurren hasta cinco millones de infecciones del tracto respiratorio inferior cada año en niños menores de 5 años, y se ha aislado hPIV en aproximadamente un tercio de estos casos. Actualmente no hay vacunas ni terapia antiviral específica para prevenir o tratar las infecciones por hPIV respectivamente, a pesar de los continuos esfuerzos. Algunos de los enfoques más recientes se han dirigido al bloqueo de la entrada y la activación de la fusión prematura del virus por una molécula pequeña.

Una interacción inicial del virus paragripal con la célula huésped es a través de su glucoproteína de superficie, hemaglutinina-neuraminidasa (HN) e implica el reconocimiento de glucoconjugados que contienen ácido *N*-acetilneuramínico. La HN de un virus paragripal es una proteína multifuncional que abarca las funciones de unión al receptor (para la adhesión celular) y destrucción del receptor (que facilita la liberación del virus), no solo dentro de la proteína, sino aparentemente en un solo sitio de unión. Además, la HN está involucrada en la activación de la proteína viral de fusión a la superficie (F) necesaria para iniciar la infección de la célula huésped objetivo. Por lo tanto, la inhibición de las enzimas hemaglutinina y/o neuraminidasa puede proporcionar un objetivo para los agentes antivirales. Li y otros, en *Bioorg. Med. Chem Lett.*, 16(19), 2006, 5009-5013, describen análogos de zanamivir modificados con 4-triazol que tienen actividad antiviral contra el virus de la gripe aviar AIV H5N1. Feng y otros, en *ChemMedChem* 7, 2012, 1527-1536, describen que los análogos de zanamivir son inhibidores de la neuraminidasa útiles como medicamentos contra la gripe. El documento WO-A-02076971 describe compuestos útiles como inhibidores de la neuraminidasa de paramixovirus.

Resumen de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones. Cualquier tema que quede fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo con fines informativos. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para usar en un método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



Fórmula (I)

5

10

15

20

25

en donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, o una sal de este, C(O)NR₉R₁₀, C(O)OR₁₁ en donde R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; R₃ se selecciona del grupo que consiste en tetrazol unido a N opcionalmente sustituido, indol unido a N opcionalmente sustituido, isoindol unido a N opcionalmente sustituido,

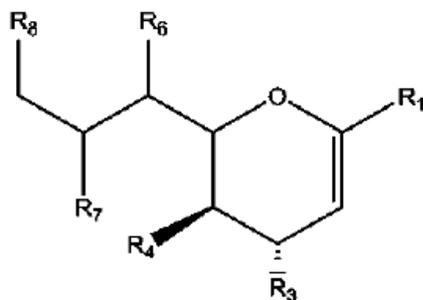
y benzotriazol unido a N opcionalmente sustituido, y triazol unido a N como se define en la reivindicación 1;

R₄ es NHC(O)R₁₇ en donde R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₃-C₆;

R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, NH₂, alquilo C₁-C₆, NR₁₈R_{18'}, alcoxi C₁-C₆, -OC(O)R₁₈, -NH(C=O)R₁₈ y S(O)_nR₁₈, en donde n = 0 - 2 y cada R₁₈ y R_{18'} son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; en donde "opcionalmente sustituido" significa la sustitución opcional con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, CN, OH, oxo, NH₂, Cl, F, Br, I, arilo y heterociclilo, estos dos últimos pueden estar opcionalmente sustituidos.

30

En una modalidad del primer aspecto, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II):



Fórmula (II)

35

40

45

en donde, R₁, R₃, R₄, R₆, R₇ y R₈ son como se describieron anteriormente.

50

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto del primer aspecto, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Adecuadamente, la composición farmacéutica es para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección viral.

55

Un tercer aspecto de la invención reside en un compuesto de fórmula (I) como se define en la reivindicación 11 para usar en un método de tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal en un paciente.

60

En una modalidad, el virus paragripal es un virus hPIV-1, 2 o 3.

Preferentemente, el paciente es un animal doméstico o de ganado o un ser humano.

65

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método in vitro para modular la actividad de una enzima hemaglutinina y/o neuraminidasa de un virus paragripal que incluye la etapa de poner en contacto la enzima con un compuesto del primer aspecto o como se define en la reivindicación 11.

Las diversas características y modalidades de la presente invención, mencionadas en las secciones individuales anteriores, se aplican, según sea apropiado, a otras secciones, *mutatis mutandis*. En consecuencia, las características especificadas en una sección se pueden combinar con características especificadas en otras secciones, según corresponda.

5

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

10

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, ahora se describirán modalidades preferidas a modo de ejemplo con referencia a las figuras adjuntas en donde:

15

La Figura 1 muestra las estructuras del ácido *N*-acetilneuramínico (**1**), el inhibidor de sialidasa Neu5Ac2en (**2**), 4-azido-4-desoxi-Neu5Ac2en (**3**) zanamivir (**4**), el análogo isobutiramido en C-5 de Neu5Ac2en (**5**), el inhibidor de hPIV de referencia BCX 2798 (**6**) y los inhibidores novedosos **7-10**;

20

La Figura 2 es una comparación de los valores de IC₅₀ de HI para los inhibidores **6** y **10**, mediante el uso de glóbulos rojos de cobayo (RBC gp, barra sólida) y glóbulos rojos humanos (RBC h, barra discontinua);

25

La Figura 3 es una representación gráfica de los valores de IC₅₀ de NI (relleno continuo) e HI (relleno discontinuo) para los derivados de Neu5Ac2en **2**, **3**, **5-10**. Inhibidores **2**, **3**, **7**, **8** con un grupo acetamido en C5 (panel izquierdo, grupo 1) e inhibidores **5**, **6**, **9**, **10** con un grupo isobutiramido en C5 (panel derecho, grupo 2). Los valores son las medias de las determinaciones de 3 experimentos independientes y las barras de error corresponden a las desviaciones estándar calculadas;

30

La Figura 4A-C es una comparación gráfica de los valores de IC₅₀ de NI (barra sólida) e HI (barra discontinua) para inhibidores seleccionados. (A) Comparación de los valores de IC₅₀ de NI e HI para los compuestos **3**, **6-10** y sus análogos hidroxilo en C-4 (**2** y **5**). (B) Comparación de los valores de IC₅₀ de NI e HI para los compuestos **7-10** y sus análogos azido en C-4 (**3** y **6**). (C) Comparación de los valores de IC₅₀ de NI e HI para los compuestos **6**, **9** y **10** y sus análogos de acetamido en C-5 (**3**, **7** y **8** respectivamente);

35

La Figura 5 es (a) Titulación (ensayo de formación de foco) de la progenie viral después de un ensayo de inhibición del crecimiento viral durante 48 h. Resultados representativos de una titulación de la progenie viral. El virus se recogió después de 48 h de amplificación en presencia de 2 μM de los compuestos **8**, **10** o **6**. Los sobrenadantes recogidos de los cultivos virales se diluyeron al menos 1:1000 para asegurarse que el compuesto restante no tiene efecto sobre la formación de focos. (b) Inhibición del crecimiento viral del inhibidor de referencia **6** y el inhibidor **10**. La inhibición del crecimiento viral se determinó mediante la titulación de la progenie de una monocapa de LLC-MK2 confluyente infectada con MOI baja en presencia de un inhibidor 2 μM. A esta concentración de inhibidor, **10** mostró un 94 % de inhibición en comparación con un 14 % de inhibición para **6**. Estos resultados son representativos de 2 experimentos independientes realizados por duplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar calculada;

40

La Figura 6 muestra la inhibición del crecimiento viral del inhibidor de referencia **6** (□) y el inhibidor **10** (▲) en varias líneas celulares. Los valores de IC₅₀ sobre el crecimiento viral de los compuestos **6** (□) y **10** (▲) se determinaron mediante una técnica ELISA *in situ* contra ambas líneas celulares humanas (A549 y NHBE) y una línea celular de riñón de mono (LLC-MK2). Se determinaron los valores de IC₅₀ de 54,6 ± 3,8 μM y 2,1 ± 0,6 μM (LLC-MK2); 130,6 ± 13,0 μM y 10,3 ± 0,3 μM (A549); 79,3 ± 1,0 μM y 13,9 ± 0,7 μM (NHBE) para **6** y **10** respectivamente. Estos valores se determinaron a partir de al menos 2 experimentos independientes realizados por triplicado y las barras de error corresponden a la desviación estándar calculada;

45

La Figura 7 Espectros de RMN ¹H y STD de **8** en complejo con HN de hPIV-3. (a) Espectro de RMN ¹H de **8** y (b) espectro de RMN STD de **8** en presencia de HN de hPIV-3 20 μM a una relación proteína-ligando de 1:100 (**8** 2 mM). (c) Espectro de RMN ¹H de la región H7, H8, H9 y H9'. Las señales del glicerol residual se marcan como ★. (d) Espectro de RMN STD de la región H7, H8, H9 y H9'. (e) El epítipo de unión propuesto de **8**;

50

La Figura 8 es un espectro de RMN ¹H y STD y un mapa de epítipos de **10** en complejo con HN de hPIV-3. (a) Espectro de RMN ¹H de **10**. (b) Espectro de RMN STD de **10** en presencia de HN de hPIV-3 20 μM a una relación proteína-ligando de 1:100 (2 mM de **10**). (c) Espectro de RMN ¹H de la región H7, H8, H9 y H9'. (d) Espectro de RMN STD de la región H7, H8, H9 y H9'. (e) Mapa de epítipo de unión propuesto del inhibidor **10**;

55

La Figura 9 es una comparación de espectros de RMN STD de **10** en complejo con el virus hPIV-3 intacto o HN recombinante. (a) Espectro de RMN ¹H de **10** en presencia de HN de hPIV-3, (b) espectro de RMN STD de **10** en presencia de virus hPIV-3 intacto y (c) Espectro de RMN STD de **10** en presencia de HN de hPIV-3;

60

La figura 10 es una superposición de los protones de fenilo de **10** en complejo con virus intacto o HN recombinante. (a) Espectro de RMN ¹H de **10** y (b) Superposiciones de espectros de RMN STD de **10** en presencia de virus hPIV-3 (negro) o HN de hPIV-3 recombinante (rojo);

65

La figura 11 es una representación gráfica de los resultados de las pruebas de citotoxicidad celular contra células A549; y

5 La Figura 12 indica los resultados de los ensayos de inhibición de Neu2 para compuestos seleccionados fluorados y no fluorados.

Descripción detallada

10 La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que ciertos derivados del ácido neuramínico muestran una eficacia útil en el tratamiento de enfermedades causadas por infección viral. Particularmente, los compuestos de la invención son útiles en la inhibición de las enzimas hemaglutinina y/o neuraminidasa del virus paragrafal.

Definiciones

15 En esta descripción de patente, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", o términos similares pretenden significar una inclusión no exclusiva, de manera que un método o composición que comprende una lista de elementos no incluye esos elementos únicamente, sino que puede incluir otros elementos no mencionados.

20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente descripción tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente en la técnica a la que pertenece esta invención.

25 Como se usa en la presente descripción, "cantidad eficaz" se refiere a la administración de una cantidad del agente activo en cuestión, suficiente para prevenir la aparición de síntomas de la afección que se está tratando, o para detener el empeoramiento de los síntomas o para tratar y aliviar o al menos reducir la severidad de los síntomas. La cantidad eficaz variará de una manera que una persona experta en la materia entenderá con la edad, el sexo, el peso, etc. del paciente. Se puede determinar una dosis o régimen de dosificación apropiado mediante un ensayo de rutina.

30 El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente descripción, se refiere a sales que son toxicológicamente seguras para la administración sistémica o localizada, tales como sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables que incluyen bases inorgánicas u orgánicas y ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse del grupo que incluye sales alcalinas y alcalinoterreas, de amonio, aluminio, hierro, amina, glucosamina, cloruro, sulfato, sulfonato, bisulfato, nitrato, citrato, tartrato, bitarato, fosfato, carbonato, bicarbonato, malato, maleato, napsilato, fumarato, succinato, acetato, benzoato, tereftalato, palmoato, piperazina, pectinato y S-metil metionina y similares.

40 Los términos "sustituido" y "opcionalmente sustituido" en cada incidencia de su uso en la presente descripción, y en ausencia de una lista explícita para cualquier resto particular, se refieren a la sustitución del resto en cuestión, por ejemplo, una cadena de alquilo o estructura de anillo, con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, CN, OH, oxo, NH₂, Cl, F, Br, I, arilo y heterocíclico y estos dos últimos pueden estar ellos mismos opcionalmente sustituidos. Cuando el término se usa antes de mencionar una serie de grupos funcionales, se pretende aplicar a todas las funcionalidades mencionadas a menos que sea evidente de otra manera. Por ejemplo, "amino, heterocíclico, arilo opcionalmente sustituidos" significa que todos los grupos amino, heterocíclicos y arilo pueden estar opcionalmente sustituidos.

45 El término "alquilo" se refiere a un sustituyente alquilo de cadena lineal o ramificada que contiene, por ejemplo, de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, preferentemente de 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, con mayor preferencia de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, incluso con mayor preferencia de 1 a aproximadamente 4 átomos de carbono, aún con mayor preferencia de 1 a 2 átomos de carbono. Los ejemplos de dichos sustituyentes incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, isoamilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, hexilo, heptilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 2-etilbutilo, 3-etilbutilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo y similares. El número de carbonos al que se hace referencia se refiere a la cadena principal de carbono y a las ramificaciones de carbono, pero no incluye los átomos de carbono que pertenecen a algún sustituyente, por ejemplo, los átomos de carbono de un sustituyente alcoxi que se ramifica fuera de la cadena de carbono principal.

50 El término "cicloalquilo" se refiere a grupos de carbono monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos saturados opcionalmente sustituidos. Cuando sea apropiado, el grupo cicloalquilo puede tener un número especificado de átomos de carbono, por ejemplo, cicloalquilo C₃-C₆ es un grupo carbocíclico que tiene 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono. Los ejemplos no limitantes pueden incluir ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo y similares.

60 El término "arilo" se refiere a un sustituyente carbocíclico aromático no sustituido o sustituido, como se entiende comúnmente en la técnica. Se entiende que el término arilo se aplica a sustituyentes cíclicos que son planos y comprenden electrones $4n + 2\pi$, de acuerdo con la Regla de Hückel. Se prefiere arilo C-6.

65 Los términos "heterocíclico" y "heterocíclico", como se usan en la presente descripción específicamente en relación con ciertos grupos 'R', se refieren a un anillo no aromático que tiene de 5 a 7 átomos en el anillo y de esos átomos 1 a 4 son

5 heteroátomos, dicho anillo está aislado o fusionado a un segundo anillo en donde dichos heteroátomos se seleccionan independientemente de O, N y S. Heterocíclico incluye grupos heterocíclicos parcial y totalmente saturados. Los sistemas heterocíclicos pueden estar unidos a otro resto a través de cualquier número de átomos de carbono o heteroátomos del radical y pueden estar tanto saturados como insaturados. Ejemplos no limitantes de grupos heterocíclicos pueden seleccionarse de pirazol, imidazol, indol, isoindol, triazol, benzotriazol, tetrazol, pirimidina, piridina, pirazina, diazina, triazina, tetrazina, pirrolidinilo, pirrolinilo, piranilo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirazolinilo, ditiolilo, oxatiolilo, dioxanilo, dioxinilo, oxazinilo, azepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, oxepinilo y tiapinilo, imidazolinilo, tiomorfolinilo y similares.

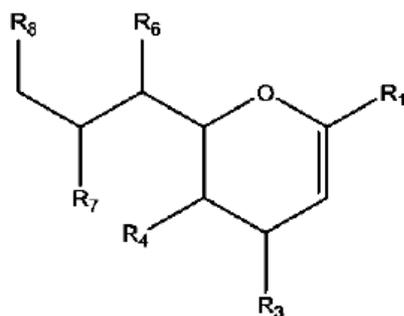
10 El término "OH protegido" o "hidroxilo protegido" se refiere a un grupo hidroxilo que está protegido con un grupo protector común tal como un grupo acilo, un grupo éter o éster, incluidos los grupos acilo C₁-C₃, alquilo C₁-C₄ para formar el éter o arilo, tal como bencilo, que forma el éter o el éster C₁-C₄.

15 El término "unido a N" como se usa en la presente descripción con referencia a compuestos del primer aspecto que incluyen compuestos de fórmula (I) y (II), por ejemplo "triazol unido a N" o "heterociclo unido a N", se refiere al resto unido en la posición C-4 del núcleo de ácido neuramínico (R₃ en la fórmula (I) y (II)) y limita esa unión para que implique una unión directa entre el anillo de carbono y el átomo de nitrógeno. Preferentemente, se refiere al resto R₃ que se une al núcleo de ácido neuramínico a través de un átomo de nitrógeno que a su vez forma parte del heterociclo apropiado, tal como uno de los nitrógenos de un anillo de triazol, tetrazol, indol, etc. Para los compuestos "difluoro" de fórmula (III) y (IIIa) el término unido a N se refiere al resto R₃ que está unido al núcleo a través de un átomo de nitrógeno intermedio o, en el caso de un resto heterocíclico, puede ser a través de un átomo de nitrógeno que forma parte del propio heterociclo, como uno de los nitrógenos de un anillo de triazol

25 Siempre que se indique un intervalo del número de átomos en una estructura (por ejemplo, un alquilo, C₁-C₁₂, C₁-C₁₀, C₁-C₉, C₁-C₆, C₁-C₄, etc.), se contempla específicamente que también se puede usar cualquier subintervalo o número individual de átomos de carbono que caigan dentro del intervalo indicado. Así, por ejemplo, la mención de un intervalo de 1-12 átomos de carbono (por ejemplo, C₁-C₁₂), 1-9 átomos de carbono (por ejemplo, C₁-C₉), 1-6 átomos de carbono (por ejemplo, C₁-C₆), 1-4 átomos de carbono (por ejemplo, C₁-C₄), 1-3 átomos de carbono (por ejemplo, C₁-C₃) o 2-8 átomos de carbono (por ejemplo, C₂-C₈) tal como se utiliza con respecto a cualquier grupo químico (por ejemplo, alquilo, etc.) al que se hace referencia en la presente descripción abarca y describe específicamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y/o 12 átomos de carbono, según corresponda, así como cualquier subintervalo de estos (por ejemplo, 1-2 átomos de carbono, 1-3 átomos de carbono, 1-4 átomos de carbono, 1-5 átomos de carbono, 1-6 átomos de carbono, 1-7 átomos de carbono, 1-8 átomos de carbono, 1-9 átomos de carbono, 1-10 átomos de carbono, 1-11 átomos de carbono, 1-12 átomos de carbono, 2-3 átomos de carbono, 2-4 átomos de carbono, 2-5 átomos de carbono, 2-6 átomos de carbono, 2-7 átomos de carbono, 2-8 átomos de carbono, 2-9 átomos de carbono, 2-10 átomos de carbono, 2-11 átomos de carbono, 2-12 átomos de carbono, 3-4 átomos de carbono, 3-5 átomos de carbono, 3-6 átomos de carbono, 3-7 átomos de carbono, 3-8 átomos de carbono, 3-9 átomos de carbono, 3-10 átomos de carbono, 3-11 átomos de carbono, 3-12 átomos de carbono, 4-5 átomos de carbono, 4-6 átomos de carbono, 4-7 átomos de carbono, 4-8 átomos de carbono, 4-9 átomos de carbono, 4-10 átomos de carbono, 4-11 átomos de carbono, y/o 4-12 átomos de carbono, etc., según corresponda).

40 Como se usa en la presente descripción, los términos "sujeto" o "individuo" o "paciente" pueden referirse a cualquier sujeto, particularmente un sujeto vertebrado, y aún más particularmente un sujeto mamífero, para quien se desea la terapia. Los animales vertebrados adecuados incluyen, entre otros, primates, aves, animales de ganado (por ejemplo, ovejas, vacas, caballos, burros, cerdos), animales de laboratorio (por ejemplo, conejos, ratones, ratas, cobayos, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros) y animales salvajes en cautiverio (por ejemplo, zorros, ciervos, dingos). Un sujeto preferido es un ser humano que necesita tratamiento para una enfermedad o afección causada por una infección viral. Sin embargo, se entenderá que los términos antes mencionados no implican que los síntomas estén necesariamente presentes.

50 De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este:



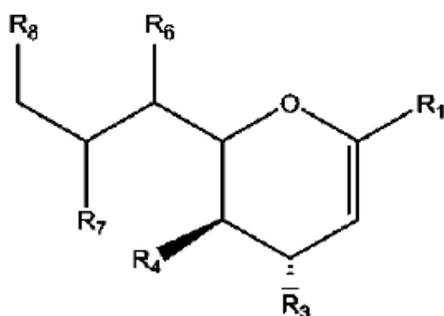
Fórmula (I)

en donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, o una sal de este, C(O)NR₉R₁₀, C(O)OR₁₁ en donde R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; R₃ se selecciona del grupo que consiste en tetrazol unido a N opcionalmente sustituido, indol unido a N opcionalmente sustituido, isoindol unido a N opcionalmente sustituido y benzotriazol unido a N opcionalmente sustituido y triazol unido a N como se define en la reivindicación 1;

R₄ es NHC(O)R₁₇ en donde R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₃-C₆; y

R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, NH₂, alquilo C₁-C₆, NR₁₈R_{18'}, alcoxi C₁-C₆, -OC(O)R₁₈, -NH(C=O)R₁₈ y S(O)_nR₁₈, en donde n = 0 - 2 y cada R₁₈ y R_{18'} son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; en donde "opcionalmente sustituido" significa la sustitución opcional con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, CN, OH, oxo, NH₂, Cl, F, Br, I, arilo y heterociclilo, estos dos últimos pueden estar opcionalmente sustituidos.

En una modalidad del primer aspecto, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II):



Fórmula (II)

en donde, R₁, R₃, R₄, R₆, R₇ y R₈ son como se describieron previamente.

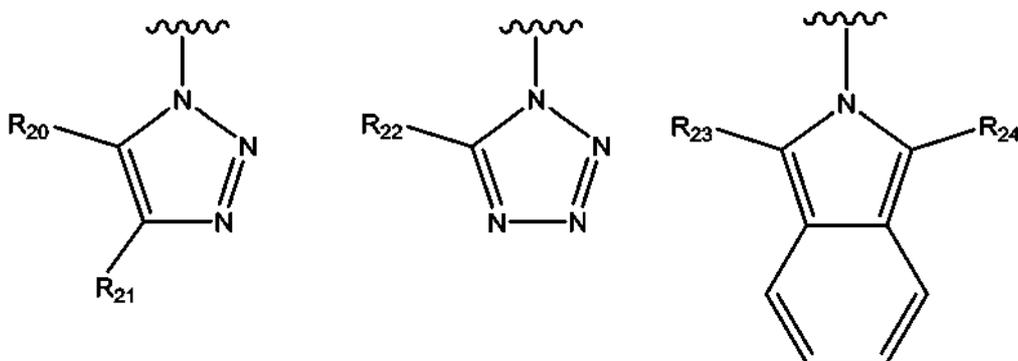
Preferentemente, el triazol es un anillo de 1,2,3-triazol conectado directamente al carbono del anillo de ácido neuramínico en la posición N-1.

En una modalidad en donde el tetrazol está sustituido, está sustituido solo en el carbono del anillo.

En una modalidad del compuesto de fórmula (I) o (II) R₁ es COOH, o una sal de este, o C(O)OR₁₁ en donde R₁₁ se selecciona de metilo, etilo y propilo.

En ciertas modalidades específicas R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, COONa y C(O)OMe.

En una modalidad relacionada con el compuesto de fórmula (I) o (II) para usar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal en un paciente, R₃ se selecciona del grupo que consiste en:



en donde, R₂₀ y R₂₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, ciano, halo, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, éter de alquilo C₁-C₆, piridilo opcionalmente sustituido y fenilo opcionalmente sustituido, y en donde al menos uno de R₂₀ y R₂₁ no es hidrógeno;

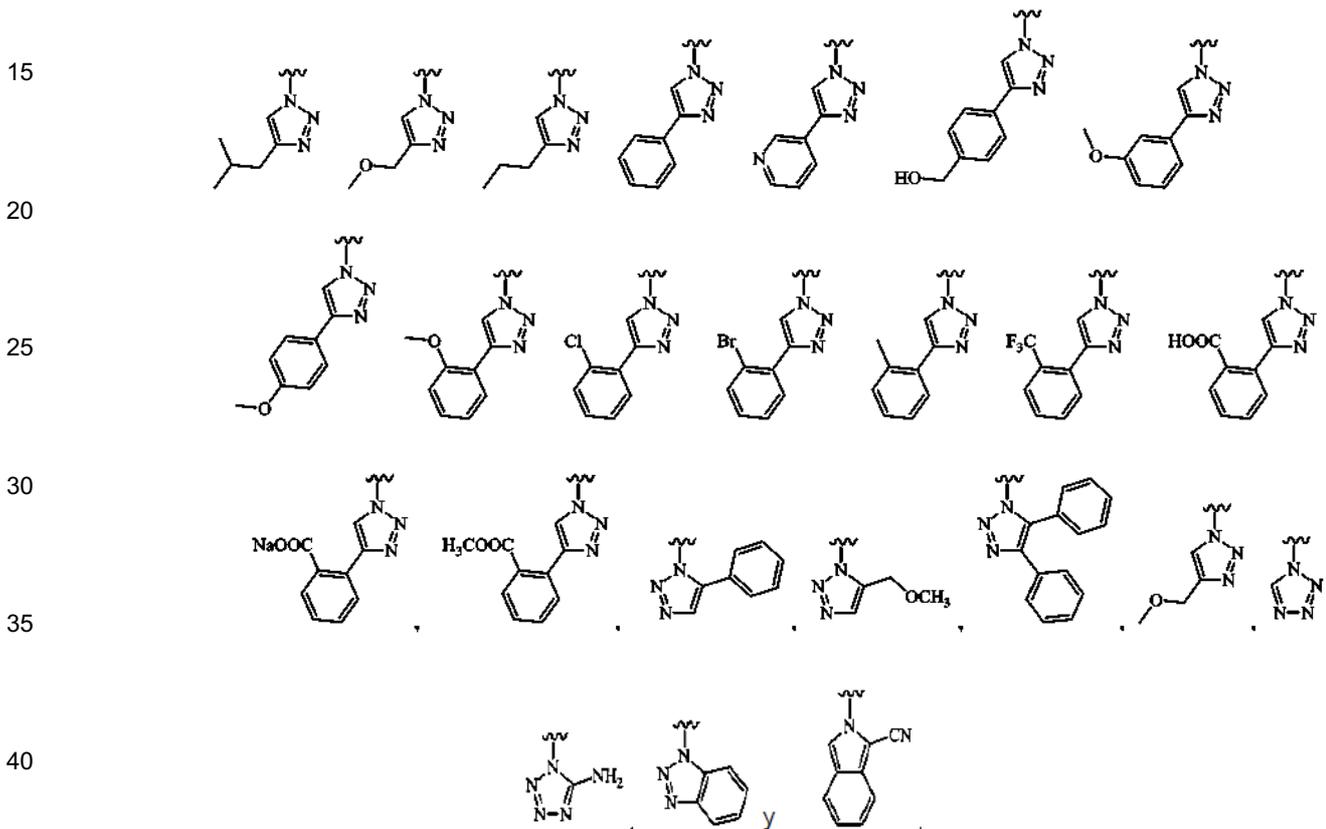
R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y fenilo opcionalmente sustituido; y

R₂₃ y R₂₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, ciano, halo, alquilo C₁-C₆ y haloalquilo C₁-C₆.

En ciertas modalidades preferidas, R₂₀ y R₂₁ se seleccionan de alquilo C₁-C₆, hidroxialquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, piridilo opcionalmente sustituido y fenilo opcionalmente sustituido.

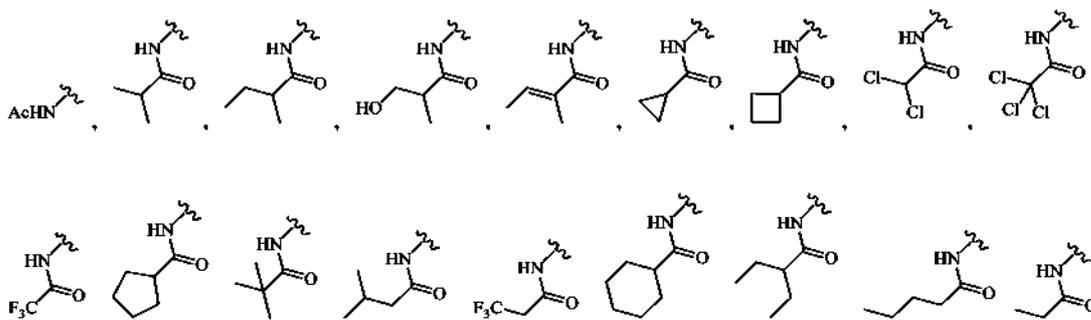
5 En una modalidad, en donde cuando R₂₀, R₂₁ o R₂₂ son piridilo opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido, según sea apropiado, entonces la sustitución puede ser con un resto seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alquilhidroxi C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, halo, -C(O)OMe y -CH₂OCH₃.

10 En ciertas modalidades relacionadas con un compuesto de fórmula (I) para usar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal en un paciente, R₃ puede seleccionarse del grupo que consiste en:



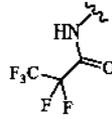
45 Los restos específicos mencionados anteriormente pueden combinarse con cualquier descripción de un grupo R₁, R₄, R₆, R₇ o R₈ como se describe en la presente descripción.

En cualquiera de las modalidades descritas anteriormente, R₄ puede seleccionarse del grupo que consiste en:



y

5



En ciertas modalidades, R₄ se selecciona del grupo que consiste en -NHAc, -NHC(O)CH₂(CH₃)₂, -NHC(O)CF₃ y -NHC(O)CH₂CH₃.

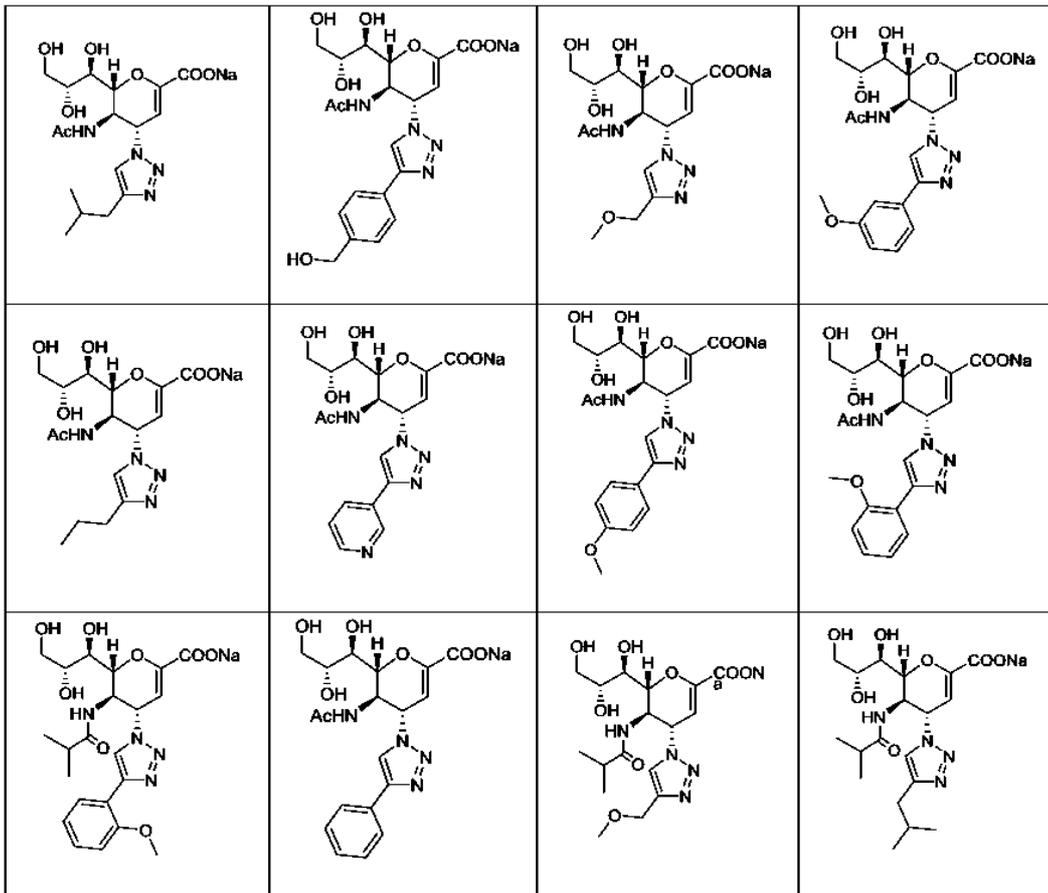
10

En cualquier modalidad de los compuestos de fórmula (I) o (II), R₆, R₇ y R₈ pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en OH, alcoxi C₁-C₃ y -OC(O)R₁₈ en donde R₁₈ es alquilo C₁-C₃ opcionalmente sustituido.

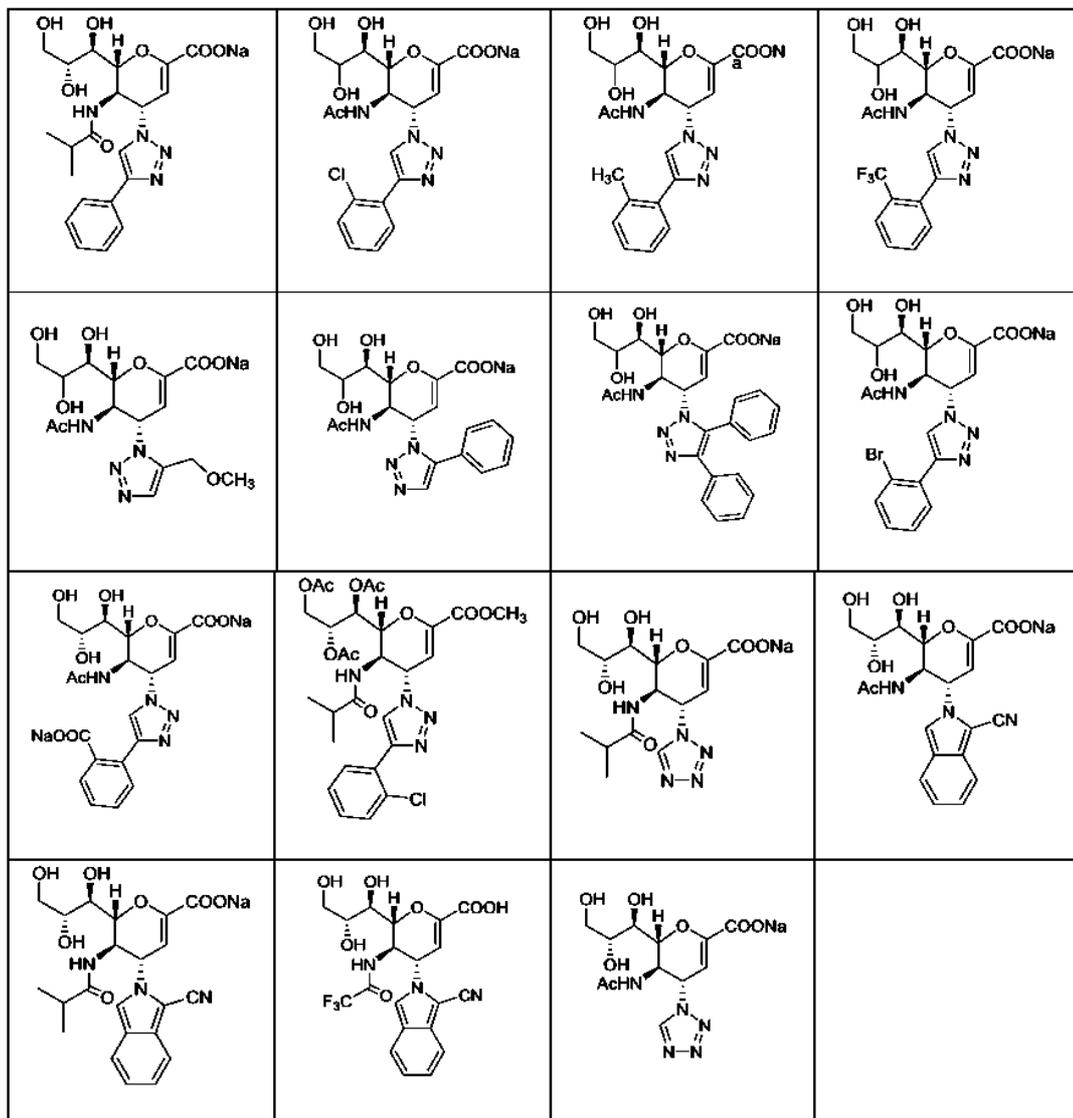
15

En cualquiera de las modalidades anteriores, R₆, R₇ y R₈ pueden seleccionarse independientemente de OH y OAc.

En las modalidades de fórmula (I) y fórmula (II) para usar en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal en un paciente, el compuesto puede seleccionarse del grupo que consiste en:



5
10
15
20
25
30
35
40



45 y todos sus análogos en C-2 en donde el grupo carboxi en C-2 está en forma protonada, en forma de sal de sodio o en forma de profármaco de éster C₁-C₃ y en donde puede considerarse que cada compuesto tiene análogos cercanos descritos en donde la posición de R₄ se sustituye explícitamente con cualquier grupo -NHC(O)R en donde R es alquilo C₁-C₄ o haloalquilo.

50 Una persona experta en la técnica de la química sintética apreciará que el grupo COOH se intercambia fácilmente con una forma de sal o un grupo protector de éster, por ejemplo, un grupo éster metílico, por lo que se considera que todas estas formas se describen en la presente descripción con referencia a los compuestos mencionados anteriormente.

55 En una modalidad específica de fórmula (I) o fórmula (II), en donde R₄ es NHAc y R₃ es un triazol sustituido, entonces el triazol no está sustituido con un grupo carboxilo.

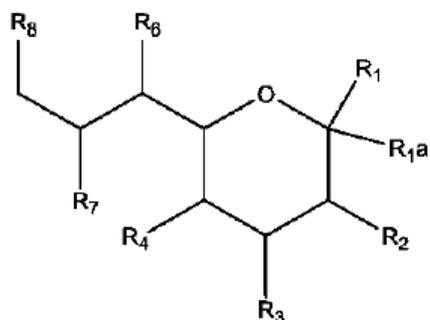
En otra modalidad específica de fórmula (I) o fórmula (II), en donde R₄ es NHAc y R₃ es un triazol sustituido solo en la posición 4 del anillo de triazol (la posición 1 es el nitrógeno del anillo unido al núcleo de ácido neuramínico), entonces el triazol no está sustituido con propilo, propilo sustituido, *tert*-butilo sustituido o dietoxialquilo.

60 En una modalidad, el compuesto del primer aspecto es un modulador de hemaglutinina y/o neuraminidasa. Preferentemente, un inhibidor de hemaglutinina y/o neuraminidasa.

65 En una modalidad, puede preferirse que el inhibidor de la hemaglutinina y/o la neuraminidasa sea un inhibidor de la hemaglutinina y/o la neuraminidasa de virus de la gripe o paragrípala. De acuerdo con la invención, el inhibidor de hemaglutinina y/o neuraminidasa es un inhibidor de hemaglutinina y/o neuraminidasa de un virus paragrípala.

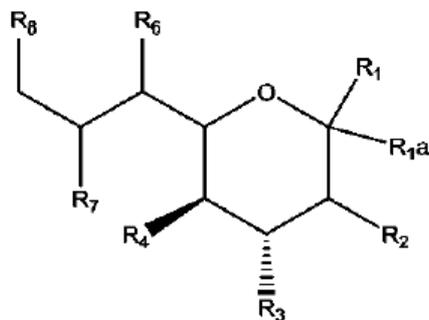
En un aspecto alternativo, denominado en la presente descripción como el aspecto de "difluoro", la descripción se refiere a un compuesto de fórmula (III) o (IIIa), o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

5



Fórmula (III)

10



Fórmula (IIIa)

15

20

en donde, R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, o una sal de este, C(O)NR₉R₁₀, C(O)OR₁₁, P(O)(OH)₂ y P(O)(OR₁₁)₂;

R_{1a} y R₂ son flúor;

R₃ se selecciona del grupo que consiste en un grupo heterocíclico unido a N, -NHC(O)NHR₁₂, -NHC(O)R₁₃ y -NHS(O)₂R₁₄ opcionalmente sustituidos;

R₄ se selecciona del grupo que consiste en NR₁₅R₁₆ y NHC(O)R₁₇; y

25

R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, NH₂, alquilo C₁-C₆, NR₁₈R_{18'}, alcoxi C₁-C₆, -OC(O)R₁₈, -NH(C=O)R₁₈ y S(O)_nR₁₈, en donde n = 0 - 2 y cada R₁₈ y R_{18'} son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido.

30

En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, o una sal de este, y COOR₁₁ en donde R₁₁ es alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido.

En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa), R₁₁ se selecciona de metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, sec-butilo, isobutilo, *terc*-butilo y pentilo.

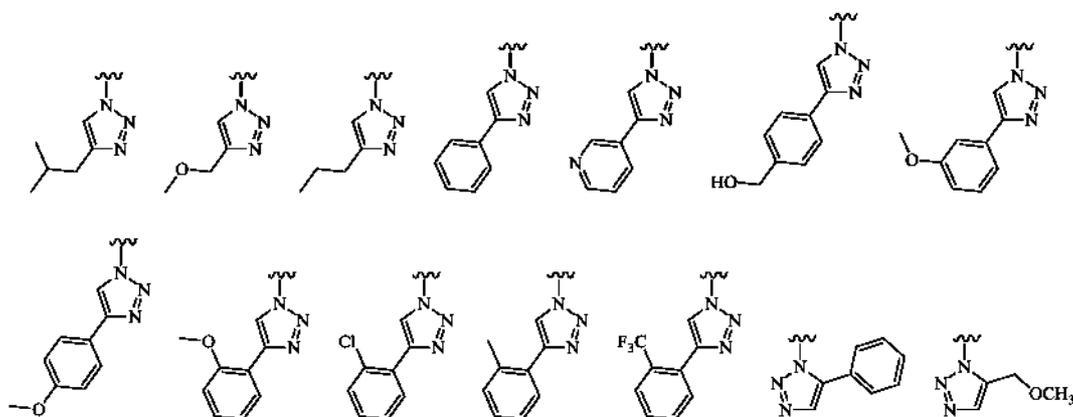
35

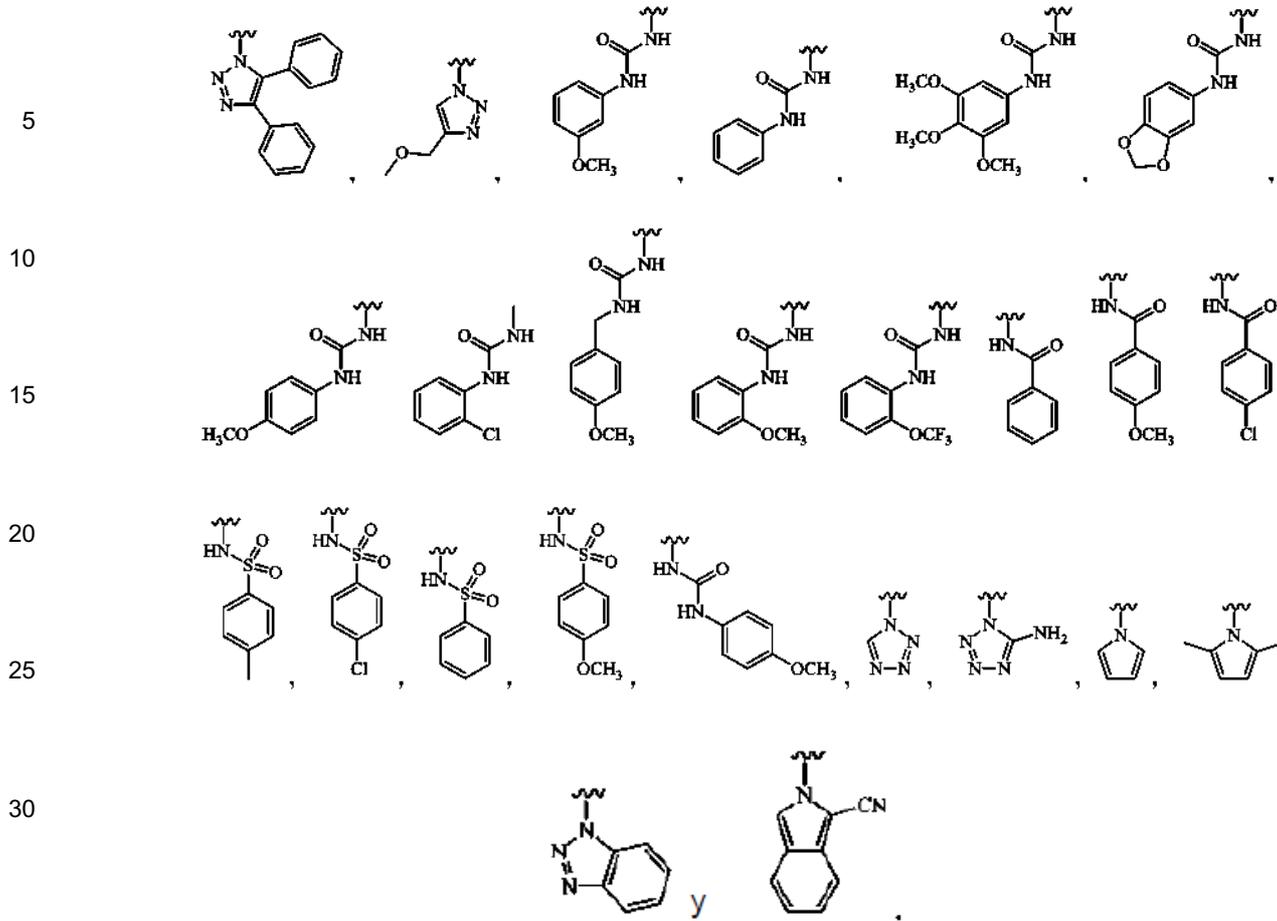
En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R₁₂, R₁₃ y R₁₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en bencilo y fenilo opcionalmente sustituidos.

En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa), R₃ se selecciona del grupo que consiste en pirazol, imidazol, indol, isoindol, triazol, benzotriazol, tetrazol, pirimidina, piridina, pirazina, diazina, triazina y tetrazina, todos los cuales pueden estar opcionalmente sustituidos y se unen al núcleo a través de un anillo de nitrógeno.

40

En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa), R₃ se selecciona del grupo que consiste en:

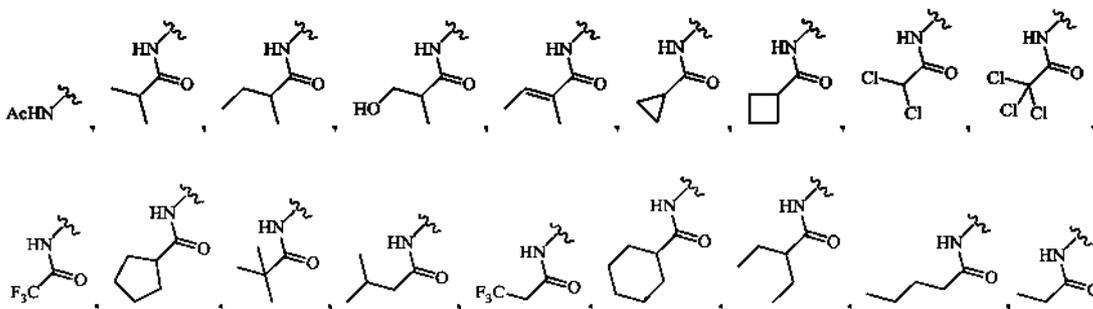




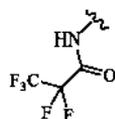
En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa), R_4 se selecciona del grupo que consiste en $NR_{15}R_{16}$ y $NHC(O)R_{17}$ y en donde R_{15} , R_{16} y R_{17} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_6 , haloalquilo C_1 - C_6 , alqueno C_1 - C_6 y cicloalquilo C_3 - C_6 opcionalmente sustituidos.

40 En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R_4 es $NHC(O)R_{17}$ y en donde R_{17} se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_6 , haloalquilo C_1 - C_6 y cicloalquilo C_3 - C_6 opcionalmente sustituidos.

En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa), R_4 se selecciona del grupo que consiste en:



y



En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R_4 se selecciona de -NHC(O)-metilo, -NHC(O)-etilo, -NHC(O)-propilo, -NHC(O)-isopropilo, -NHC(O)-*n*-butilo, -NHC(O)-*sec*-butilo, -NHC(O)-isobutilo, -NHC(O)-*terc*-butilo y -NHC(O)-pentilo.

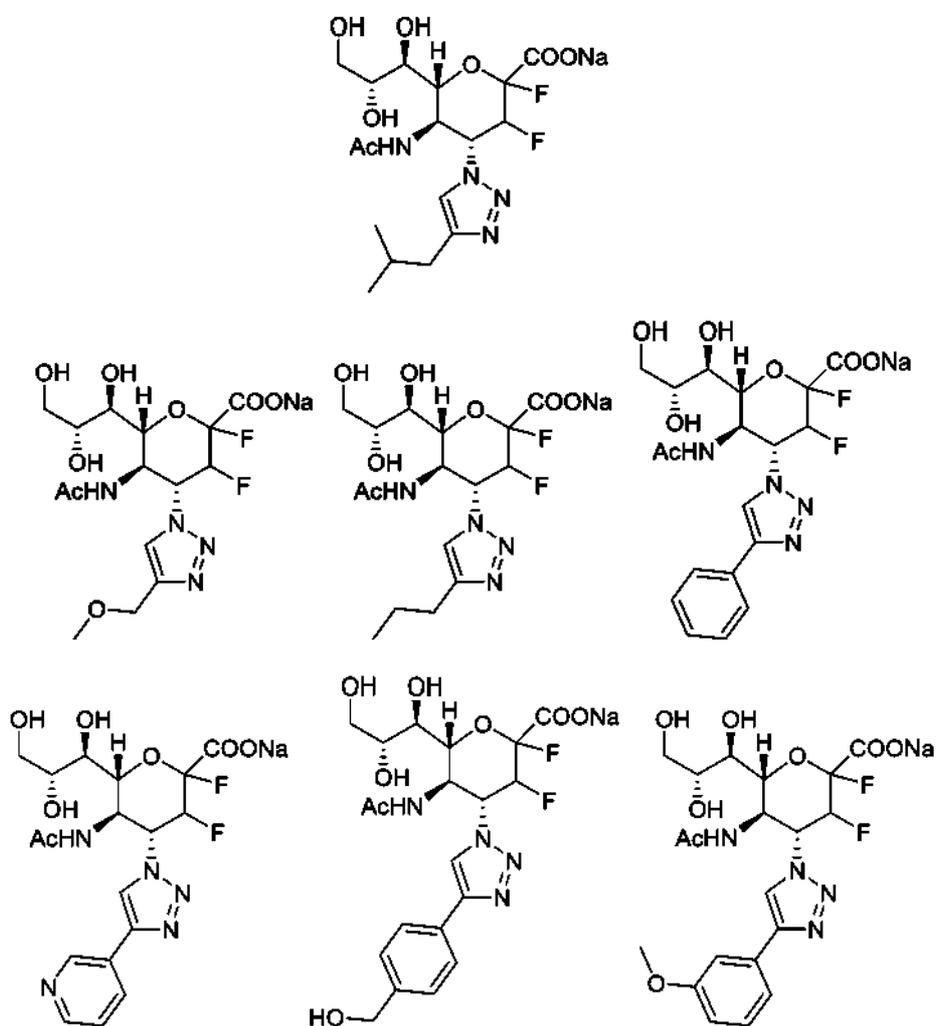
5 En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R_5 es alquilo C_1 - C_6 o alqueno C_1 - C_6 cada uno de los cuales puede estar opcionalmente sustituido.

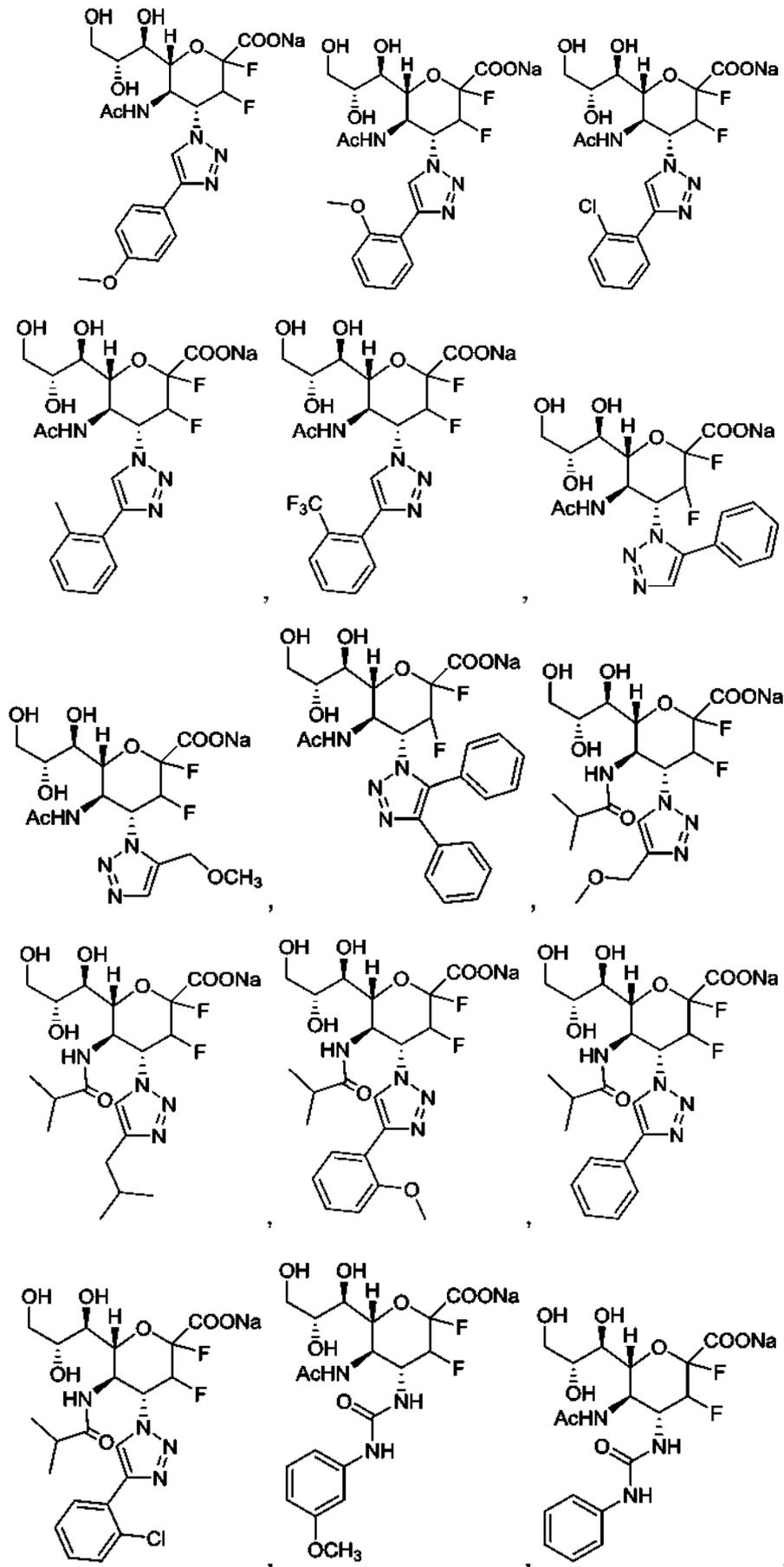
En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R_5 es alquilo C_1 - C_6 sustituido con hidroxilo o hidroxilo protegido.

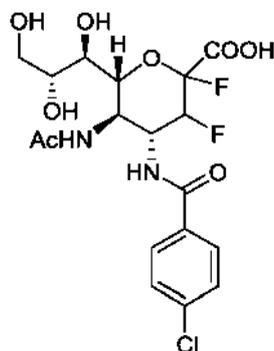
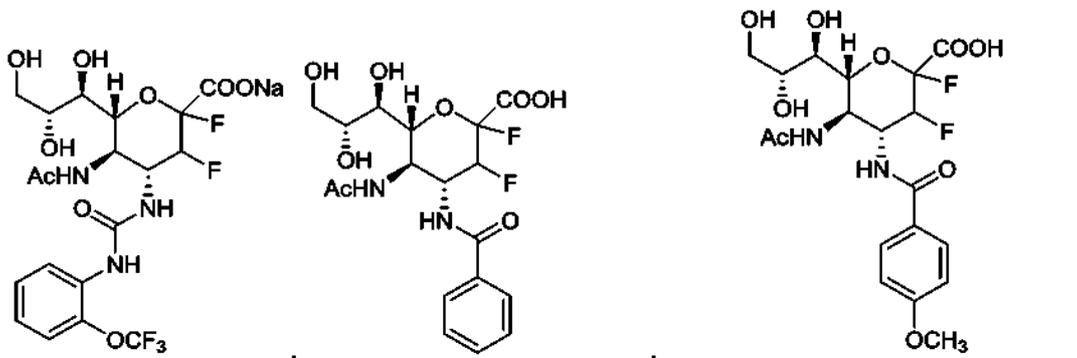
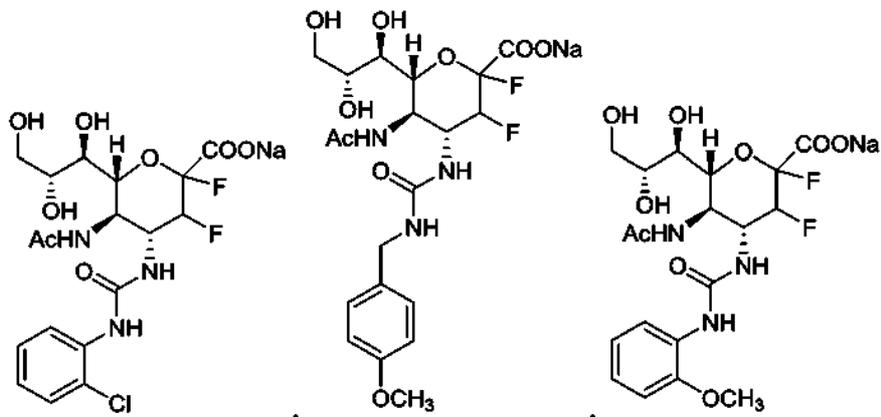
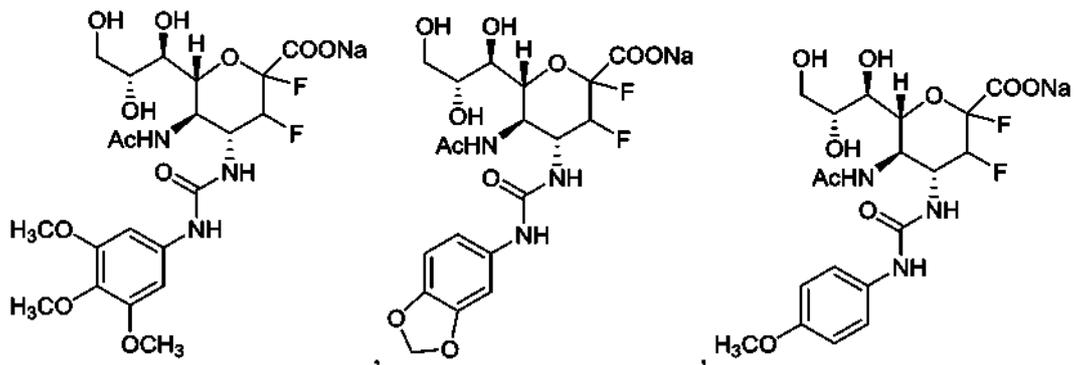
10 En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan independientemente de OH, alcoxi C_1 - C_{10} y -OC(O) R_{18} en donde R_{18} es alquilo C_1 - C_{10} .

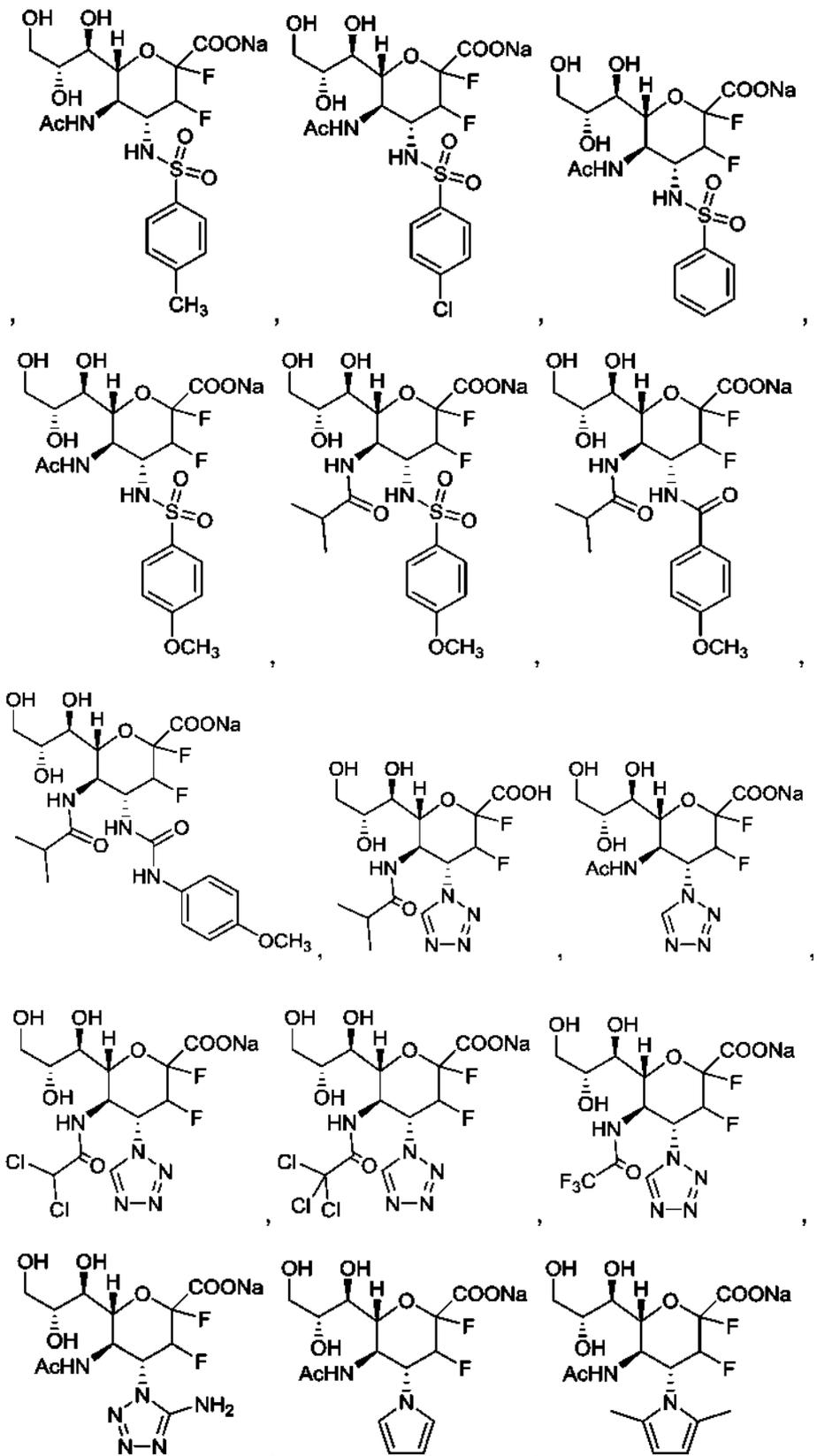
En un aspecto de la fórmula (III) o fórmula (IIIa) R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan independientemente de OH y OAc.

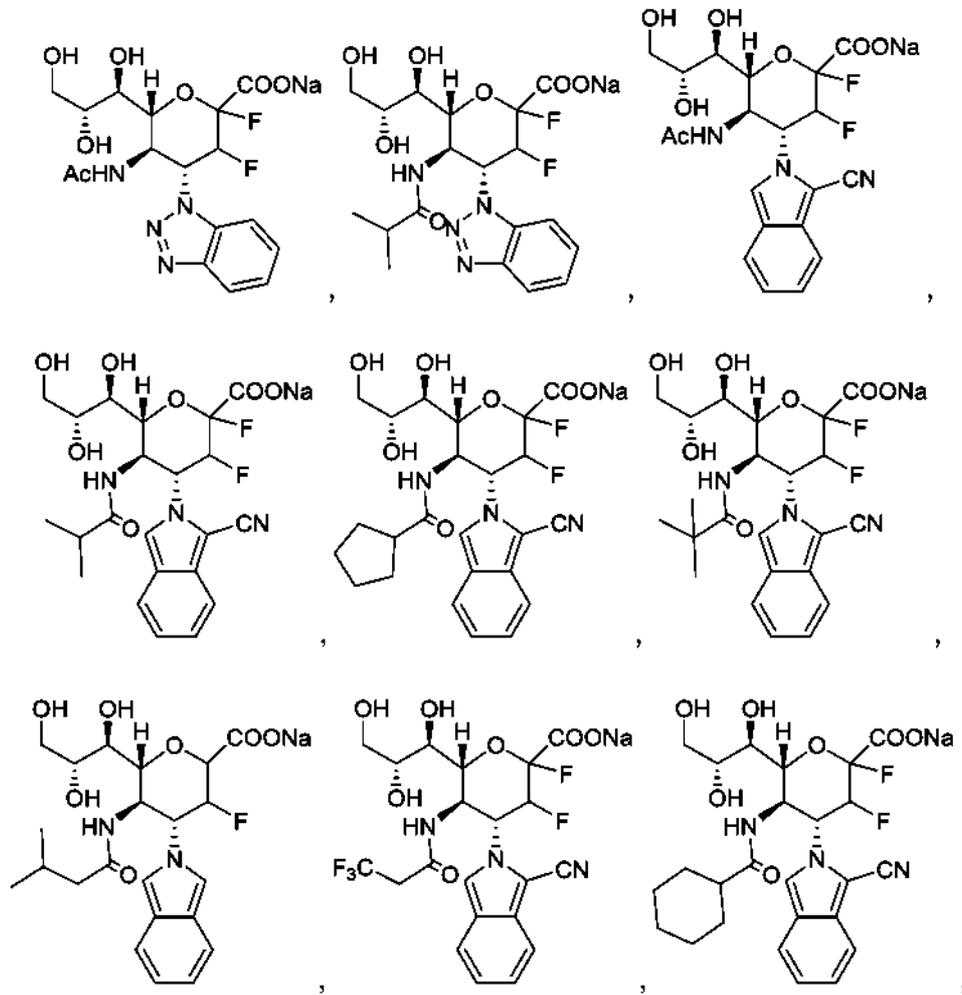
15 En un aspecto del aspecto de difluoro, el compuesto de fórmula (III) o fórmula (IIIa), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se selecciona del grupo que consiste en:



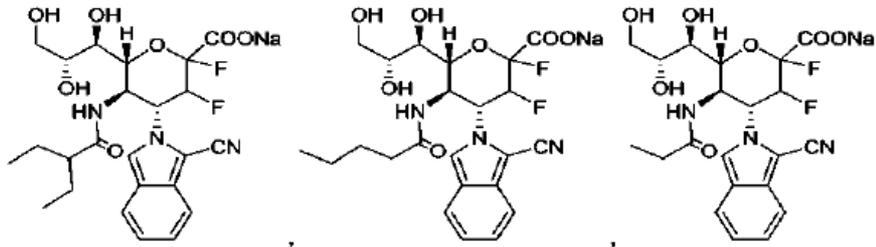






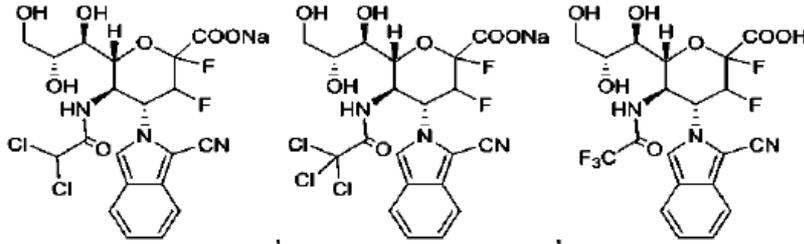


5



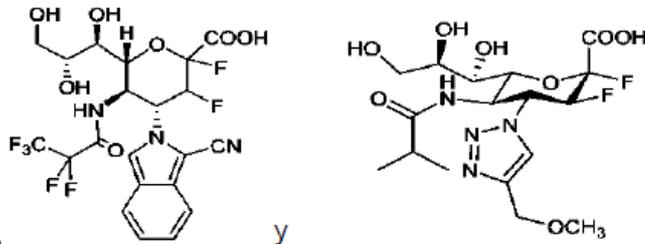
10

15



20

25



30

en donde cada incidencia de COOH puede leerse indistintamente con COONa, y *viceversa*.

35

En cualquiera de los aspectos anteriores de fórmula (III) o fórmula (IIIa) puede ser que R₃ no sea arilo unido a N, es decir, un anillo de arilo unido al núcleo a través de un átomo de nitrógeno intermedio.

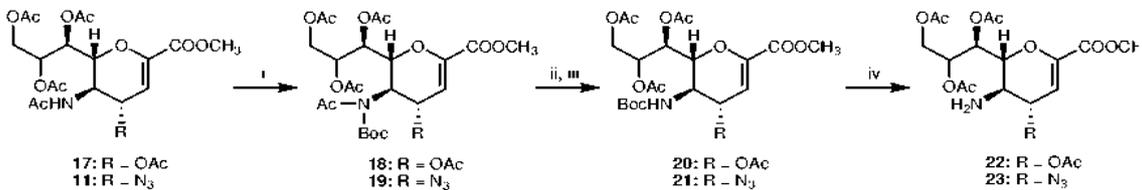
40

Se postula que los compuestos como los representados por las fórmulas (III) y (IIIa), en donde hay un patrón de sustitución de flúor en C-2 y 3, pueden ser particularmente eficaces contra las cepas de virus antigripales. Sin desear estar sujetos a ninguna teoría en particular, se cree que dichos compuestos son activos porque son inhibidores efectivos de la neuraminidasa viral.

45

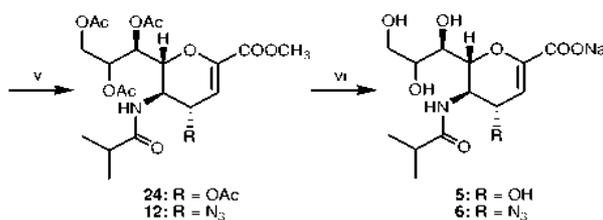
Se pueden emplear varias vías sintéticas para acceder a los compuestos de la invención. El esquema 1, a continuación, muestra una vía mediante la cual se sintetizaron ciertos inhibidores de neuraminidasa conocidos para usar como compuestos de referencia. Las técnicas sintéticas de interés, que también se pueden aplicar a la síntesis de compuestos del primer aspecto, se describen en Carbohydr. Res. 244, 181-185 (1993); Carbohydr. Res. 342, 1636-1650 (2007); Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 5009-5013 (2006); y la solicitud PCT WO2002076971.

50



55

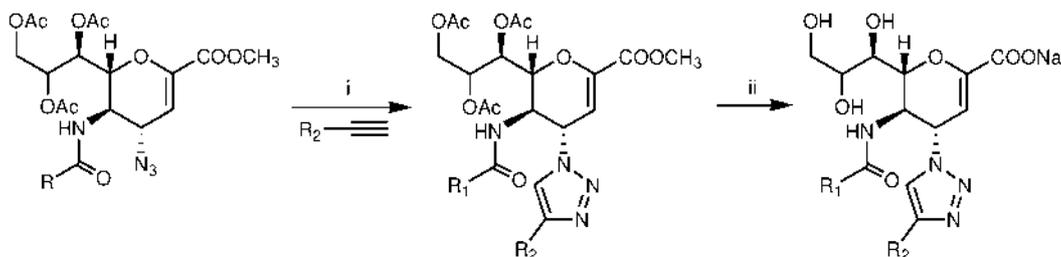
60



65

Esquema 1: i) (Boc)₂O, DMAP, THF, 60 °C, durante toda la noche, (**18**, 71 %; **19**, 96 %) (ii) NaOCH₃/CH₃OH, ta, 1 h; (iii) Ac₂O, piridina, ta, durante toda la noche, (**20**, 81 %; **21**, 63 % durante 2 etapas) (iv) TFA, DCM, t.a, durante toda la noche, (**22**, 90 %; **23**, 85 %) (v) Cloruro de isobutirilo, Et₃N, DCM, ta, 4 h, (**24**, 84 %; **12**, 91 %) (vi) NaOH, MeOH/H₂O (1:1), ta, durante toda la noche, (**5**, 94 %; **6**, 82 %).

El esquema 2, a continuación, muestra una vía sintética utilizada para acceder a los compuestos 7-10 que son compuestos preferidos del primer aspecto.



11: R = Metilo

12: R = Isopropilo

13: R₁ = Metilo, R₂ = CH₂OCH₃

14: R₁ = Metilo, R₂ = Ph

7: R₁ = Metilo, R₂ = CH₂OCH₃

8: R₁ = Metilo, R₂ = Ph

15: R₁ = Isopropilo, R₂ = CH₂OCH₃

16: R₁ = Isopropilo, R₂ = Ph

9: R₁ = Isopropilo, R₂ = CH₂OCH₃

10: R₁ = Isopropilo, R₂ = Ph

Esquema 2: (i) CuSO₄, ascorbato de Na, *terc-butanol*/H₂O (1:1), 45 °C, 6 h (**13**, 78 %; **14**, 82 %; **15**, 71 %; **16**, 84 %); (ii) NaOH, MeOH/H₂O (1:1), rt, durante toda la noche (**7**, 85 %; **8**, 96 %; **9**, 92 %; **10**, 89 %).

En resumen, la síntesis de los triazoles **7-10** se logró mediante el uso de los intermediarios conocidos **11** y **12** basados en 4-azido-4-desoxi-Neu5Ac2en. Cada uno de los dos intermediarios se expuso a metilpropargil éter o etinilbenceno en condiciones típicas de clic para el acoplamiento azida-alquino (al calentar una mezcla del derivado 4-azido-4-desoxi-Neu5Ac2en, alquino, CuSO₄ y ascorbato de sodio en una mezcla (1:1) de agua y *terc-butanol* durante 6 h) para proporcionar el derivado de triazol (figura 1). Los triazoles **13** y **14** (a partir de **11**) y los derivados de triazol **15** y **16** (a partir de **12**) se aislaron con rendimientos del 78 %, 82 %, 71 % y 84 %, respectivamente. Los derivados de triazol per-O-acetilados resultantes **13-16** se desprotegeron después por tratamiento con metanol acuoso (50 %) ajustado a pH 13-14 a RT durante 24 h para producir los productos finales **7-10** como sales de sodio en rendimientos del 85 %, 96 %, 92 % y 89 %, respectivamente.

Los objetivos sintéticos fueron, en parte, impulsados por la información obtenida de la modelación molecular de la estructura cristalina de HN de hPIV-3. Particularmente, el bucle 216 de la HN de hPIV-3 indica una flexibilidad importante y, por lo tanto, se postuló que los derivados de Neu5Ac2en con sustituyentes en C4 algo voluminosos podrían acomodarse y bloquear la cavidad 216 dentro del sitio activo. Se emplearon simulaciones de Dinámica Molecular (DM) para diseñar y evaluar derivados de Neu5Ac2en que incorporan triazoles con adición de grupos funcionales en C4, como base desde la cual probar la teoría. A partir del estudio inicial de la flexibilidad del bucle 216 y las dimensiones de la cavidad 216 resultantes, se consideró que los sustituyentes en C4 relativamente voluminosos en el molde basado en ácido neuramínico insaturado (compuestos **7-10** mostrados en la Figura 1) podrían tolerarse bien dentro de la cavidad 216 abierta. Además, la modelación de estos inhibidores sustituidos con triazol en C4 en complejo con HN de hPIV-3 indicó que tanto un resto acetamido (**7**, **8**) como un resto isobutiramido (**9**, **10**) en C5 en el molde también podrían acomodarse simultáneamente dentro del dominio de unión a C5. Se evaluó, mediante el uso de simulaciones de MD, la capacidad de los compuestos de triazol más voluminosos (**8** y **10**) para bloquear de manera eficiente el bucle 216 en HN de hPIV-3. Se determinaron las energías de interacción relativa de **8** y **10** en complejo con HN de hPIV-3 para predecir si se esperaba que el resto acilamino en C5 más voluminoso, en combinación con el sustituyente voluminoso en C4, mejoraría la afinidad del inhibidor.

La metodología de la modelación y la evaluación biológica se analizan en detalle en la sección experimental pero, brevemente, llevaron a una serie de conclusiones sobre la influencia de los sustituyentes en C4/C5 sobre la potencia del inhibidor. Dentro de cada uno de los dos grupos analizados, es decir, el Grupo 1 (acetamido en C5) y el Grupo 2 (isobutiramido en C5), se encontró que el orden de potencia sobre la base del sustituyente en C4 es el siguiente: hidroxilo <azido ≤ 4-metoximetiltriazol <4-feniltriazol. La inhibición más débil en ambos grupos se observó para los derivados 4-hidroxilo **2** y **5**. Este resultado apoya la idea de que el dominio de unión a C4, que acomoda el grupo hidroxilo en C4 en Neu5Ac2en (**2**), tiene un carácter hidrófobo importante y, en consecuencia, no favorece la interacción con un grupo hidrófilo polar incluido un grupo hidroxilo. La naturaleza hidrofóbica del bolsillo, combinada con el gran tamaño de la cavidad 216 creada por la abertura del bucle 216, favorece los inhibidores, incluidos los inhibidores **8** y **10**, que tienen el grupo hidroxilo en C4 reemplazado por sustituyentes hidrófobos voluminosos.

La comparación de los valores de IC₅₀ de ambos grupos reveló que el reemplazo del grupo acetamido en C5 con un grupo isobutiramido en todos los inhibidores preparados condujo a una mayor potencia en general. Típicamente, se observó una mejora cercana a un orden de magnitud, a excepción del inhibidor más potente **10**. Además, el análisis de los valores de IC₅₀ respalda la idea de que la mejora de la potencia en los mejores inhibidores, **8** y **10**, resulta predominantemente de la introducción del sustituyente en C4, y el sustituyente en C5 contribuyó en un grado mucho menor. Esta idea también se fundamenta en el análisis de datos de RMN STD que condujo a un mapa de epítomos del inhibidor **10** en donde los protones del resto 4-feniltriazol mostraron la contribución más fuerte al evento de unión de **10** en complejo con HN de hPIV-3, mientras que las interacciones relativas observadas para el grupo isobutiramido fueron menores (~50 %).

La potente inhibición de ambas funciones de HN (NI e HI) por el inhibidor **10** demuestra que el compuesto ejerce su efecto antiviral contra hPIV-3 por acción sobre la proteína HN clave del virus. Estos hallazgos están respaldados por los experimentos de RMN STD de **10** en complejo con virus intacto o proteína HN recombinante, que muestran claramente intensidades de señal de RMN STD idénticas para el resto aromático triazol en C4 del inhibidor. Además, el epítomo de unión calculado para **10** en complejo con HN de hPIV-3 está muy de acuerdo con las simulaciones de MD que predicen claramente el contacto cercano de los protones de fenilo del resto triazol en C4 y H3 del derivado de Neu5Ac2en con la superficie de la proteína.

Además, los resultados del ELISA *in situ* están de acuerdo con los datos del ensayo de NI e HI. Los ensayos basados en células LLC-MK2 demuestran que **10** es aún más potente a nivel celular en comparación con los ensayos de NI e HI basados en proteínas. En este ensayo basado en células, se encontró que **10** era ~26 veces más potente que **6**, mientras que los ensayos de inhibición de proteínas mostraron solo una mejora de ~8 y 11 veces en los ensayos de NI e HI, respectivamente. Esto sugiere fuertemente que **10** es un potente inhibidor de doble acción que deriva un sinergismo eficiente de la inhibición de las actividades neuraminidasa y hemaglutinina de la proteína. Esto está en contraste con el inhibidor conocido **6**, que deriva un efecto menos sinérgico como resultado de su inhibición significativamente menor de la actividad de hemaglutinina. Finalmente, el grado de inhibición del crecimiento viral en ambas líneas celulares humanas para el inhibidor **10** en comparación con **6** demuestra claramente la superioridad del ligando de diseño **10**.

Se apreciará que los compuestos del primer aspecto tienen eficacia más allá de la HN de hPIV-3. Se ha encontrado, como se indica en la sección experimental, que las variaciones en la estructura del compuesto pueden adaptar la actividad a diferentes neuraminidasas de hPIV o virus de la gripe en general. Por ejemplo, los derivados de difluoro descritos en la presente descripción pueden ser preferentemente activos contra ciertas neuraminidasas del virus de la gripe.

Particularmente, los resultados indican que no solo el compuesto **10** es un inhibidor mucho mejor que el compuesto BCX-2798 de la técnica anterior (compuesto de referencia **6**) en un ensayo de inhibición para comparar su capacidad para inhibir la infección y propagación del virus hPIV-3 en células LLC-MK2 por una reducción del 94 % frente al 14 %, respectivamente, sino que se ha demostrado que otros compuestos del primer aspecto tienen una potencia aún mayor que **10** o **6**. Por ejemplo, los inventores han diseñado, sintetizado y evaluado biológicamente los compuestos **IE1398-33** e **IE927-99**. Estos compuestos tienen valores de IC₅₀ para HN de hPIV-3 de 1,97 micromolar y 0,27 micromolar, respectivamente. Esto representa una mejora de 1 a 2 órdenes de magnitud sobre el compuesto de referencia de la técnica anterior BCX-2798. Estos resultados demuestran el sorprendente nivel de eficacia de los presentes compuestos y, por lo tanto, el valor del presente diseño de inhibidores guiado por la estructura.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), (II), o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Adecuadamente, la composición farmacéutica es para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección viral.

La composición farmacéutica puede incluir más de un compuesto de fórmula (I) o (II). Cuando la composición incluye más de un compuesto, los compuestos pueden estar en cualquier proporción. La composición puede comprender además coactivos, vehículos de suministro o adyuvantes conocidos.

El compuesto de fórmula (I) o (II) está presente en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para inhibir o mejorar la enfermedad, trastorno o afección que es objeto de tratamiento. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las formas de dosificación adecuadas y las proporciones de los compuestos y las composiciones farmacéuticas que los contienen.

Las formas de dosificación pueden incluir comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, soluciones, jarabes, pastillas para chupar, cápsulas y similares. Estas formas de dosificación también pueden incluir dispositivos de inyección o implantación diseñados específicamente, o modificados, para garantizar la colocación en el sitio de degradación del tejido conectivo. Un hidrogel es una forma de administración preferida.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un compuesto de fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente eficaz de este, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto, para usar en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus parainfluenza en un paciente.

En una modalidad, el virus paragripal es un virus hPIV-1, 2, 3 o 4.

Preferentemente, el paciente es un animal doméstico o de ganado o un ser humano.

La invención además se refiere a un método in vitro para modular la actividad de una enzima hemaglutinina y/o neuraminidasa de virus paragripales que incluye la etapa de poner en contacto la enzima con un compuesto de fórmula (I) o (II), o una sal farmacéuticamente eficaz de este, como se define en las reivindicaciones.

La siguiente sección experimental describe con más detalle la caracterización de algunos de los compuestos de la invención y su actividad antiviral. La intención es ilustrar ciertas modalidades específicas de los compuestos de la invención y su eficacia sin limitar la invención de ninguna manera.

Sección experimental

Química computacional

Las simulaciones de dinámica molecular se realizaron con el software GROMOS mediante el uso del conjunto de parámetros de campo de fuerza 54A4 (ref 39). Las coordenadas iniciales se tomaron de la estructura de rayos X (código de acceso de PDB 1V3E) de HN de hPIV-3 en complejo con **4** (figura 1). El compuesto **8** se superpuso a los átomos del anillo de zanamivir (**4**) a partir de la estructura cristalina. Los parámetros para **8** se generaron de manera análoga a los parámetros existentes en el campo de fuerza GROMOS. El número de átomos en el sistema compuesto final para 1V3E-**4** y 1V3E-**8** fue 78253 y 78084, respectivamente. Los estados de ionización de los residuos de aminoácidos se asignaron a pH 7,0. Las cadenas laterales de histidina se protonaron en el átomo N_ε. Las moléculas de agua asociadas con la estructura de rayos X se eliminaron y se reemplazaron por una solvatación explícita mediante el uso del modelo de agua de carga de punto simple (SPC) y las condiciones de contorno periódicas, de acuerdo con la metodología publicada anteriormente. En las simulaciones, se agregaron moléculas de agua alrededor de la proteína dentro de un octaedro truncado con una distancia mínima de 1,4 nm entre los átomos de la proteína y las paredes cuadradas de la caja periódica. Todos los enlaces se restringieron con una tolerancia geométrica de 10⁻⁴ mediante el uso del algoritmo SHAKE.

Se realizó una minimización de la energía de descenso más pronunciado del sistema para relajar los contactos soluto-disolvente, a la vez que se restringieron posicionalmente los átomos de soluto mediante el uso de una interacción armónica con una fuerza constante de 2,5 x 10⁴ kJ mol⁻¹ nm⁻². A continuación, se realizó la minimización de la energía de descenso más pronunciado del sistema sin restricciones para eliminar cualquier tensión residual. Las minimizaciones de energía se terminaron cuando el cambio de energía por paso se hizo menor que 0,1 kJ mol⁻¹. Para las interacciones no unidas, se usó un método de triple rango con radios de corte de 0,8/1,4 nm. Se evaluaron las interacciones electrostáticas y de van der Waals de corto alcance en cada paso de tiempo, sobre la base de una lista de pares de grupos de carga. Se evaluaron las interacciones electrostáticas y de van der Waals de rango medio, entre pares (grupo de carga) a una distancia mayor que 0,8 nm y menor que 1,4 nm, cada quinto paso de tiempo, momento en el cual se actualizó la lista de pares. Fuera del radio de corte más largo, se utilizó una aproximación del campo de reacción con una permitividad dieléctrica relativa de 78,5. El centro de movimiento de masa de todo el sistema se eliminó cada 1000 pasos de tiempo. El disolvente y el soluto se acoplaron independiente y débilmente a un baño de temperatura de 295 K con un tiempo de relajación de 0,1 ps.

Los sistemas también se acoplaron débilmente a un baño de presión de 1 atm con un tiempo de relajación de 0,5 ps y una compresibilidad isotérmica de 0,7513 x 10⁻³ (kJ mol⁻¹ nm⁻³)⁻¹. Las simulaciones de MD de períodos de 20 ps con restricción de posición armónica de los átomos del soluto y constantes de fuerza de 2,5 x 10⁴ kJ mol⁻¹ nm⁻², 2,5 x 10³ kJ mol⁻¹ nm⁻², 2,5 x 10² kJ mol⁻¹ nm⁻², 2,5 x 10¹ kJ mol⁻¹ nm⁻² se realizaron para equilibrar aún más los sistemas a 50 K, 120 K, 1800 K, 240 K y 300 K, respectivamente. Las simulaciones se llevaron a cabo durante 30 ns. Las coordenadas de trayectoria y las energías se guardaron cada 0,5 ps para su análisis. Las trayectorias de simulación para HN de hPIV-3 en complejo con **4** se produjeron de manera análoga a la descrita anteriormente y se utilizaron para el análisis y la comparación con los resultados obtenidos para HN de hPIV-3 en complejo con **8**.

Los análisis se realizaron con el software de análisis GROMOS++. Se calcularon las diferencias de la media cuadrática de las posiciones de átomos (RMSD) entre las estructuras para los residuos que comprenden el bucle 216 (residuos 210-221) mediante la realización de un ajuste de mínimos cuadrados de las posiciones de átomos rotacionales y traslacionales de una estructura en la segunda estructura (de referencia) mediante el uso de un conjunto dado de átomos (N, C_α, C). Las fluctuaciones de la media cuadrática de las posiciones de átomos (RMSF) se calcularon como un promedio de un período de simulación de 30 ns mediante la realización de un ajuste de mínimos cuadrados de las posiciones de átomos rotacionales y traslacionales de los átomos C_α de las estructuras de trayectoria en la referencia. Las RMSF se calcularon para todos los residuos, incluido el bucle 216 (residuos 210-221). Para obtener conjuntos estructurales reducidos y representativos para las simulaciones, se realizó una agrupación conformacional basada en RMSD.

Las estructuras extraídas cada 10 ps de las simulaciones se superpusieron en los átomos C_α de la cadena principal para eliminar la rotación y la traslación generales. La agrupación de todos los átomos de residuos que recubren el sitio de unión (residuos 190-198, 210-221, 251-259, 274-280, 320-326, 334-339, 369-377, 407-413, 474-480, 529-533) se realizó para comparar poblaciones estructurales relativas de la proteína HN de hPIV-3 a partir de las diferentes trayectorias de

simulación. El criterio de similitud aplicado fue la RMSD de todos los átomos de estos residuos con un límite de 0,13 nm. Se extrajeron las estructuras finales resultantes de los 30 ns de simulaciones de MD. Las energías de interacción entre HN de hPIV-3 y los inhibidores **8** y **10** se calcularon mediante el uso de energías generadas por GROMOS, derivados λ de energía libre y promedios de bloque como archivos de trayectoria separados, denominados trayectoria de energía. El programa *ene_ana* se utilizó para extraer los valores de energía de interacción individual, como las contribuciones no unidas, es decir, interacciones de van der Waals y Coulomb, a partir de estos archivos. Por lo tanto, estas contribuciones entre el ligando y la proteína se extrajeron de la trayectoria energética resultante de la simulación y las energías de interacción calculadas. La estimación del error se calculó a partir de los promedios de bloques de tamaños crecientes extrapolando a bloques de tamaño infinito. Se analizaron las interacciones hidrofóbicas y se creó un mapa de interacciones entre el inhibidor **10** y HN de hPIV-3 mediante el uso de LIGPLOT. Para medir la extensión de la abertura de la cavidad para estructuras seleccionadas, el volumen del bolsillo se analizó mediante el uso de POVME. Es importante destacar que los tiempos de simulación extendidos, hasta 80 ns, proporcionaron resultados totalmente consistentes con los datos presentados.

15 Compuesto **8** como modelo de un inhibidor de HN de hPIV-3 basado en Neu5Ac2en con un sustituyente voluminoso en C4

La simulación de la estructura cristalina de HN de hPIV-3 disponible (código de acceso de PDB 1V3E) en complejo con **8** permitió un análisis del comportamiento dinámico de la proteína con respecto a la estructura unida a zanamivir (**4**). Las desviaciones de la media cuadrática de las posiciones de átomos (RMSD) de los átomos de la cadena principal de HN de hPIV-3 (C α , N, C) para el bucle 216 a partir de las simulaciones de los complejos de HN de hPIV-3 con **4** y con **8** mostraron que el bucle 216 sufre desviaciones más significativas de la estructura cristalina en el caso del complejo HN de hPIV-3-**8**. Se observan valores de RMSD mayores que 0,5 nm para la simulación del complejo HN de hPIV-3-**8**, mientras que la estructura se desvía menos (0,4 nm) para el complejo HN de hPIV-3-**4**. Esta idea se ve respaldada por las fluctuaciones de la media cuadrática (RMSF) observadas para los átomos C α de la cadena principal para los residuos asociados con el bucle 216 (residuos 205-225). Se observan mayores fluctuaciones de RMS para los residuos de la segunda mitad del bucle 216 (215-220), donde se alcanzan valores de \sim 0,3 nm, lo que indica un reordenamiento conformacional importante dentro de ese dominio en comparación con la estructura por rayos X de la referencia inicial de HN de hPIV-3 (código de acceso de PDB 1V3E). La Tabla 1 muestra una selección de valores de RMSF de residuos comprendidos en el bucle 216.

30 Tabla 1: Fluctuaciones de la media cuadrática (RMSF) de residuos seleccionados comprendidos en el bucle 216 para los sistemas simulados 1V3E-**4** y 1V3E-**8**, en nanómetros, en comparación con la estructura de rayos X de referencia 1V3E

Residuo	Estructura de rayos X de referencia (1V3E)	1V3E- 4	1V3E- 8
210	0,036	0,059	0,056
212	0,046	0,104	0,141
214	0,048	0,093	0,109
216	0,057	0,111	0,162
218	0,060	0,134	0,289
220	0,041	0,070	0,079

Los datos sugieren que la flexibilidad del bucle, presente en condiciones de simulación fisiológicas, se ha subestimado significativamente en las estructuras cristalinas y ofrece una oportunidad para el descubrimiento de fármacos contra virus paragripales. La comparación de las simulaciones del complejo HN de hPIV-3-**4** y del complejo HN de hPIV-3-**8** demuestra que el sustituyente en C4 en **8** induce un movimiento significativo en el bucle 216 de HN de hPIV-3. La abertura inducida del bucle pudo verse a partir de las áreas de superficie accesibles al disolvente de las estructuras finales obtenidas de simulaciones de 10 ns del complejo HN de hPIV-3-**4** y **8**.

Se identificaron los grupos conformacionales más poblados de las simulaciones de MD de HN de hPIV-3 en complejo con **4** y **8** y se generó la superposición de las conformaciones finales de las simulaciones de HN de hPIV-3 en complejo con **4** y **8**. La diferencia en la conformación del bucle 216 pudo verse claramente. La cavidad del bucle 216 adopta una conformación más abierta cuando está en complejo con el inhibidor **8** más afectado estéricamente. En general, se observa una cavidad más amplia para la simulación del complejo HN de hPIV-3-**4**. El grupo más poblado de la simulación del complejo HN de hPIV-3-**4** tiene un volumen de cavidad ligeramente menor (654 Å³) en comparación con el complejo simulado hPIV-3-**8** (717 Å³).

Para evaluar si un resto acilamino en C5 más voluminoso se acomodaría en presencia del triazol funcionalizado en C4, se realizó un análisis idéntico de **10** en complejo con HN de hPIV-3. Este análisis indicó que un resto isobutiramido en C5 se acomoda bien dentro del dominio de unión a C5 en presencia del triazol funcionalizado en C4.

65 Energías de interacción relativa de **8** y **10** en complejo con HN de hPIV-3

Para cuantificar el grado de compromiso del inhibidor con HN de hPIV-3, se utilizó un enfoque de simulaciones de MD para determinar las energías de interacción teóricas promediadas para el inhibidor conocido **2**, así como los nuevos inhibidores con acetamido en C5 e isobutiramido en C5, **8** y **10** respectivamente. Se determinaron los valores promedio de la energía de interacción (E_{avi}) de $-609,38 \pm 10,92 \text{ kJ mol}^{-1}$, $-733,96 \pm 15,49 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $-821,88 \pm 10,93 \text{ kJ mol}^{-1}$ para **2**, **8** y **10** respectivamente en complejo con HN de hPIV-3 (1V3E)²⁵. Estos cálculos apoyan la idea de que la sustitución del resto acetamido en **8** con un resto isobutiramido en **10** mejora significativamente el valor E_{avi} absoluto del inhibidor en complejo con la proteína. En consecuencia, se predice que **10** es un inhibidor de HN de hPIV-3 más potente que **8**. Un análisis posterior de la simulación de MD y la extracción de la estructura con menor energía de interacción ($-1,078,13 \text{ kJ mol}^{-1}$) de **10** en complejo con HN de hPIV-3 (1V3E) reveló que **10** realiza varias interacciones clave dentro del bolsillo de unión (**Fig. 3d**). Cabe destacar la interacción electrostática entre el carboxilato del ligando y el grupo triarginilo (Arg192, Arg424, Arg502), las interacciones por enlaces de hidrógeno entre el grupo hidroxilo en C7 y Glu276 y el isobutiramido en C5 NH y Tyr337 y Glu409. Además, se observan interacciones hidrófobas adicionales para las funcionalidades aromáticas en C4 e isobutilo en C5, particularmente con la cadena principal peptídica, dentro de los dominios de unión a C4 y C5 respectivamente.

15
Química

Métodos generales

20 Los reactivos y los disolventes secos se compraron de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional. Las reacciones anhidras se llevaron a cabo en atmósfera de argón en cristalería secada al horno. Las reacciones se controlaron mediante el uso de cromatografía en capa fina (TLC) en placas de aluminio prerrecubiertas con gel de sílice 60 F254 (E. Merck). Las placas reveladas se observaron bajo luz UV a 254 nm y luego se visualizaron después de la aplicación de una solución de H_2SO_4 en EtOH (5 % v/v) seguido de carbonización. La cromatografía ultrarrápida se realizó en gel de sílice 60 (0,040 - 0,063 mm) mediante el uso de disolventes destilados. Se registraron espectros de RMN ^1H y ^{13}C a 300 y 75,5 MHz respectivamente en un espectrómetro BrukerAvance 300 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en partes por millón, en relación con el pico de disolvente residual como referencia interna [CDCl_3 : 7,26 (s) para ^1H , 77,0 (t) para ^{13}C ; DMSO: 2,50 (pent) para ^1H , 39,51 (hept) para ^{13}C ; D_2O : 4,79 (s) para ^1H]. Se realizaron experimentos 2D COSY y HSQC para apoyar las tareas. Los espectros de masas de baja resolución (LRMS) se registraron, en modo de ionización por electrospray, en un espectrómetro BrukerDaltonics Esquire 3000 ESI, mediante el uso del modo positivo. La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) se registró para los derivados finales protegidos o desprotegidos, y se llevó a cabo por la instalación FTMS de la Universidad de Queensland en un MS micrO-TOF-Q70 con Transformada de Fourier BrukerDaltonics Apex III 4.7e o por la instalación de FTMS de la Universidad Griffith en un MS con Transformada de Fourier BrukerDaltonics Apex III 4.7e MS, equipado con una fuente de ESI Apollo.

35 Los derivados finales del ácido siálico desprotegidos se purificaron en una columna C18-Aq SPE GracePure™ (5000 mg/20 ml) mediante el uso de acetonitrilo al 2 %/ H_2O como disolvente. Se determinó que la pureza de todos los intermediarios sintéticos después de la purificación cromatográfica fue > 90 % por espectroscopía de RMN ^1H y ^{13}C y la pureza de los compuestos de referencia sintetizados para fines de detección (**2**, **3**, **5**, **6**), así como se determinó que para los productos novedosos finales **7-10**, fue ≥ 95 %.

Síntesis

45 La síntesis de los intermediarios **11**, **12** y **17-24** y los inhibidores de referencia **2**, **3**, **5** y **6** se logró mediante los procedimientos de la literatura. Los métodos generales se exponen en los Esquemas 1 y 2 que permiten el acceso a todos los compuestos descritos y sintetizados en la presente descripción.

50 *Procedimiento general para la síntesis de 18 y 19:* Una mezcla de **17** u **11** (0,42 mmol), Boc_2O (275 mg, 1,27 mmol) y DMAP (50 mg, 0,42 mmol) en THF anhidro (5 ml) se agitó en atmósfera de argón a 60 °C durante toda la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó al vacío y el residuo se recogió en diclorometano (DCM) para la separación cromatográfica en una columna de gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:hexano (1:2) como disolvente para producir **18** puro (170 mg, 71 %) o **19** (225 mg, 96 %).

55 *Procedimiento general para la síntesis de 20 y 2:* a una solución metanólica de NaOMe, recién preparada mediante la disolución de metal de sodio (0,39 mmol, 9 mg) en MeOH anhidro (5 ml), se le añadió el compuesto **18** o **19** (0,26 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se inactivó con resina Amberlite® IR-120 (H^+) (a pH = 5). La resina se filtró, se lavó con MeOH (5 ml x 3) y el filtrado y los lavados combinados se evaporaron al vacío. El residuo se redisolvió en piridina (2 ml) y se añadió anhídrido acético (0,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a rt en una atmósfera de argón durante toda la noche y después el disolvente y el exceso de Ac_2O se eliminaron al vacío. Finalmente, el residuo se recogió en DCM para la separación cromatográfica en una columna de gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:hexano (1:2) como disolvente para producir **20** puro (112 mg, 81 %) o **21** (84 mg, 63 %).

65 *Procedimiento general para la síntesis de 22 y 23:* a una solución de **20** o **21** (0,15 mmol) en DCM anhidro (2 ml) se le añadió TFA (230 μl , 3,0 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo argón durante toda la noche. La reacción se diluyó con DCM (20 ml) y se inactivó con solución ac. sat. de NaHCO_3 (20 ml). La capa de DCM se lavó con agua, salmuera, se secó después sobre Na_2SO_4 anhidro. El disolvente orgánico seco se concentró al vacío y se purificó por

5 cromatografía en gel de sílice mediante el uso del sistema disolvente adecuado para producir **22** puro (58 mg, 90 %) o **23** (53 mg, 85 %).

5 *Procedimiento general para la síntesis de 24 y 12:* A una solución de **22** o **23** (0,116 mmol) en DCM (2 ml) en atmósfera de argón se añadió Et₃N (82 µl, 0,58 mmol) y cloruro de isobutirilo (18 µl, 0,17 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y después se cargó en una columna de gel de sílice para la separación cromatográfica mediante el uso de acetato de etilo:hexano (1:1) como disolvente para producir **24** puro (50 mg, 84 %) o **12** (51 mg, 91 %).

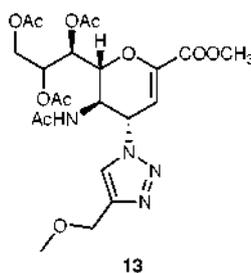
10 *Procedimiento general para la síntesis de 5 y 6:* A una suspensión del compuesto **24** o **12** (0,08 mmol) en una mezcla 1:1 de MeOH:H₂O (2 ml) a 0 °C se añadió gota a gota una solución de NaOH (1,0 M) hasta pH ~ 14. La temperatura se elevó gradualmente hasta la temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la solución se acidificó con resina Amberlite® IR-120 (H⁺) (a pH = 5), se filtró y se lavó con MeOH (10 ml) y H₂O (10 ml). El filtrado y los lavados combinados se concentraron al vacío y el residuo se diluyó con agua destilada (5 ml) y se ajustó a pH = 8,0 mediante el uso de NaOH 0,05 M para convertir el compuesto en su sal de sodio. Los compuestos se purificaron después en un cartucho C18-GracePure™ mediante el uso de acetonitrilo/agua al 2 % como disolvente para producir **5** puro (26 mg, 94 %) o **6** (24 mg, 82 %) como polvos blancos esponjosos.

20 *Procedimiento general para la síntesis de 13-16:* El derivado apropiado de 4-azido-4-desoxi-Neu5Ac2en (**11** o **12**, 0,22 mmol) y el derivado de etinilo correspondiente (0,33 mmol) se disolvieron en una mezcla 1:1 de *tert*-butanol:H₂O (4 ml). Se añadió sulfato de cobre (II) pentahidrato (4 mg, 0,015 mmol) a la mezcla seguido por ascorbato de sodio (0,1 ml de solución recién preparada 1 M en H₂O). La mezcla se agitó a 45 °C durante 6 h y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, la mezcla se diluyó con DCM (100 ml), se lavó con NH₄OH al 10 % (50 ml), seguido de salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a vacío para dar los productos brutos **13-16**, que se purificaron por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un sistema disolvente apropiado.

25 *Procedimiento general para la síntesis de 7-10:* A una suspensión del derivado de triazol protegido **13-16** en una mezcla 1:1 de MeOH:H₂O (2 ml) a 0 °C se añadió gota a gota una solución de NaOH (1,0 M) hasta pH ~14. La temperatura se elevó gradualmente hasta temperatura ambiente y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la solución se acidificó con resina Amberlite® IR-120 (H⁺) (a pH = 5), se filtró y se lavó con MeOH (10 ml) y H₂O (10 ml). Después el filtrado y los lavados combinados se concentraron al vacío, después se diluyeron con agua destilada (5 ml) y se ajustaron a pH = 8,0 mediante el uso de NaOH 0,05 M para convertir el compuesto en su sal de sodio. Finalmente, el compuesto se purificó en un cartucho C18-GracePure™ mediante el uso de acetonitrilo/agua al 2 % como disolvente para producir los productos puros **7-10**.

35 *Caracterización de los compuestos sintetizados*

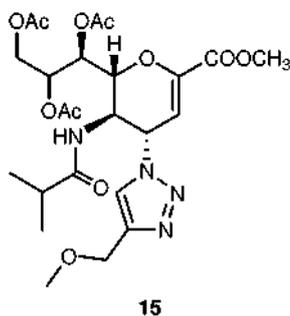
5-*Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-metoximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo* (**13**)



55 La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:acetona (6:1) produjo (90 mg, 78 %) de **13** puro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,81 (s, 3H, NAc), 2,05 (s, 6H, 2OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 3,36 (s, 3H, OCH₃), 3,80 (s, 3H, COOCH₃), 4,17 (dd, *J* = 12,5, 7,2 Hz, 1H, H-9), 4,29 (m, 1H, H-5), 4,50 (s, 2H, OCH₂), 4,68-4,79 (m, 2H, H-9', H-6), 5,40 (ddd, *J* = 7,4, 4,9, 2,5 Hz, 1H, H-8), 5,53 (dd, *J* = 5,1, 1,8 Hz, 1H, H-7), 5,78 (dd, *J* = 10,0, 2,5 Hz, 1H, H-4), 6,00 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-3), 7,05 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, NH), 7,64 (s, 1H, triazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 20,71, 20,79, 20,91 (3 OCOCH₃), 22,80 (NHCOCH₃), 48,39 (C-5), 52,71 (COOCH₃), 58,16 (OCH₃), 58,38 (C-4), 62,21 (C-9), 65,68 (OCH₂), 67,73TC-7), 70,90 (C-8), 7671 (C-6), 107,18 (C-3), 121,50(triazol-C-5), 145,24 (triazol-C-4), 145,92 (C-2), 161,27 (COOCH₃), 170,06, 170,27, 170,81, 170,88 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃). LRMS [C₂₂H₃₀N₄O₁₁] (*m/z*): (modo iónico +vo) 549,1 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₂H₃₀N₄NaO₁₁ [M+Na]⁺ 549,1803; encontrado, 549,1805.

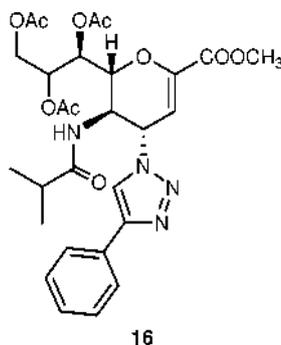
60 *7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-metoximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo* (**15**).

65



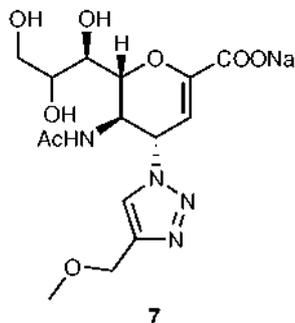
La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:acetona (9:1) produjo (65 mg, 71 %) de **15** puro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,97 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut-CH₃), 1,01 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, isobut-CH₃), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 6H, 2OAc), 2,24 (m, 1H, isobut-CH), 3,37 (s, 3H, OCH₃), 3,81 (s, 3H, COOCH₃), 4,14-4,29 (m, 2H, H-9, H-5), 4,51 (s, 2H, OCH₂), 4,68 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,84 (dd, $J = 10,5, 1,7$ Hz, 1H, H-6), 5,38 (ddd, $J = 6,6, 5,5, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 5,48 (dd, $J = 5,5, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 5,91 (dd, $J = 10,0, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,02 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,44 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, NH), 7,59 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): 8 18,81, 19,30 (isobut-2CH₃), 20,74, 20,90 (3 OCOCH₃), 35,51 (isobut-CH), 48,79 (C-5), 52,69 (COOCH₃), 57,59 (C-4), 58,38 (OCH₃), 62,08 (C-9), 65,73 (OCH₂), 67,66 (C-7), 70,79 (C-8), 76,24 (C-6), 107,07 (C-3), 121,54 (triazol-C-5), 145,39 (triazol-C-4), 145,82 (C-2), 161,30 (COOCH₃), 170,15, 170,23, 170,69 (3 OCOCH₃), 177,87 (isobut-CO). LRMS [$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 577,2 [M+Na]⁺.

7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (16).



La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:hexano (4:1) produjo (82 mg, 84 %) de **16** puro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,95 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, isobut-CH₃), 0,99 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut-CH₃), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 6H, 2OAc), 2,20-2,27 (m, 1H, isobut-CH), 3,83 (s, 3H, COOCH₃), 4,16-4,39 (m, 2H, H-9, H-5), 4,70 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,88 (dd, $J = 10,5, 1,7$ Hz, 1H, H-6), 5,40 (m, 1H, H-8), 5,52 (dd, $J = 5,4, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 5,99 (dd, $J = 10,0, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,08 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,51 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, NH), 7,26-7,43 (m, 3H, Ph-H-3', Ph-H-4', Ph-H-5'), 7,74 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 7,81 (s, 1 H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 18,83, 19,31 (isobut-2CH₃), 20,76, 20,92 (3 OCOCH₃), 35,55 (isobut-CH), 48,74 (C-5), 52,72 (COOCH₃), 57,67 (C-4), 62,12 (C-9), 67,72 (C-7), 70,84 (C-8), 76,39 (C-6), 107,25 (C-3), 118,84 (triazol-C-5), 125,83 (Ph), 128,47 (Ph), 128,89 (Ph), 129,97 (Ph q carbono), 145,81 (C-2), 148,19 (triazol-C-4), 161,35 (COOCH₃), 170,18, 170,26, 170,71 (3 OCOCH₃), 178,00 (isobut-CO). LRMS [$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 608,9 [M+Na]⁺.

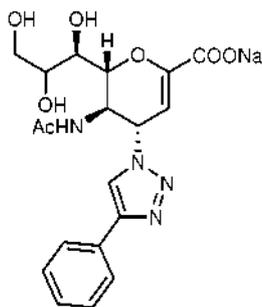
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (7).



7

Rendimiento = 85 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,84 (s, 3H, NAc), 3,31 (s, 3H, OCH_3), 3,52-3,71 (m, 2H, H-9 & H-7), 3,85 (dd, $J = 11,9, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 3,95 (ddd, $J = 9,3, 6,2, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 4,33 (m, 1H, H-5), 4,51 (dd, $J = 10,9, 1,2$ Hz, 1H, H-6), 4,56 (s, 2H, OCH_2), 5,48 (dd, $J = 9,6, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,80 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 8,08 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,65 (NHCOCH_3), 48,68 (C-5), 57,15 (OCH_3), 59,94 (C-4), 63,06 (C-9), 64,22 (OCH_2), 68,05 (C-7), 69,71 (C-8), 75,34 (C-6), 101,80 (C-3), 123,54 (triazol-C-5), 144,08 (triazol-C-4), 150,43 (C-2), 168,75 (COONa), 173,57 (NHCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 432,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

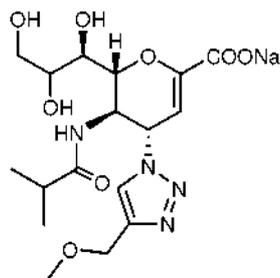
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-fenil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (8).



8

Rendimiento = 96 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,87 (s, 3H, NAc), 3,64 (dd, $J = 12,1, 6,4$ Hz, 1H, H-9), 3,69 (dd, $J = 9,6, 1,4$ Hz, 1H, H-7), 3,89 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,00 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 4,39 (m, 1H, H-5), 4,56 (dd, $J = 10,8, 1,4$ Hz, 1H, H-6), 5,49 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,83 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,40 (m, 1H, Ph-H4'), 7,46 (dd, $J = 8,4, 6,9$ Hz, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,71 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 8,28 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,63 (NHCOCH_3), 48,70 (C-5), 59,96 (C-4), 63,05 (C-9), 68,03 (C-7), 69,69 (C-8), 75,31 (C-6), 101,75 (C-3), 120,41 (Ph), 125,61 (Ph), 128,77 (triazol-C-5), 129,10 (Ph), 129,28 (Ph q carbono), 147,74 (triazol-C-4), 150,48 (C-2), 168,75 (COONa), 173,58 (NHCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 463,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+1$] $^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_7$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 441,138070; encontrado, 441,140189.

2,6-Anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-metoximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (9).

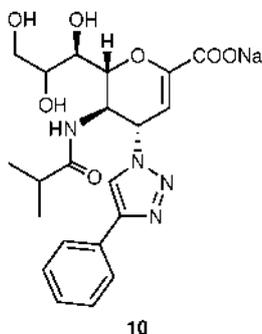


9

Rendimiento = 92 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 0,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 1,03 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 2,46 (m, 1H, isobut-CH), 3,39 (s, 3H, OCH_3), 3,65-3,76 (m, 2H, H-9, H-7), 3,94 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,49 (m, 1H, H-5), 4,60-4,65 (m, 3H, H-6, OCH_2), 5,61 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,87 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 8,18 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 18,43 (isobut- CH_3), 18,64 (isobut- CH_3), 35,10 (isobut-CH), 48,19 (C-5), 57,24 (OCH_3), 59,86 (C-4), 63,07 (C-9), 64,24 (OCH_2), 68,13 (C-7), 69,82 (C-8), 75,43 (C-6),

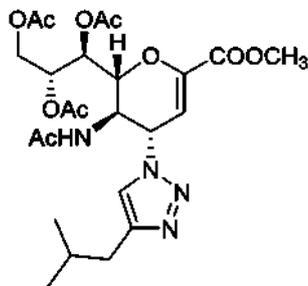
102,02 (C-3), 123,65 (triazol-C-5), 144,07 (triazol-C-4), 150,30 (C-2), 168,81 (COONa), 180,66 (isobut-CO). LRMS [C₁₇H₂₅N₄NaO₈] (*m/z*): (modo iónico +vo) 459,0 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₁₇H₂₅N₄Na₂O₈ [M+Na]⁺ 459,1462; encontrado, 459,1458.

5 2,6-Anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (10).



20 Rendimiento = 89 %. ¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ 0,94 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, isobut-CH₃), 0,99 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, isobut-CH₃), 2,43 (m, 1H, isobut-CH), 3,60-3,76 (m, 2H, H-9, H-7), 3,93 (dd, *J* = 12,0, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, *J* = 9,2, 6,3, 2,6 Hz, 1H, H-8), 4,51 (m, 1H, H-5), 4,62 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, H-6), 5,58 (dd, *J* = 9,7, 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,88 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-3), 7,42-7,54 (m, 3H, Ph-H-3', Ph-H-4', Ph-H-5'), 7,78 (d, *J* = 7,1 Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 8,36 (s, 1H, triazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 18,38 (isobut-CH₃), 18,65 (isobut-CH₃), 35,10 (isobut-CH), 48,23 (C-5), 59,91 (C-4), 63,07 (C-9), 68,15 (C-7), 69,76 (C-8), 75,41 (C-6), 101,96 (C-3), 120,66 (Ph), 125,67 (Ph), 128,81 (triazol-C-5), 129,16 (Ph), 129,36 (Ph q carbono), 147,71 (triazol-C-4), 150,32 (C-2), 168,80 (COONa), 180,67 (isobut-CO). LRMS [C₂₁H₂₅N₄NaO₇] (*m/z*): (modo iónico +vo) 491,2 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₁H₂₅N₄Na₂O₇ [M+Na]⁺ 491,1513; encontrado, 491,1515.

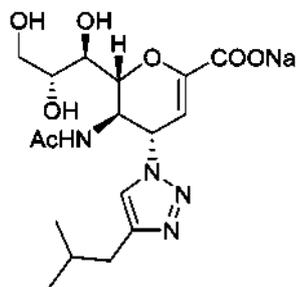
30 5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-isobutil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-6).



IE832-6

50 La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo produjo (93 mg, 66 %) de **IE832-6** puro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,89 (d, *J* = 6,6 Hz, 6H, isobutil-2CH₃), 1,81 (s, 3H, NAc), 1,93 (m, 1H, isobutil-CH), 2,06 (s, 6H, 2OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,58 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, isobutil-CH₂), 3,82 (s, 3H, COOCH₃), 4,17 (dd, *J* = 12,5, 6,7 Hz, 1H, H-9), 4,38 (m, 1H, H-5), 4,67 (dd, *J* = 12,4, 2,3 Hz, 1H, H-9'), 4,77 (d, *J* = 10,5 Hz, 1H, H-6), 5,40 (m, 1H, H-8), 5,55 (d, *J* = 5,4 Hz, 1H, H-7), 5,88 (d, *J* = 9,9 Hz, 1H, H-4), 6,03 (s, 1H, H-3), 7,07 (brs, 1H, NH), 7,49 (s, 1H, triazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 20,74, 20,81, 20,93 (3 OCOCH₃), 22,12, 22,84 (2 isobutil-CH₃ + NHCOCH₃), 28,60 (isobutil-CH), 34,17 (isobutil-CH₂), 48,04 (C-5), 52,76 (COOCH₃), 58,62 (C-4), 62,06 (C-9), 67,56 (C-7), 70,55 (C-8), 76,57 (C-6), 106,82 (C-3), 120,94 (triazol-C-5), 146,03 (C-2), 146,83 (triazol-C-4), 161,30 (COOCH₃), 169,99, 170,00, 170,13, 170,78 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃). LRMS [C₂₄H₃₄N₄O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 561,2 [M+Na]⁺.

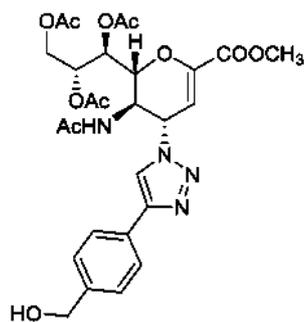
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-isobutil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-8).



IE832-8

15 Rendimiento = 79 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 0,82 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, isobutil- 2CH_3), 1,81-1,86 (m, 4H, NAc & isobutil-CH), 2,53 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, isobutil- CH_2), 3,54-3,68 (m, 2H, H-9 & H-7), 3,85 (dd, $J = 11,9, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 3,94 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 4,33 (m, 1H, H-5), 4,49 (dd, $J = 10,9, 1,2$ Hz, 1H, H-6), 5,40 (dd, $J = 9,7, 2,2$ Hz, 1H, H-4), 5,78 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,80 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,15 (isobutil- 2CH_3), 21,54 (NHCOCH_3), 28,09 (isobutil-CH), 33,42 (isobutil- CH_2), 48,53 (C-5), 59,65 (C-4), 62,99 (C-9), 67,98 (C-7), 69,63 (C-8), 75,29 (C-6), 102,06 (C-3), 122,01 (triazol-C-5), 147,74 (triazol-C-4), 150,12 (C-2), 168,81 (COONa), 173,28 (NHCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 443,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+1$] $^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{NaO}_7$ [$\text{M}+1$] $^+$ 421,169370; encontrado, 421,170091.

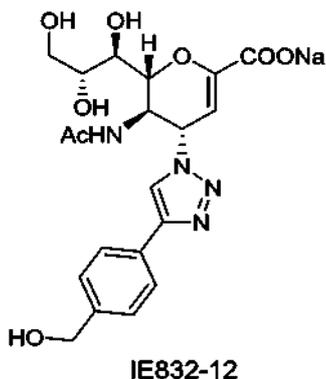
25 5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(4-hidroxitilfenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galactono-2-enonato de metilo (IE932-10).



IE932-10

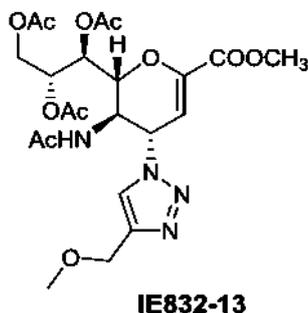
45 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,86 (s, 3H, NAc), 2,07 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 3,84 (s, 3H, COOCH_3), 4,19 (dd, $J = 12,5, 6,6$ Hz, 1H, H-9), 4,31 (m, 1H, H-5), 4,60-4,74 (m, 3H, H-9', CH_2), 4,80 (d, $J = 10,4$ Hz, 1H, H-6), 5,40 (m, 1H, H-8), 5,54 (dd, $J = 5,8, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 5,93 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H, H-4), 6,07 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 6,74 (brs, 1H, NH), 7,38 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,74 (d, $J = 7,7$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 7,96 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 20,74, 20,85, 20,98 (3 OCOCH_3), 22,90 (NHCOCH_3), 48,31 (C-5), 52,83 (COOCH_3), 58,49 (C-4), 62,19 (C-9), 64,66 (CH_2), 67,72 (C-7), 70,93 (C-8), 76,78 (C-6), 107,12 (C-3), 119,00 (triazol-C-5), 125,91 (Ph), 127,47 (Ph), 128,61 (Ph q carbono), 141,59 (Ph q carbono), 146,01 (C-2), 147,65 (triazol-C-4), 161,37 (COOCH_3), 170,13, 170,41, 170,92, 171,26 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 611,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

50 5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(4-hidroxitilfenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galactono-2-enonato de sodio (IE832-12).



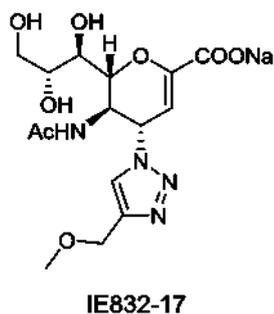
^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,85 (s, 3H, NAc), 3,54-3,71 (m, 2H, H-9, H-7), 3,86 (dd, $J = 11,9, 2,5$ Hz, 1H, H-9'), 3,96 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,4$ Hz, 1H, H-8), 4,37 (m, 1H, H-5), 4,54 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-6), 4,62 (s, 2H, CH_2), 5,50 (dd, $J = 9,6, 2,1$ Hz, 1H, H-4), 5,83 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H-3), 7,44 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,75 (d, $J = 8,2$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 8,38 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,70 (NHCOCH_3), 48,78 (C-5), 60,04 (C-4), 63,12 (C-9), 63,55 (CH_2), 68,11 (C-7), 69,77 (C-8), 75,39 (C-6), 101,78 (C-3), 120,53 (triazol-C-5), 125,90 (Ph), 128,06 (Ph), 128,77 (Ph q carbono), 140,80 (Ph q carbono), 147,60 (C-2), 150,57 (triazol-C-4), 168,77 (COONa), 173,66 (NHCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 493,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+1$] $^+$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_8$ [$\text{M}+1$] $^+$ 471,148635; encontrado, 471,147973.

5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-*D*-glicero- *D*-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-13).



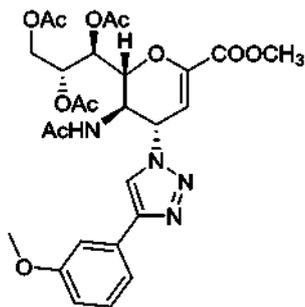
La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:acetona (6:1) produjo (67 mg, 58 %) de **IE832-13** puro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,81 (s, 3H, NAc), 2,05 (s, 6H, 2OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 3,36 (s, 3H, OCH_3), 3,80 (s, 3H, COOCH_3), 4,17 (dd, $J = 12,5, 7,2$ Hz, 1H, H-9), 4,29 (m, 1H, H-5), 4,50 (s, 2H, OCH_2), 4,68-4,79 (m, 2H, H-9', H-6), 5,40 (ddd, $J = 7,4, 4,9, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 5,53 (dd, $J = 5,1, 1,8$ Hz, 1H, H-7), 5,78 (dd, $J = 10,0, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 6,00 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,05 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, NH), 7,64 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 20,71, 20,79, 20,91 (3 OCOCH_3), 22,80 (NHCOCH_3), 48,39 (C-5), 52,71 (COOCH_3), 58,16 (OCH_3), 58,38 (C-4), 62,21 (C-9), 65,68 (OCH_2), 67,73 (C-7), 70,90 (C-8), 76,71 (C-6), 107,18 (C-3), 121,50 (triazol-C-5), 145,24 (triazol-C-4), 145,92 (C-2), 161,27 (COOCH_3), 170,06, 170,27, 170,81, 170,88 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 549,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$. HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{NaO}_{11}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 549,1803; encontrado, 549,1805.

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-17).



Rendimiento = 85 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,84 (s, 3H, NAc), 3,31 (s, 3H, OCH_3), 3,52-3,71 (m, 2H, H-9 & H-7), 3,85 (dd, $J = 11,9, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 3,95 (ddd, $J = 9,3, 6,2, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 4,33 (m, 1H, H-5), 4,51 (dd, $J = 10,9, 1,2$ Hz, 1H, H-6), 4,56 (s, 2H, OCH_2), 5,48 (dd, $J = 9,6, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,80 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 8,08 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,65(NHCOCH₃), 48,68 (C-5), 57,15 (OCH_3), 59,94 (C-4), 63,06 (C-9), 64,22 (OCH_2), 68,05 (C-7), 69,71 (C-8), 75,34 (C-6), 101,80 (C-3), 123,54 (triazol-C-5), 144,08 (C-2), 150,43 (triazol-C-4), 168,75 (COONa), 173,57 (NHCOCH₃); LRMS [$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 432,1 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

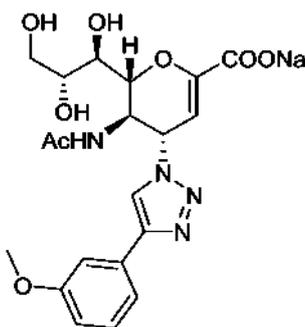
5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(3-metoxifenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-18).



IE832-18

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,84 (s, 3H, NAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 3,83 (s, 3H, COOCH_3), 3,84 (s, 3H, OCH_3), 4,20 (dd, $J = 12,5, 7,0$ Hz, 1H, H-9), 4,32 (m, 1H, H-5), 4,71 (dd, $J = 12,5, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,83 (dd, $J = 10,5, 1,9$ Hz, 1H, H-6), 5,43 (ddd, $J = 6,9, 5,4, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,57 (dd, $J = 5,4, 1,9$ Hz, 1H, H-7), 5,87 (dd, $J = 10,0, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 6,05 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,79-6,92 (m, 2H, NH, Ph-H-4'), 7,23-7,38 (m, 3H, Ph-H-2', Ph-H-5', Ph-H-6'), 7,84 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 20,73, 20,79, 20,92 (3 OCOCH_3), 22,98 (NHCOCH₃), 48,79 (C-5), 52,74 (COOCH_3), 55,35 (Ar-OCH₃), 58,04 (C-4), 62,18 (C-9), 67,74 (C-7), 70,78 (C-8), 76,63 (C-6), 107,19 (C-3), 110,94 (Ph), 114,43(Ph), 118,20 (Ph), 118,93 (triazol-C-5), 129,97 (Ph), 131,17 (Ph q carbono), 146,02 (C2), 148,03 (triazol-C-4), 160,02 (Ph q carbono), 161,31 (COOCH_3), 170,12, 170,24, 170,81,170,99 (NHCOCH₃, 3 OCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 611,2 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

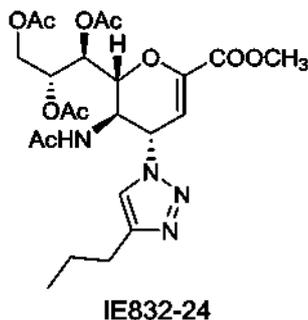
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(3-metoxifenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-20).



IE832-20

^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,86 (s, 3H, NAc), 3,52-3,74 (m, 2H, H-9, H-7), 3,77-3,92 (m, 4H, OCH_3 , H-9'), 3,97 (m, 1H, H-8), 4,37 (m, 1H, H-5), 4,54 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-6), 5,49 (dd, $J = 9,6, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 5,84 (s, 1H, H-3), 6,96 (m, 1H, Ph-H-4'), 7,23-7,48 (m, 3H, Ph-H-2', Ph-H-5', Ph-H-6'), 8,35 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,71 (NHCOCH₃), 48,80 (C-5), 55,39 (OCH_3), 60,03 (C-4), 63,12 (C-9), 68,11 (C-7), 69,77 (C-8), 75,39 (C-6), 101,73 (C-3), 110,89 (Ph), 114,54 (Ph), 118,49 (Ph), 120,66 (triazol-C-5), 130,49 (Ph), 130,85 (Ph q carbono), 147,51 (C2), 150,62 (triazol-C-4), 159,29 (Ph q carbono), 168,77 (COONa), 173,65 (NHCOCH₃). LRMS [$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 493,0 [$\text{M}+1$]⁺; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+1$]⁺ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_8$ [$\text{M}+1$]⁺ 471,148635; encontrado, 471,148177.

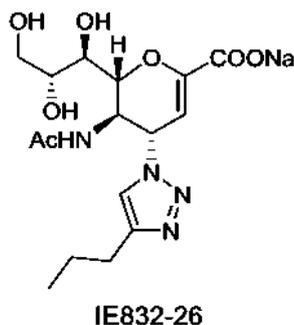
5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-propil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-24).



15 ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,97 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H, propil- CH_3), 1,73 (m, 2H, propil-2'- CH_2), 1,83 (s, 3H, NAc), 2,07 (s, 6H, 2OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,77 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, propil-1'- CH_2), 3,83 (s, 3H, COOCH_3), 4,16 (dd, $J = 12,5, 6,0$ Hz, 1H, H-9), 4,38 (m, 1H, H-5), 4,58 (dd, $J = 12,6, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,85 (d, $J = 10,6$ Hz, 1H, H-6), 5,42 (m, 1H, H-8), 5,56 (d, $J = 6,5$ Hz, 1H, H-7), 6,01 (s, 1H, H-3), 6,11 (d, $J = 10,1$ Hz, 1H, H-4), 7,37 (brs, 1H, NH), 7,68 (s, 1H, triazol-CH); LRMS [$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 547,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

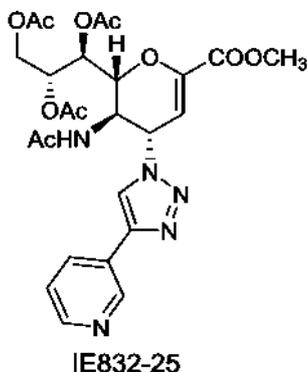
20

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-propil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-26).



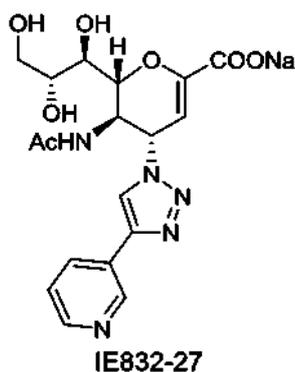
40 ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 0,92 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H, propil- CH_3), 1,57-1,76 (m, 2H, propil-2'- CH_2), 1,93 (s, 3H, NAc), 2,71 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, propil-1'- CH_2), 3,62-3,77 (m, 2H, H-9, H-7), 3,94 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, $J = 9,2, 6,3, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 4,41 (m, 1H, H-5), 4,58 (dd, $J = 10,9, 1,3$ Hz, 1H, H-6), 5,50 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,87 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,89 (s, 1H, triazol-CH). LRMS [$\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 429,0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ [$\text{M}+1$] $^+$ 429,1357; encontrado, 429,1361.

5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(piridin-3-il)-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-25).



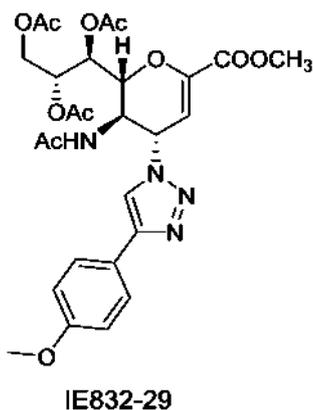
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,82 (s, 3H, NAc), 2,06 (s, 6H, 20Ac), 2,08 (s, 3H, OAc), 3,82 (s, 3H, COOCH₃), 4,19 (dd, *J* = 12,5, 7,2 Hz, 1H, H-9), 4,40 (q, *J* = 9,9 Hz, 1H, H-5), 4,64-4,88 (m, 2H, H-7, H-9'), 5,38 (m, 1H, H-8), 5,57 (dd, *J* = 4,8, 1,9 Hz, 1H, H-7), 5,86 (dd, *J* = 9,9, 2,4 Hz, 1H, H-4), 6,08 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H-3), 7,08 (d, *J* = 9,1 Hz, 1H, NH), 7,36 (dd, *J* = 7,9, 4,8 Hz, 1H, Pyr-H5'), 8,04 (s, 1H, triazol-CH), 8,14 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H, Pyr-H4'), 8,54 (d, *J* = 4,8 Hz, 1H, Pyr-H-6'), 8,96 (s, 1H, Pyr-H-2'); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 20,69, 20,79, 20,94 (3 OCOCH₃), 22,89 (NHCOCH₃), 48,35 (C-5), 52,81 (COOCH₃), 58,57 (C-4), 62,14 (C-9), 67,77 (C-7), 71,17 (C-8), 76,85 (C-6)106,88 (C-3), 119,077(triazol-C-5), 123,89 (Pyr), 126,33 (Pyr q carbono), 133,20 (Pyr), 145,13 (triazol-C-4), 146,17 (C2), 146,88 (Pyr), 149,31 (Pyr), 161,25 (COOCH₃), 170,16,170,49, 170,80, 170,95 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃); LRMS [C₂₅H₂₉N₅O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 582,2 [M+Na]⁺.

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(piridin-3-il)-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-27).



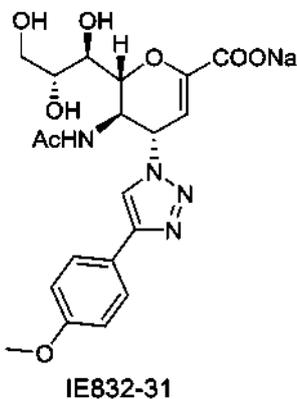
¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ 1,92 (s, 3H, NAc), 3,62-3,78 (m, 2H, H-9, H-7), 3,93 (dd, *J* = 11,9, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, *J* = 9,3, 6,3, 2,6 Hz, 1H, H-8), 4,44 (m, 1H, H-5), 4,61 (dd, *J* = 10,9, 1,3 Hz, 1H, H-6), 5,59 (dd, *J* = 9,6, 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,90 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-3), 7,53 (m, 1H, Pyr-H-5'), 8,17 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Pyr-H-4'), 8,49-8,60 (m, 2H, triazol-CH, Phyr-H-6'), 8,87 (brs, 1H, Pyr-H-2'); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 21,67 (NHCOCH₃), 48,77 (C-5), 60,17 (C-4), 63,08 (C-9), 68,06 (C-7), 69,73 (C-8), 75,36 (C-6), 101,61 (C-3), 121,13 (triazol-C-5), 134,31 (Pyr), 144,68 (C-2), 145,64 (Pyr), 148,42 (Pyr), 150,65 (triazol-C-4), 168,72 (COONa), 173,65 (NHCOCH₃). LRMS [C₁₈H₂₀N₅NaO₇] (*m/z*): (modo iónico +vo) 463,7 [M+1]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+1]⁺ calculado para C₁₈H₂₁N₅NaO₇[M+1]⁺ 442,133319; encontrado, 442,133358.

5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(4-metoxifenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-29).



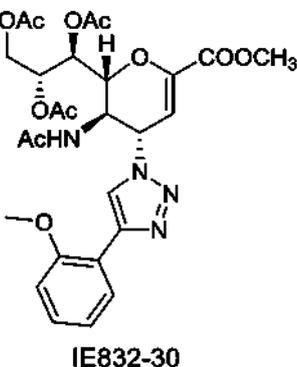
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,88 (s, 3H, NAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 6H, 20Ac), 3,83 (s, 3H, COOCH₃), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 4,13-4,30 (m, 2H, H-9, H-5), 4,66 (dd, *J* = 12,5, 2,6 Hz, 1H, H-9'), 4,83 (dd, *J* = 10,6, 1,9 Hz, 1H, H-6), 5,41 (m, 1H, H-8), 5,52 (dd, *J* = 5,8, 1,8 Hz, 1H, H-7), 5,93 (dd, *J* = 10,0, 2,5 Hz, 1H, H-4), 6,01-6,16 (m, 2H, H-3, NH), 6,94 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,61-7,83 (m, 3H, triazol-CH, Ph-H-2', Ph-H-6'); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 20,71,20,78, 20,90 (3 OCOCH₃), 22,90 (NHCOCH₃), 48,45 (C-5), 52,70 (COOCH₃), 55,31 (Ph-OCH₃), 58,17 (C-4), 62,23 (C-9), 67,80 (C-7), 70,92 (C-8), 76,83 (C-6), 107,40 (C-3), 114,32 (Ph), 117,88 (triazol-C-5), 12257 (Ph q carbono), 127,13 (Ph), 145,93 (C-2), 148,07 (triazol-C-4), 159,87 (Ph q carbono), 161,33 (COOCH₃), 170,10,170,27,170,81,170,99 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃). LRMS [C₂₇H₃₂N₄O₁₁] (*m/z*): (modo iónico +vo) 611,3 [M+Na]⁺.

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(4-metoxifenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-31).



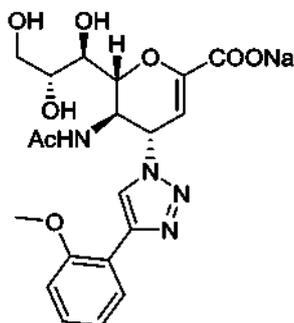
¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ 1,92 (s, 3H, NAc), 3,63-3,77 (m, 2H, H-9, H-7), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,93 (dd, *J* = 11,9, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, *J* = 9,6, 6,3, 2,6 Hz, 1H, H-8), 4,42 (m, 1H, H-5), 4,59 (dd, *J* = 10,9, 1,3 Hz, 1H, H-6), 5,52 (dd, *J* = 9,6, 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,87 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-3), 7,05 (d, *J* = 9,0 Hz, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,68 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 8,26 (s, 1H, triazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 21,65 (NHCOCH₃), 48,75 (C-5), 55,39 (OCH₃), 60,01 (C-4), 63,08 (C-9), 68,07 (C-7), 69,72 (C-8), 75,35 (C-6), 101,82 (C-3), 114,60 (Ph), 119,78 (triazol-C-5), 122,49 (Ph q carbono), 127,21 (Ph), 147,65 (C-2), 150,49 (triazol-C-4), 159,23 (Ph q carbono), 168,78 (COONa), 173,62 (NHCOCH₃). LRMS [C₂₀H₂₃N₄NaO₈] (*m/z*): (modo iónico +vo) 492,6 [M+1]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+1]⁺ calculado para C₂₀H₂₄N₄NaO₈ [M+1]⁺ 471,148635; encontrado, 471,147452.

5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(2-metoxifenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-30).



45 La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:hexano (7:1) produjo (81 mg, 62 %) de **IE832-30** puro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,84 (s, 3H, NAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 3,83 (s, 3H, COOCH₃), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 4,20 (dd, *J* = 12,4, 7,0 Hz, 1H, H-9), 4,37 (m, 1H, H-5), 4,71 (dd, *J* = 12,4, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,89 (dd, *J* = 10,5, 1,9 Hz, 1H, H-6), 5,45 (m, 1H, H-8), 5,59 (dd, *J* = 5,4, 1,9 Hz, 1H, H-7), 5,87 (dd, *J* = 9,9, 2,5 Hz, 1H, H-4), 6,07 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H-3), 6,91 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, Ph-H-3'), 7,03 (m, 1H, Ph-H-5'), 7,22-7,30 (m, 2H, Ph-H-4', NH), 8,07 (s, 1H, triazol-CH), 8,17 (dd, *J* = 7,8, 1,8 Hz, 1H, Ph-H-6'); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 20,71, 20,76, 20,88 (3 OCOCH₃), 22,90 (NHCOCH₃), 48,84 (C-5), 52,64 (COOCH₃), 55,36 (Ph-OCH₃), 57,83 (C-4), 62,24 (C-9), 67,85 (C-7), 70,79 (C-8), 76,75 (C-6), 107,72 (C-3), 110,87 (Ph), 118,66 (Ph q carbono), 120,88 (Ph), 122,32 (triazol-C-5), 127,37 (Ph), 129,24 (Ph), 143,40 (triazol-C-4), 145,82 (C-2), 155,68 (Ph q carbono), 161,44 (COOCH₃), 170,06, 170,19, 170,75, 171,04 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃). LRMS [C₂₇H₃₂N₄O₁₁] (*m/z*): (modo iónico +vo) 611,2 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₇H₃₂N₄NaO₁₁ [M+Na]⁺ 611,195979; encontrado, 611,196049.

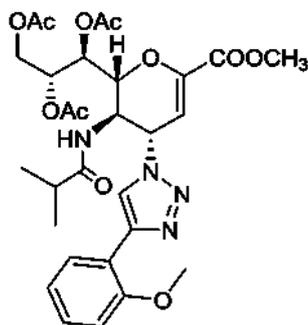
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(2-metoxifenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-37).



IE832-37

Rendimiento = 91 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,91 (s, 3H, NAc), 3,63-3,77 (m, 2H, H-9, H-7), 3,86-3,97 (m, 4H, H-9', OCH_3), 4,04 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,45 (m, 1H, H-5), 4,60 (dd, $J = 10,9, 1,2$ Hz, 1H, H-6), 5,53 (dd, $J = 9,6, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,90 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,08-7,14 (m, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,34-7,49 (m, 1H, Ph-H-4'), 7,92 (dd, $J = 8,0, 1,7$ Hz, H-6'), 8,32 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,67 (NHCOCH_3), 48,59 (C-5), 55,38 (OCH_3), 59,81 (C-4), 63,09 (C-9), 68,11 (C-7), 69,74 (C-8), 75,40 (C-6), 101,95 (C-3), 111,84 (Ph), 117,87 (Ph q carbono), 121,00 (Ph), 123,12 (triazol-C-5), 127,27 (Ph), 130,05 (Ph), 143,23 (triazol-C-4), 150,33 (C-2), 155,70 (Ph q carbono), 168,81 (COONa), 173,59 (NHCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 493,2 [$\text{M}+1$] $^+$.

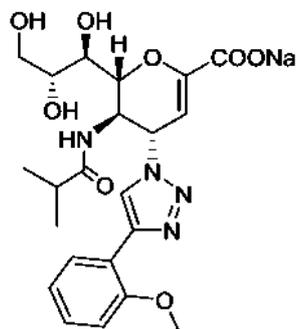
7,8,9-Tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-5-isobutiramido-4-(4-(2-metoxifenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galactono-2-enonato de metilo (IE889-23).



IE889-23

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,00-1,04 (m, 6H, isobutiril- 2CH_3), 2,08 (s, 6H, 2OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,25-2,34 (m, 1H, isobutiril-CH), 3,84 (s, 3H, COOCH_3), 3,88 (s, 3H, Ph- OCH_3), 4,20-4,28 (m, 2H, H-9, H-5), 4,71 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9), 4,99 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H, H-6), 5,43 (m, 1H, H-8), 5,55 (dd, $J = 5,4, 1,6$ Hz, 1H, H-7), 6,03 (dd, $J = 10,1, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,11 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 6,79 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, NH), 6,93 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Ph-H-3'), 7,05 (m, 1H, Ph-H-5'), 7,29 (m, 1H, Ph-H-4'), 8,04 (s, 1H, triazol-CH), 8,2 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Ph-H-6'); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 18,86, 19,34, 20,80, 20,95 (3 OCOCH_3 , isobutiril- 2CH_3), 35,42 (isobutiril-CH), 49,31 (C-5), 52,68 (COOCH_3), 55,29 (Ph- OCH_3), 57,12 (C-4), 62,19 (C-9), 67,74 (C-7), 70,75 (C-8), 76,30 (C-6), 107,73 (C-3), 110,71 (Ph), 118,68 (Ph q carbono), 120,89 (Ph), 122,62 (triazol-C-5), 127,51 (Ph), 129,21 (Ph), 143,30 (triazol-C-5), 145,68 (C-2), 155,68 (Ph q carbono), 161,56 (COOCH_3), 170,10, 170,20, 170,68 (3 OCOCH_3), 178,05 (isobutiril-CO). LRMS [$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 639,1 [$\text{M}+1$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{NaO}_{11}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 639,227279; encontrado, 639,225897.

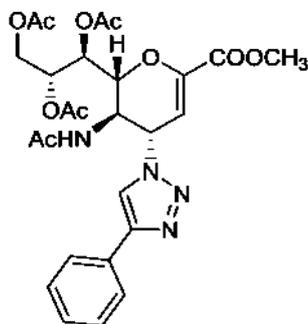
2,6-Anhidro-3,4,5-trideoxi-5-isobutiramido-4-(4-(2-metoxifenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galactono-2-enonato de sodio (IE889-34).



IE889-34

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ 0,90 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, isobutiril-CH₃), 0,97 (d, *J* = 6,9 Hz, 3H, isobutiril-CH₃), 2,31 (m, 1H, isobutiril-CH), 3,53 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, H-7), 3,60 (dd, *J* = 11,5, 5,4 Hz, 1H, H-9), 3,79 (dd, *J* = 11,4, 3,0 Hz, 1H, H-9'), 3,85-3,91 (m, 4H, H-8, Ph-OCH₃), 4,39-4,55 (m, 2H, H-5, H-6), 5,61 (dd, *J* = 9,7, 2,2 Hz, 1H, H-4), 5,72 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-3), 6,89-7,10 (m, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,27 (ddd, *J* = 8,7, 7,4,1,7 Hz, 1H, H-4'), 8,02 (dd, *J* = 7,7,1,7 Hz, 1H, Ph-H-6'), 8,23 (s, 1H, triazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 18,38, 18,53 (isobutiril-2CH₃), 35,09 (isobutiril-CH), 48,18 (C-5), 55,34 (OCH₃), 59,66 (C-4), 63,08 (C-9), 68,18 (C-7), 69,76 (C-8), 75,44 (C-6), 102,15 (C-3), 111,80 (Ph), 117,86 (Ph q carbono), 121,00 (Ph), 123,47 (triazol-C-5), 127,21 (Ph), 130,05 (Ph), 143,12 (triazol-C-4), 150,16 (C-2), 155,70 (Ph q carbono), 168,84 (COONa), 180,64 (NHCOCH₃); LRMS [C₂₂H₂₈N₄O₈] (*m/z*): (modo iónico +vo) 499,1 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₂H₂₈N₄NaO₈ [M+Na]⁺ 499,179935; encontrado, 499,179943.

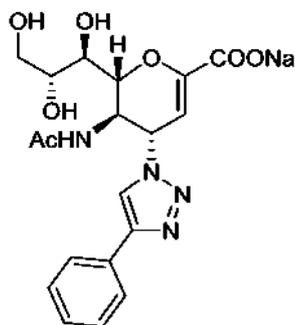
5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE889-45).



IE889-45

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:hexano (5:1) produjo (88 mg, 70 %) de **IE889-45** puro. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,79 (s, 3H, NAc), 2,04 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 3,81 (s, 3H, COOCH₃), 4,18 (dd, *J* = 12,4, 7,2 Hz, 1H, H-9), 4,42 (m, 1H, H-5), 4,72 (dd, *J* = 12,6, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,79 (dd, *J* = 10,5, 1,6 Hz, 1H, H-6), 5,42 (m, 1H, H-8), 5,58 (dd, *J* = 5,1, 1,8 Hz, 1H, H-7), 5,83 (dd, *J* = 10,0, 2,4 Hz, 1H, H-4), 6,04 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-3), 7,20-7,42 (m, 4H, NH, Ph-H-3', Ph-H-4', Ph-H-5'), 7,72 (dd, *J* = 8,2, 1,3 Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 7,88 (s, 1H, triazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 20,70, 20,80, 20,90 (3 OCOCH₃), 22,85 (NHCOCH₃), 48,26 (C-5), 52,71 (COOCH₃), 58,41 (C-4), 62,26 (C-9), 67,80 (C-7), 70,97 (C-8), 76,95 (C-6), 107,37 (C-3), 118,76 (triazol-C-5), 125,77 (Ph), 128,51 (Ph), 128,91 (Ph), 129,85 (Ph, q carbono), 145,95 (C-2), 148,13 (triazol-C-4), 161,32 (COOCH₃), 170,04, 170,30, 170,84, 170,99 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃). LRMS [C₂₆H₃₀N₄O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 581,0 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₆H₃₀N₄NaO₁₀ [M+Na]⁺ 581,185414; encontrado, 581,184724.

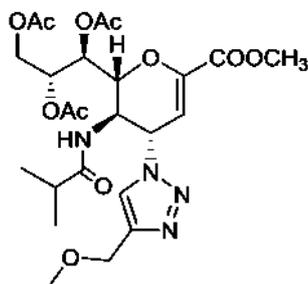
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE889-52).



IE889-52

Rendimiento = 96 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 1,87 (s, 3H, NAc), 3,64 (dd, $J = 12,1, 6,4$ Hz, 1H, H-9), 3,69 (dd, $J = 9,6, 1,4$ Hz, 1H, H-7), 3,89 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,00 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 4,39 (m, 1H, H-5), 4,56 (dd, $J = 10,8, 1,4$ Hz, 1H, H-6), 5,49 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,83 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,40 (m, 1H, Ph-H4'), 7,46 (dd, $J = 8,4, 6,9$ Hz, 2H, Ph-H-3', Ph-H-5'), 7,71 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 8,28 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 21,63 (NHCOCH_3), 48,70 (C-5), 59,96 (C-4), 63,05 (C-9), 68,03 (C-7), 69,69 (C-8), 75,31 (C-6), 101,75 (C-3), 120,41 (Ph), 125,61 (Ph) 128,77 (triazol-C-5), 129,10 (Ph), 129,28 (Ph q carbono), 147,74 (triazol-C-4), 150,48 (C-2), 168,75 (COONa), 173,58 (NHCOCH_3). LRMS [$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 463,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+1$] $^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_7$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 441,138070; encontrado, 441,140189.

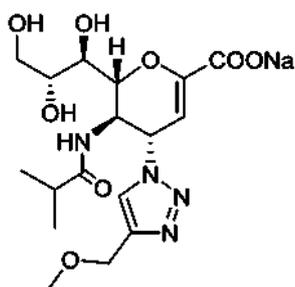
7,8,9-Tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de metilo (IE927-57).



IE927-57

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:acetona (9:1) produjo (60 mg, 66 %) de **IE927-57** puro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 8 0,97 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 1,01 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 6H, 2OAc), 2,24 (m, 1H, isobut-CH), 3,37 (s, 3H, OCH_3), 3,81 (s, 3H, COOCH_3), 4,14-4,29 (m, 2H, H-9, H-5), 4,51 (s, 2H, OCH_2), 4,68 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,84 (dd, $J = 10,5, 1,7$ Hz, 1H, H-6), 5,38 (ddd, $J = 6,6, 5,5, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 5,48 (dd, $J = 5,5, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 5,91 (dd, $J = 10,0, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,02 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,44 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, NH), 7,59 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 18,81, 19,30, 20,74, 20,90 (3 OCOCH_3 , isobut-2 CH_3), 35,51 (isobut-CH), 48,79 (C-5), 52,69 (COOCH_3), 57,59 (C-4), 58,38 (OCH_3), 62,08 (C-9), 65,73 (OCH_2), 67,66 (C-7), 70,79 (C-8), 76,24 (C-6), 107,07 (C-3), 121,54 (triazol-C-5), 145,39 (triazol-C-4), 145,82 (C-2), 161,30 (COOCH_3), 170,15, 170,23, 170,69 (3 OCOCH_3), 177,87 (isobut-CO). LRMS [$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 577,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

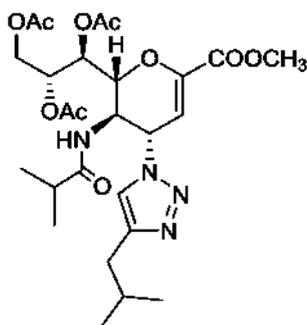
2,6-Anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de sodio (IE927-60).



IE927-60

Rendimiento = 92 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 0,98 (d, $J = 7,0$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 1,03 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 2,46 (m, 1H, isobut-CH), 3,39 (s, 3H, OCH_3), 3,65-3,76 (m, 2H, H-9, H-7), 3,94 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,49 (m, 1H, H-5), 4,60-4,65 (m, 3H, H-6, OCH_2), 5,61 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,87 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 8,18 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 18,43 (isobut- CH_3), 18,64 (isobut- CH_3), 35,10 (isobut-CH), 48,19 (C-5), 57,24 (OCH_3), 59,86 (C-4), 63,07 (C-9), 64,24 (OCH_2), 68,13 (C-7), 69,82 (C-8), 75,43 (C-6), 102,02 (C-3), 123,65 (triazol-C-5), 144,07 (triazol-C-4), 150,30 (C-2), 168,81 (COONa), 180,66 (isobut-CO). LRMS [$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 459,0 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_8$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 459,1462; encontrado, 459,1458.

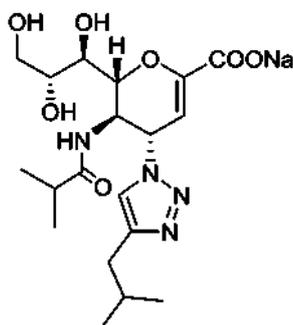
7,8,9-Tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-isobutil-[1,2,3,]triazol-1-il)-5-isobutiramido-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE927-58).



IE927-58

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 0,90 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, isobutil-2 CH_3), 0,96 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobutil- CH_3), 1,00 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, isobutil- CH_3), 1,90 (m, 1H, isobutil-CH), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 6H, 2 OAc), 2,22 (m, 1H, isobutil-CH), 2,53 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, isobutil- CH_2), 3,82 (s, 3H, COOCH_3), 4,13-4,36 (m, 2H, H-9, H-5), 4,70 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,81 (dd, $J = 10,5, 1,7$ Hz, 1H, H-6), 5,38 (ddd, $J = 6,6, 5,4, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 5,49 (dd, $J = 5,5, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 5,87 (dd, $J = 10,1, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,02 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,41 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, NH), 7,32 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 18,83, 19,29, 20,76, 20,92 (3 OCOCH_3 + isobutil-2 CH_3), 22,23 (isobutil-2 CH_3), 28,70 (isobutil-CH), 34,68 (isobutil- CH_2), 35,55 (isobutil-CH), 48,48 (C-5), 52,68 (COOCH_3), 57,47 (C-4), 62,11 (C-9), 67,69 (C-7), 70,89 (C-8), 76,44 (C-6), 107,53 (C-3), 120,36 (triazol-C-5), 145,56 (C-2), 147,53 (triazol-C-4), 161,40 (COOCH_3), 170,15, 170,24, 170,70 (3 OCOCH_3), 177,74 (isobutil-CO). LRMS [$\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 589,3 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

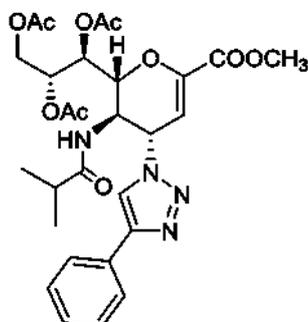
2,6-Anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-isobutil-[1,2,3,]triazol-1-il)-5-isobutiramido-D-glicero-D-galacto- non-2-enonato de sodio.



IE927-67

^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 0,90 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H, isobutil-2 CH_3), 0,97 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobutil- CH_3), 1,02 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobutil- CH_3), 1,92 (m, 1H, isobutil-CH), 2,43 (m, 1H, isobutil-CH), 2,60 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, isobutil- CH_2), 3,62-3,74 (m, 2H, H-9, H-7), 3,93 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,02 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,47 (m, 1H, H-5), 4,56 (d, $J = 11,1$ Hz, 1H, H-6), 5,53 (dd, $J = 9,7, 2,2$ Hz, 1H, H-4), 5,84 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,88 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 18,45 (isobutil- CH_3), 18,61 (isobutil- CH_3), 21,31 (isobutil-2 CH_3), 28,17 (isobutil-CH), 33,54 (isobutil- CH_2), 35,12 (isobutil-CH), 48,09 (C-5), 59,53 (C-4), 63,07 (C-9), 68,14 (C-7), 69,78 (C-8), 75,47 (C-6), 102,30 (C-3), 121,99 (triazol-C-5), 147,82 (triazol-C-4), 150,05 (C-2), 168,88 (COONa), 180,46 (isobutil-CO). LRMS [$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 471,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 449,2; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 471,1826; encontrado, 471,1823.

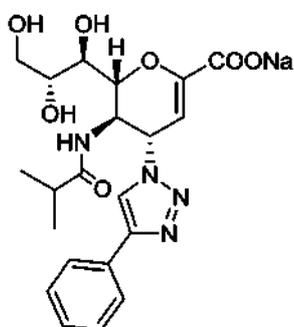
7,8,9-Tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(4-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galactonon-2-enonato de metilo (IE984-4).



IE984-4

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:hexano (4:1) produjo (72 mg, 74 %) de **IE984-4** puro. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): 8,0,95 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 0,99 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 6H, 2OAc), 2,20-2,27 (m, 1H, isobut-CH), 3,83 (s, 3H, COOCH_3), 4,16-4,39 (m, 2H, H-9, H-5), 4,70 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,88 (dd, $J = 10,5, 1,7$ Hz, 1H, H-6), 5,40 (m, 1H, H-8), 5,52 (dd, $J = 5,4, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 5,99 (dd, $J = 10,0, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,08 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,51 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, NH), 7,26-7,43 (m, 3H, Ph-H-3', Ph-H-4', Ph-H-5'), 7,74 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-5'), 7,81 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 18,83, 19,31,20,76, 20,92 (3 OCOCH_3 , isobut-2 CH_3), 35,55 (isobut-CH), 48,74 (C-5), 52,72 (COOCH_3), 57,67 (C-4), 62,12 (C-9), 67,72 (C-7), 70,84 (C-8), 76,39 (C-6), 107,25 (C-3), 118,84 (triazol-C-5), 125,83 (Ph), 128,47 (Ph), 128,89 (Ph), 129,97 (Ph q carbono), 145,81 (C-2), 148,19 (triazol-C-4), 161,35 (COOCH_3), 170,18, 170,26, 170,71 (3 OCOCH_3), 178,00 (isobut-CO). LRMS [$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 608,9 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$.

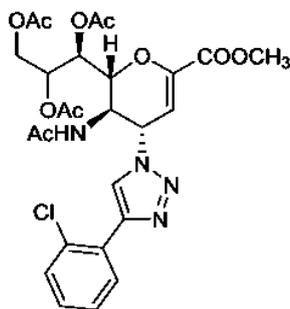
2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-5-isobutiramido-4-(4-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galactonon-2-enonato de sodio (IE984-5).



IE984-5

Rendimiento = 89 %. ^1H RMN (300 MHz, D_2O): δ 0,94 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 0,99 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 2,43 (m, 1H, isobut-CH), 3,60-3,76 (m, 2H, H-9, H-7), 3,93 (dd, $J = 12,0, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, $J = 9,2, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,51 (m, 1H, H-5), 4,62 (d, $J = 11,0$ Hz, 1H, H-6), 5,58 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,88 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,42-7,54 (m, 3H, Ph-H-3', Ph-H-4', Ph-H-5'), 7,78 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, Ph-H-2', Ph-H-6'), 8,36 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): δ 18,38 (isobut- CH_3), 18,65 (isobut- CH_3), 35,10 (isobut-CH), 48,23 (C-5), 59,91 (C-4), 63,07 (C-9), 68,15 (C-7), 69,76 (C-8), 75,41 (C-6), 101,96 (C-3), 120,66 (Ph), 125,67 (Ph), 128,81 (triazol-C-5), 129,16 (Ph), 129,36 (Ph q carbono), 147,71 (triazol-C-4), 150,32 (C-2), 168,80 (COONa), 180,67 (isobut-CO). LRMS [$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 491,2 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 491,1513; encontrado, 491,1515.

5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-4-(4-(2-clorofenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enonato de metilo (IE1172-70).



IE1172-70

5

10

15

20

25

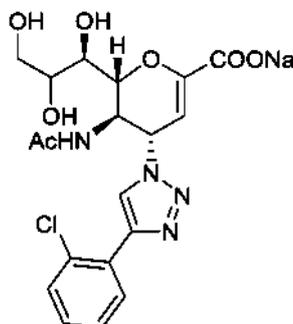
La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetona: hexano (3:2) produjo (76 %) de **IE1172-70** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,81 (s, 3H, NAc), 2,05 (s, 6H, 2 OAc), 2,07 (s, 3H, OAc), 3,82 (s, 3H, COOCH_3), 4,20 (dd, $J = 12,5,7,0$ Hz, 1H, H-9), 4,30 (q, $J = 9,8$ Hz, 1H, H-5), 4,71 (dd, $J = 12,5, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,86 (dd, $J = 10,7, 1,9$ Hz, 1H, H-6), 5,42 (ddd, $J = 6,8, 5,4, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,55 (dd, $J = 5,3, 1,9$ Hz, 1H, H-7), 5,91 (dd, $J = 10,0, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,09 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 6,93 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, NH), 7,26 (td, $J = 7,8, 1,8$ Hz, 1H, Ph-H), 7,34 (td, $J = 7,6, 1,4$ Hz, 1H, Ph-H), 7,41 (dd, $J = 8,0, 1,3$ Hz, 1H, Ph-H), 8,05 (dd, $J = 7,9, 1,7$ Hz, 1H, Ph-H), 8,19 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) 8 20,75, 20,80, 20,93 (3 OCOCH_3), 22,94 (NHCOCH_3), 49,00 (C-5), 52,74 (COOCH_3), 57,92 (C-4), 62,18 (C-9), 67,81 (C-7), 70,86 (C-8), 76,48 (C-6), 107,11 (C-3), 122,63 (triazol-C-5), 127,22 (Ph), 128,62 (Ph, q carbono), 129,44 (Ph), 129,80 (Ph), 130,28 (Ph), 131,42 (Ph, q carbono), 144,31 (triazol-C-4), 145,96 (C-2), 161,34 (COOCH_3), 170,20, 170,28, 170,79, 171,01 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{ClN}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 615,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

5-Acetamido-2,6-anhidro-4-(4-(2-clorofenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-3,4,5-trideoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE1172-78).

30

35

40



IE1172-78

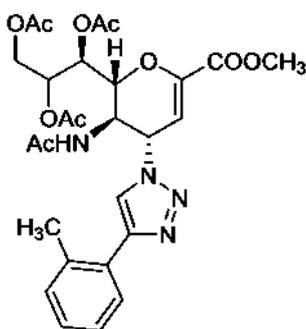
45

50

Rendimiento = 89 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,93 (s, 3H, NAc), 3,68 (dd, $J = 12,0, 6,4$ Hz, 1H, H-9), 3,73 (dd, $J = 9,7, 1,3$ Hz, 1H, H-7), 3,93 (dd, $J = 12,0, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,48 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H, H-5), 4,61 (dd, $J = 11,1, 1,3$ Hz, 1H, H-6), 5,58 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,93 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,37-7,51 (m, 2H, 2Ph-H), 7,58 (dd, $J = 7,5, 1,9$ Hz, 1H, Ph-H), 7,81 (dd, $J = 7,0, 2,5$ Hz, 1H, Ph-H), 8,49 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 21,70 (NHCOCH_3), 48,67 (C-5), 60,10 (C-4), 63,09 (C-9), 68,10 (C-7), 69,74 (C-8), 75,39 (C-6), 101,87 (C-3), 123,78 (triazol-C-5), 127,36 (Ph), 128,03 (Ph q carbono), 129,94 (Ph), 130,10 (Ph), 130,19 (Ph), 131,50 (Ph q carbono), 144,37 (triazol-C-4), 150,41 (C-2), 168,78 (COONa), 173,56 (NHCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClN}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 497,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

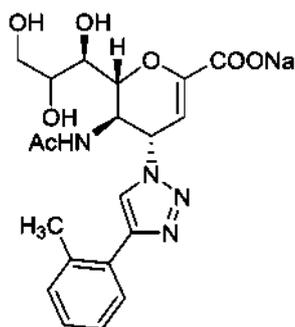
55

5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-4-(4-(2-metilfenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE1172-72).



IE1172-72

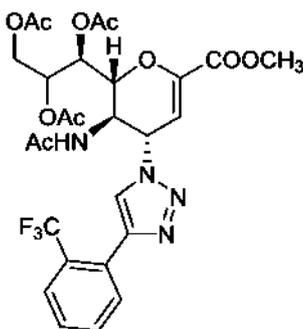
15 La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetona: hexano (4:3) produjo (81 %) de **IE1172-72**
 puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,76 (s, 3H, NAc), 2,04 (s, 3H, OAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,07 (s, 3H, OAc), 2,33 (s, 3H,
 Ph- CH_3), 3,82 (s, 3H, COOCH_3), 4,19 (dd, $J = 12,5, 7,1$ Hz, 1H, H-9), 4,39 (q, $J = 9,9$ Hz, 1H, H-5), 4,71 (dd, $J = 12,4, 2,7$
 Hz, 1H, H-9'), 4,82 (dd, $J = 10,4, 2,0$ Hz, 1H, H-6), 5,41 (ddd, $J = 7,6, 5,1, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 5,57 (dd, $J = 5,2, 1,9$ Hz, 1H,
 H-7), 5,86 (dd, $J = 10,2, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,07 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,16-7,30 (m, 4H, NH, 3PH-H), 7,60 (m, 1H, Ph-
 H), 7,70 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 20,72, 20,81, 20,93 (3 OCOCH_3), 21,09 (Ph- CH_3), 22,82
 (NHCOCH₃), 48,63 (C-5), 52,73 (COOCH_3), 58,03 (C-4), 62,21 (C-9), 67,76 (C-7), 70,93 (C-8), 76,72 (C-6), 107,38 (C-3),
 121,28 (triazol-C-5), 126,16 (Ph), 128,58 (Ph), 128,94 (Ph), 129,23 (Ph, q carbono), 130,90 (Ph), 135,64 (Ph, q carbono),
 145,85 (C-2), 147,15 (triazol-C-4), 161,37 (COOCH_3), 170,07, 170,30, 170,80, 171,06 (NHCOCH₃, 3 OCOCH_3); LRMS
 [C₂₇H₃₂N₄O₁₀] (m/z): (modo iónico +vo) 595,2 [M+Na]⁺.



IE1172-82

40 Rendimiento = 85 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,93 (s, 3H, NAc), 2,36 (s, 3H, Ph- CH_3), 3,68 (dd, $J = 11,9, 6,3$ Hz, 1H,
 H-9), 3,74 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, H-7), 3,93 (dd, $J = 12,0, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,48 (t,
 $J = 10,3$ Hz, 1H, H-5), 4,60 (dd, $J = 10,8, 1,3$ Hz, 1H, H-6), 5,58 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,92 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-
 3), 7,29-7,46 (m, 3H, 3Ph-H), 7,58 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, Ph-H), 8,19 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 19,77
 (Ph- CH_3), 21,67 (NHCOCH₃), 48,69 (C-5), 60,06 (C-4), 63,09 (C-9), 68,10 (C-7), 69,74 (C-8), 75,39 (C-6), 101,92 (C-3),
 122,60 (triazol-C-5), 126,17 (Ph), 128,94 (Ph q carbono), 129,01 (Ph), 129,03 (Ph), 130,76 (Ph), 136,45 (Ph q carbono),
 146,87 (triazol-C-4), 150,42 (C-2), 168,80 (COONa), 173,52 (NHCOCH₃); LRMS [C₂₀H₂₃N₄NaO₇] (m/z): (modo iónico +vo)
 477,2 [M+Na]⁺.

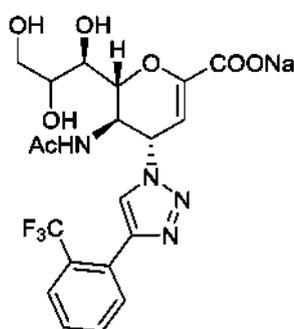
50 5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(2-(trifluorometil) fenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-
 galacto-non-2-enonato de metilo (IE1172-74).



IE1172-74

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetona: hexano (3:2) produjo (90 %) de **IE1172-74** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,75 (s, 3H, NAc), 2,04 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 3,83 (s, 3H, COOCH_3), 4,14-4,35 (m, 2H, H-9, H-5), 4,70 (dd, $J = 12,4, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,92 (dd, $J = 10,6, 1,8$ Hz, 1H, H-6), 5,42 (ddd, $J = 6,8, 5,4, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,54 (dd, $J = 5,5, 1,8$ Hz, 1H, H-7), 5,97 (dd, $J = 10,1, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,08 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 6,99 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, NH), 7,48 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ph-H), 7,61 (td, $J = 7,7, 1,4$ Hz, 1H, Ph-H), 7,72 (dd, $J = 8,1, 1,4$ Hz, 1H, Ph-H), 7,75-7,84 (m, 2H, Ph-H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 20,76, 20,79, 20,92 (3 OCOCH_3), 22,73 (NHCOCH_3), 49,38 (C-5), 52,74 (COOCH_3), 57,48 (C-4), 62,16 (C-9), 67,80 (C-7), 70,79 (C-8), 76,25 (C-6) 7 107,09 (C-3), 122,58 (Ph, q carbono), 122,82 (q, $J = 5,1, 4,6$ Hz, triazol-C-5), 125,29 (Ph, q carbono), 126,22 (q, $J = 5,5$ Hz, Ph), 127,61 (q, $J = 30,4$ Hz, CF_3), 128,71 (Ph), 131,79 (Ph), 132,09 (Ph), 144,40 (triazol-C-4), 145,84 (C-2), 161,35 (COOCH_3), 170,20, 170,26, 170,75, 171,19 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 649,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

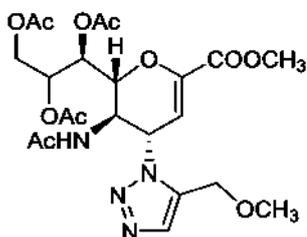
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(2-(trifluorometil) fenil)-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE1172-83)



IE1172-83

Rendimiento = 77 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,94 (s, 3H, NAc), 3,68 (dd, $J = 11,8, 6,3$ Hz, 1H, H-9), 3,73 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, H-7), 3,93 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, $J = 9,3, 6,2, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,51 (t, $J = 10,2$ Hz, 1H, H-5), 4,59 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-6), 5,61 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,93 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,61-7,70 (m, 2H, 2Ph-H), 7,75 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ph-H), 7,90 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ph-H), 8,23 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 21,61 (NHCOCH_3), 48,62 (C-5), 59,96 (C-4), 63,09 (C-9), 68,10 (C-7), 69,73 (C-8), 75,48 (C-6), 101,96 (C-3), 122,49 (Ph q carbono), 123,77 (q, $J = 3,0$ Hz, triazol-C-5), 125,20 (Ph q carbono), 126,32 (q, $J = 5,4$ Hz, Ph), 127,39-128,51 (m, CF_3), 129,38 (Ph), 131,99 (Ph), 132,27 (Ph), 144,83 (triazol-C-4), 150,33 (C-2), 168,75 (COONa), 173,52 (NHCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 531,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(5-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE1172-79).

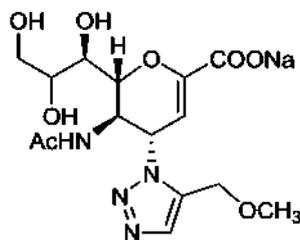


IE1172-79

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de acetato de etilo:acetona (6:1) produjo (68 %) de **IE1172-79** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,87 (s, 3H, NAc), 2,01 (s, 3H, OAc), 2,03 (s, 3H, OAc), 2,07 (s, 3H, OAc), 3,34 (s, 3H, CH_2OCH_3), 3,79 (s, 3H, COOCH_3), 4,15-4,27 (m, 2H, H-5, H-9), 4,34-4,50 (m, 2H, CH_2O), 4,60 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 5,09 (dd, $J = 10,7, 1,8$ Hz, 1H, H-6), 5,42 (td, $J = 6,2, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,49 (dd, $J = 6,3, 1,8$ Hz, 1H, H-7), 5,91 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 6,05 (dd, $J = 9,9, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 7,26 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, NH), 7,46 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 20,71, 20,76, 20,92 (3 OCOCH_3), 23,04 (NHCOCH_3), 50,03 (C-5), 52,60 (COOCH_3), 55,20 (C-4), 58,59 (CH_2OCH_3), 61,94 (CH_2OCH_3), 62,10 (C-9), 67,74 (C-7), 70,25 (C-8), 75,54 (C-6), 107,87 (C-3), 133,48 (triazol-C-4), 134,46 (triazol-C-5), 145,50 (C-2), 161,55 (COOCH_3), 169,96, 170,21, 170,66, 171,54 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 549,3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(5-metoximetil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio

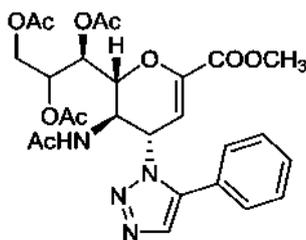
(IE1172-87).



IE1172-87

Rendimiento = 83 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,89 (s, 3H, NAc), 3,40 (s, 3H, OCH_3), 3,65-3,74 (m, 2H, H-9, H-7), 3,93 (dd, $J = 12,0, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,57 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H, H-6), 4,61-4,73 (m, 3H, H-5, OCH_2), 5,62 (dd, $J = 9,6, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 5,85 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 7,81 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 21,73 (NHCOCH_3), 47,97 (C-5), 57,87 (OCH_3), 58,92 (C-4), 61,34 (OCH_2), 63,08 (C-9), 68,08 (C-7), 69,70 (C-8), 75,34 (C-6), 102,36 (C-3), 134,66 (triazol-C-5), 134,73 (triazol-C-4), 150,02 (C-2), 168,75 (COONa), 173,61 (NHCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 431,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

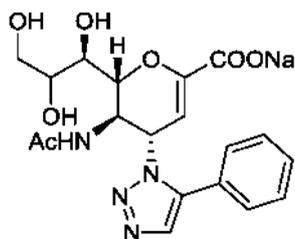
5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(5-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE1172-39).



IE1172-39

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de hexano: acetona (4:3) produjo (82 %) de **IE1172-39** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,74 (s, 3H, NAc), 2,02 (s, 3H, OAc), 2,04 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 3,80 (s, 3H, COOCH_3), 4,04 (td, $J = 10,1, 7,3$ Hz, 1H, H-5), 4,21 (m, 1H, H-9), 4,51 (m, 1H, H-9'), 5,05 (d, $J = 10,5$ Hz, 1H, H-6), 5,31-5,46 (m, 2H, H-7, H-8), 5,98 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, H-3), 6,09 (dd, $J = 9,7, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 6,75 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, NH), 7,30-7,32 (m, 2H, 2Ph-H), 7,47-7,53 (m, 3H, 3Ph-H), 7,58 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 20,73, 20,79, 20,89 (3 OCOCH_3), 23,03 (NHCOCH_3), 50,85 (C-5), 52,58 (COOCH_3), 54,24 (C-4), 62,01 (C-9), 67,63 (C-7), 69,87 (C-8), 74,78 (C-6), 108,02 (C-3), 12670,1 (Ph q carbono), 129,07 (Ph), 129,23 (Ph), 130,07 (Ph), 132,70 (triazol-C-4), 139,35 (triazol-C-5), 145,49 (C-2), 161,49 (COOCH_3), 169,79, 170,40, 170,58, 171,03 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 581,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(5-fenil-[1,2,3,]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE1172-45).



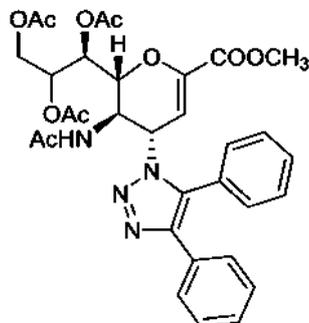
IE1172-45

Rendimiento = 88 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,72 (s, 3H, NAc), 3,55 (d, $J = 9,7$ Hz, 1H, H-7), 3,62 (dd, $J = 12,0, 6,3$ Hz, 1H, H-9), 3,87 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 3,95 (ddd, $J = 9,3, 6,2, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 4,33-4,51 (m, 2H, H-5, H-6), 5,63 (dd, $J = 9,3, 2,2$ Hz, 1H, H-4), 5,98 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,46-7,56 (m, 2H, 2Ph-H), 7,57-7,61 (m, 3H, 3Ph-H), 7,85 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 21,88 (NHCOCH_3), 48,83 (C-5), 57,52 (C-4), 63,00 (C-9), 67,95 (C-7), 69,64 (C-8), 75,01 (C-6), 103,14 (C-3), 125,71 (Ph q carbono), 129,13 (Ph), 129,28 (Ph), 130,10 (Ph), 133,02 (triazol-C-4), 139,88 (triazol-C-5), 149,90 (C-2), 168,80 (COONa), 173,30 (NHCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 431,2 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

+vo) 462,6 [M+Na]⁺.

5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4,5-difenil-[1,2,3]triazol-
 enonato de metilo (IE1172-90).

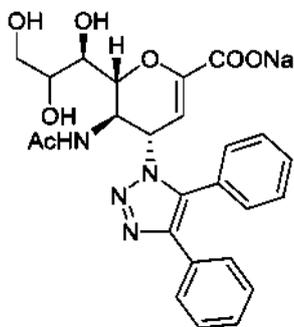
1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-



IE1172-90

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de hexano: acetona (3:2) produjo (79 %) de **IE1172-90** puro. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1,82 (s, 3H, NAc), 2,03 (s, 6H, 2OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 3,78 (s, 3H, COOCH₃), 4,17-4,27 (m, 2H, H-5, H-9), 4,52 (dd, *J* = 12,5, 2,6 Hz, 1H, H-9'), 5,07 (d, *J* = 10,4 Hz, 1H, H-6), 5,40 (td, *J* = 6,3, 2,5 Hz, 1H, H-8), 5,45 (dd, *J* = 6,8, 1,7 Hz, 1H, H-7), 5,79-5,93 (m, 2H, H-3, H-4), 7,13-7,27 (m, 6H, NH, 5Ph-H), 7,28-7,34 (m, 2H, 2Ph-H), 7,38-7,48 (m, 3H, 3Ph-H); ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 20,75, 20,76, 20,89 (3 OCOCH₃), 23,33 (NHCOCH₃), 50,56 (C-5), 52,54 (COOCH₃), 54,97 (C-4), 62,09 (C-9), 67,54 (C-7), 69,93 (C-8), 75,13 (C-6) 7108,41 (C-3), 126,48 (Ph q carbono), 127,15 (Ph), 128,09 (Ph), 128,44 (Ph), 129,31 (Ph), 130,11 (Ph), 130,14 (Ph), 130,18 (Ph q carbono), 135,11 (triazol-C), 144,35 (triazol-C), 145,49 (C-2), 161,50 (COOCH₃), 169,80, 170,27, 170,63, 171,37 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃); LRMS [C₃₂H₃₄N₄O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 657,3 [M+Na]⁺.

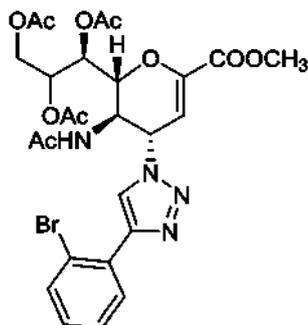
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4,5-difenil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE1172-102).



IE1172-102

Rendimiento = 84 %. ¹H RMN (400 MHz, D₂O): δ 1,83 (s, 3H, NAc), 3,58 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-7), 3,63 (dd, *J* = 12,0, 6,2 Hz, 1H, H-9), 3,88 (dd, *J* = 12,0, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 3,94 (ddd, *J* = 9,4, 6,2, 2,7 Hz, 1H, H-8), 4,37 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, H-6), 4,59 (dd, *J* = 11,2, 9,2 Hz, 1H, H-5), 5,48 (d, *J* = 9,7 Hz, 1H, H-4), 5,90 (s, 1H, H-3), 7,36-7,59 (m, 10H, Ph-H); ¹³C RMN (101 MHz, D₂O): δ 21,94 (NHCOCH₃), 48,33 (C-5), 58,44 (C-4), 63,01 (C-9), 67,98 (C-7), 69,61 (C-8), 74,96 (C-6), 103,15 (C-3), 126,05 (Ph q carbono), 127,31 (Ph), 128,55 (Ph), 128,80 (Ph), 129,21 (Ph), 129,63 (Ph q carbono), 130,25 (Ph), 130,42 (Ph), 135,79 (triazol-C), 144,67 (triazol-C), 149,71 (C-2), 168,67 (COONa), 173,41 (NHCOCH₃); LRMS [C₂₅H₂₅N₄NaO₇] (*m/z*): (modo iónico +vo) 539,2 [M+Na]⁺.

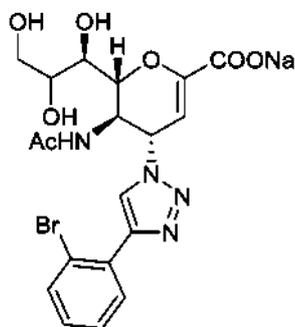
5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-4-(4-(2-bromofenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-3, 4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE1257-75).



IE1257-75

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de hexano: acetona (3:2) produjo (88 %) de **IE1257-75** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,85 (s, 3H, NAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 3,84 (s, 3H, COOCH_3), 4,16-4,28 (m, 2H, H-5, H-9), 4,68 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,91 (dd, $J = 10,7, 1,8$ Hz, 1H, H-6), 5,43 (ddd, $J = 6,7, 5,6, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,53 (dd, $J = 5,8, 1,7$ Hz, 1H, H-7), 6,00 (dd, $J = 9,9, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 6,11 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 6,59 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, NH), 7,20 (ddd, $J = 8,1, 7,3, 1,6$ Hz, 1H, Ph-H), 7,40 (td, $J = 7,5, 1,3$ Hz, 1H, Ph-H), 7,63 (dd, $J = 8,0, 1,2$ Hz, 1H, Ph-H), 7,96 (dd, $J = 7,9, 1,7$ Hz, 1H, Ph-H), 8,22 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 20,80, 20,95 (3 OCOCH_3), 23,13 (NHCOCH_3), 49,56 (C-5), 52,75 (COOCH_3), 57,49 (C-4), 62,10 (C-9), 67,81 (C-7), 70,62 (C-8), 76,10 (C-6), 107,03 (C-3), 121,42 (p h q carbono), 122,66 (Ph), 127,76 (Ph), 129,75 (Ph), 130,65 (Ph), 133,59 (triazol-C5), 145,61 (triazol-C4), 145,94 (C-2), 161,33 (COOCH_3), 170,15, 170,29, 170,71, 171,09 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3).

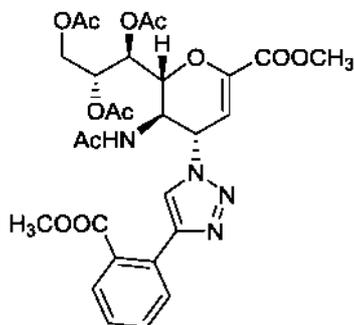
5-Acetamido-2,6-anhidro-4-(4-(2-bromofenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-3,4,5-trideoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE1257-84).



IE1257-84

Rendimiento = 89 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,93 (s, 3H, NAc), 3,62-3,77 (m, 2H, H-7, H-9), 3,92 (dd, $J = 12,0, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,02 (ddd, $J = 9,2, 6,2, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 4,49 (dd, $J = 10,9, 9,6$ Hz, 1H, H-5), 4,60 (dd, $J = 10,9, 1,3$ Hz, 1H, H-6), 5,58 (dd, $J = 9,7, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 5,92 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,36 (ddd, $J = 7,9, 7,3, 1,7$ Hz, 1H, Ph-H), 7,49 (td, $J = 7,6, 1,3$ Hz, 1H, Ph-H), 7,69 (dd, $J = 7,8, 1,7$ Hz, 1H, Ph-H), 7,77 (dd, $J = 8,1, 1,2$ Hz, 1H, Ph-H), 8,45 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 21,77 (NHCOCH_3), 48,68 (C-5), 60,07 (C-4), 63,10 (C-9), 68,11 (C-7), 69,75 (C-8), 75,42 (C-6), 101,91 (C-3), 121,49 (Ph q carbono), 123,72 (Ph), 127,90 (Ph), 129,16 (Ph), 130,16 (Ph q carbono), 130,42 (Ph), 130,71 (Ph), 133,42 (triazol-C5), 145,89 (triazol-C4), 150,39 (C-2), 168,78 (COONa), 173,54 (NHCOCH_3).

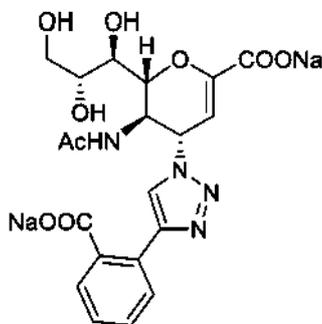
5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-4-(4-(2-metoxicarbonil)fenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE1398-25).



IE1398-25

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de hexano: acetona (4:3) produjo (91 %) de **IE1398-25** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 1,76 (s, 3H, NAc), 2,02 (s, 3H, OAc), 2,04 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 3H, OAc), 3,75 (s, 3H, Ph-COOCH₃), 3,80 (s, 3H, C2-COOCH₃), 4,17 (dd, $J = 12,4, 7,1$ Hz, 1H, H-9), 4,31 (q, $J = 9,8$ Hz, 1H, H-5), 4,69 (dd, $J = 12,5, 2,8$ Hz, 1H, H-9'), 4,78 (d, $J = 10,3$ Hz, 1H, H-6), 5,38 (ddd, $J = 7,6, 5,4, 2,8$ Hz, 1H, H-8), 5,52 (dd, $J = 5,0, 1,9$ Hz, 1H, H-7), 5,78 (dd, $J = 10,2, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 6,03 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 7,13 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H, NH), 7,38 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, Ph-H), 7,50 (td, $J = 7,7, 1,4$ Hz, 1H, Ph-H), 7,65 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ph-H), 7,76 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ph-H), 7,84 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 20,72, 20,79, 20,91 (3 OCOCH₃), 22,80 (NHCOCH₃), 48,65 (C-5), 52,29, 52,66 (2 COOCH₃), 57,96 (C-4), 62,23 (C-9), 67,78 (C-7), 70,91 (C-8), 76,66 (C-6), 107,37 (C-3), 122,06 (Ph), 128,35 (Ph), 129,85 (Ph), 129,99 (Ph q carbono), 130,15 (Ph q carbono), 130,35 (Ph), 131,62 (triazol-C5), 145,79 (triazol-C4), 145,89 (C-2), 161,36 (C2-COOCH₃), 168,39 (Ph-COOCH₃), 170,07, 170,27, 170,76, 171,02 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃); LRMS [$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{12}$] (m/z): (modo iónico +vo) 639,3 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺.

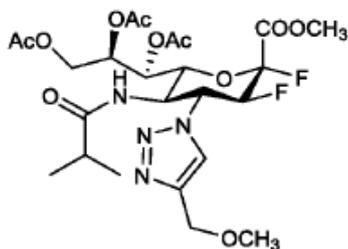
5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(4-(2-metoxicarbonil)fenil)-[1,2,3]triazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE1398-33).



IE1398-33

Rendimiento = 68 %. ^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 1,94 (s, 3H, NAc), 3,66 (dd, $J = 12,2, 6,0$ Hz, 1H, H-9), 3,72 (dd, $J = 9,8, 1,4$ Hz, 1H, H-7), 3,93 (dd, $J = 12,0, 2,9$ Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, $J = 9,4, 6,4, 2,7$ Hz, 1H, H-8), 4,47 (t, $J = 10,3$ Hz, 1H, H-5), 4,61 (dd, $J = 10,9, 1,4$ Hz, 1H, H-6), 5,59 (dd, $J = 9,5, 2,1$ Hz, 1H, H-4), 5,95 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,43-7,55 (m, 3H, 3 Ph-H), 7,75 (dd, $J = 6,6, 1,5$ Hz, 1H, Ph-H), 8,18 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (101 MHz, D_2O): δ 21,76 (NHCOCH₃), 48,80 (C-5), 59,69 (C-4), 63,10 (C-9), 68,13 (C-7), 69,77 (C-8), 75,40 (C-6), 102,22 (C-3), 122,33 (triazol-C5), 125,00 (Ph q carbono), 126,44 (Ph), 128,30 (Ph), 128,57 (Ph), 128,79 (Ph), 138,95 (Ph q carbono), 146,15 (triazol-C4), 150,22 (C-2), 168,85 (C2-COONa), 173,80 (NHCOCH₃), 178,10 (Ph-COONa); LRMS [$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_9$] (m/z): (modo iónico +vo) 528,8 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺

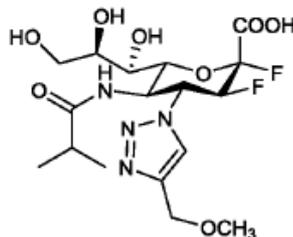
7,8,9-Tri-O-acetil-3,4,5-tridesoxi-3-fluoro-5-isobutiramido-4-(4-metoximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-eritro- β -L-gluco-non-2-ulopiranosilonato de metilo (IE1257-22). (referencia)



IE1257-22

La purificación por cromatografía en gel de sílice mediante el uso de hexano/acetona (3:2) produjo (57 mg, 81 %) de **10** puro. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 0,96-1,01 (m, 6H, isobut-2 CH_3), 2,01 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,13 (s, 3H, OAc), 2,23 (dq, $J = 13,0, 6,8$ Hz, 1H, isobut-CH), 3,36 (s, 3H, OCH_3), 3,90-3,96 (m, 4H, COOCH_3 , H-5), 4,19 (dd, $J = 12,6, 4,6$ Hz, 1H, H-9), 4,27 (dd, $J = 12,6, 2,5$ Hz, 1H, H-9'), 4,54 (s, 2H, OCH_2), 4,99-5,30 (m, 3H, H-3, H-6, H-7), 5,37 (ddd, $J = 8,6, 4,6, 2,4$ Hz, 1H, H-8), 6,19-6,29 (m, 2H, H-4, NH), 7,60 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3): 8 18,86 (isobut- CH_3), 19,32 (isobut- CH_3), 20,59, 20,75, 20,79 (3 OCOCH_3), 35,53 (isobut-CH), 50,84 (d, $J = 5,8$ Hz, C-5), 53,62 (COOCH_3), 58,34 (OCH_3), 59,00-59,40 (m, C-4), 61,86 (C-9), 65,50 (OCH_2), 67,08 (C-7), 68,29 (C-8), 71,51 (C-6), 90,64 (dd, $J = 196,1,30,3$ Hz, C-3), 105,58 (dd, $J = 230,3, 26,8$ Hz, C-2), 124,52 (triazol-CH), 144,83 (triazol-q carbono), 164,51 (d, $J = 32,9$ Hz, COOCH_3), 169,56, 170,41, 170,69 (3 OCOCH_3), 178,35 (isobut-CO); ^{19}F RMN (376 MHz, CDCl_3): δ -118,67 (d, $J = 14,0$ Hz, F-2a), -197,42 (d, $J = 13,2$ Hz, F-3 β); LRMS [$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_{11}$] (m/z): (modo iónico +vo) 615,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

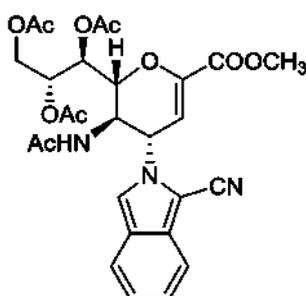
Fluoruro de 3,4,5-tridesoxi-3-fluoro-5-isobutiramido-4-(4-metoximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-D-eritro- β -L-gluco-non-2-ulopiranosónico (IE1257-24). (referencia)



IE1257-24

^1H RMN (400 MHz, D_2O): δ 0,81 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 0,94 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobut- CH_3), 2,35 (p, $J = 6,9$ Hz, 1H, isobut-CH), 3,38 (s, 3H, OCH_3), 3,54 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-7), 3,61 (m, 1H, H-9), 3,78-3,91 (m, 2H, H-8, H-9'), 4,52-4,76 (m, 3H, OCH_2 , H-6), 4,85 (m, 1H, H-5), 5,32 (ddd, $J = 49,5, 13,7, 9,7$ Hz, 1H, H-3), 5,75 (q, $J = 11,2$ Hz, 1H, H-4), 8,28 (s, 1H, triazol-CH); ^{13}C RMN (100 MHz, D_2O): δ 18,11 (isobut- CH_3), 18,65 (isobut- CH_3), 34,87 (isobut-CH), 48,15 (d, $J = 6,1$ Hz, C-5), 57,26 (OCH_3), 63,16 (C-9), 63,18-63,58 (m, C-4), 64,13 (OCH_2), 67,85 (C-7), 69,83 (C-8), 73,73 (d, $J = 3,3$ Hz, C-6), 90,22 (dd, $J = 190,9, 32,6$ Hz, C-3), 106,79 (dd, $J = 224,1, 27,8$ Hz, C-2), 124,89 (triazol-CH), 144,09 (triazol-q C), 169,21 (d, $J = 30,7$ Hz, COOH), 180,88 (isobut-CO); ^{19}F RMN (376 MHz, D_2O): δ -112,75 (d, $J = 13,8$ Hz, F-2a), -199,41 (d, $J = 14,3$ Hz, F-3 β); LRMS [$\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_4\text{NaO}_8$] (m/z): (modo iónico +vo) 496,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (API) (m/z): $[\text{M}+1]^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+1]^+$ 453,1791; encontrado, 453,1810.

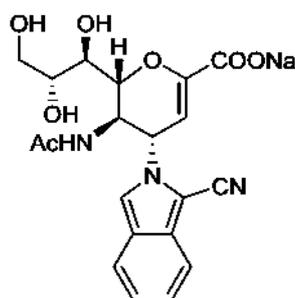
5-Acetamido-7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-4-(1-ciano-2H-isoindol-2-il)-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-ga-lacto-non-2-enonato de metilo (IE889-76).



IE889-76

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,60 (s, 3H, NAc), 1,82 (s, 6H, 2 OAc), 1,84 (s, 3H, OAc), 3,60 (s, 3H, COOCH₃), 3,96 (dd, *J* = 12,7, 7,0 Hz, 1H, H-9), 4,19 (q, *J* = 9,9 Hz, 1H, H-5), 4,40-4,50 (m, 2H, H-6, H-9'), 5,16 (ddd, *J* = 7,5, 6,0, 2,4 Hz, 1H, H-8); 5,22-5,33 (m, 2H, H-4, H-7), 5,86 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H, H-3), 6,20 (d, *J* = 9,6 Hz, 1H, NHAc), 6,84 (m, 1H, Ar-H), 6,99 (m, 1H, Ar-H), 7,26 (s, 1H, Ar-H-3'), 7,37 (m, 2H, Ar-H-4', Ar-H-7'); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 20,76, 20,92 (3 OCOCH₃), 22,97 (NHCOCH₃), 49,26 (C-5), 52,79 (COOCH₃), 58,00 (C-4), 62,08 (C-9), 67,67 (C-7), 70,86 (C-8), 77,06 (C-6) 793,82 (Ar-C-CN), 107,66 (C-3), 114,69 (CN), 117,55(Ar), 117,78 (Ar), 121,14 (Ar), 123,23 (Ar), 124,63 (Ar q carbono), 126,08 (Ar), 131,60 (Ar q carbono), 146,63 (C-2), 161,29 (COOCH₃), 170,17, 170,30, 170,63 (NHCOCH₃, 3 OCOCH₃); LRMS [C₂₇H₂₉N₃O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 578,1 [M+Na]⁺.

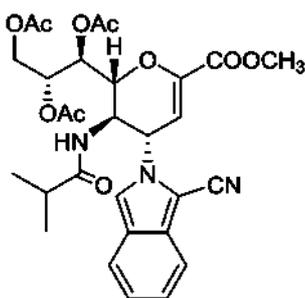
5-Acetamido-2,6-anhidro-4-(1-ciano-2*H*-isoindol-2-il)-3,4,5-tridesoxi-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE889-80).



IE889-80

¹H RMN (300 MHz, D₂O): 8 1,91 (s, 3H, NAc), 3,61-3,77 (m, 2H, H-7, H-9), 3,94 (dd, *J* = 11,9, 2,6 Hz, 1H, H-9'), 4,05 (ddd, *J* = 9,2, 6,2, 2,6 Hz, 1H, H-8), 4,50 (m, 1H, H-5), 4,64 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H, H-6), 5,47 (dd, *J* = 9,4, 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,96 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-3), 7,21 (m, 1H, Ar-H), 7,37 (ddd, *J* = 8,9, 6,7, 1,1 Hz, 1H, Ar-H), 7,65-7,87 (m, 3H, Ar-H-3', Ar-H-4', Ar-H-7'); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 21,77 (NHCOCH₃), 49,83 (C-5), 59,20 (C-4), 63,08 (C-9), 68,09 (C-7), 69,77 (C-8), 75,41 (C-6), 92,08 (Ar-C-CN), 103,30 (C-3), 11530 (CN), 117,35 (Ar), 119,65 (Ar), 121,36 (Ar), 122,82 (Ar), 124,09 (Ar q carbono), 125,99 (Ar), 132,03 (Ar q carbono), 150,56 (C-2), 168,78 (COONa), 173,36 (NHCOCH₃); LRMS [C₂₀H₂₀N₃NaO₇] (*m/z*): (modo iónico +vo) 460,1 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₀H₂₀N₃Na₂O₇ [M+Na]⁺ 460,1091; encontrado, 460,1097.

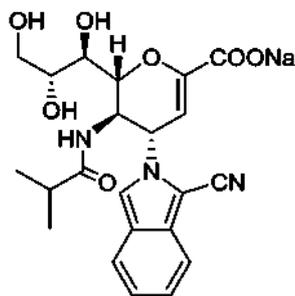
7,8,9-tri-O-acetil-2,6-anhidro-4-(1-ciano-2*H*-isoindol-2-il)-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE889-92).



IE889-92

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0,92 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, isobutiril-CH₃), 1,00 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, isobutiril-CH₃), 2,07 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,27 (m, 1H, isobutiril-CH), 3,86 (s, 3H, COOCH₃), 4,23 (dd, *J* = 12,4, 6,6 Hz, 1H, H-9), 4,50 (m, 1H, H-5), 4,68 (dd, *J* = 12,5, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,77 (d, *J* = 10,6 Hz, 1H, H-6), 5,40 (m, 1H, H-8), 5,51 (dd, *J* = 5,6, 1,6 Hz, 1H, H-7), 5,62 (dd, *J* = 9,7, 2,4 Hz, 1H, H-4), 6,15 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H-3), 6,24 (d, *J* = 9,4 Hz, 1H, NH), 7,11 (dd, *J* = 8,6, 6,7 Hz, 1H, Ar-H), 7,28 (dd, *J* = 8,4, 6,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (s, 1H, Ar-H-3'), 7,60-7,64 (m, 2H, Ar-H-4', Ar-H-7'); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 18,77, 19,05 (isobutiril-2CH₃), 20,69, 20,73, 20,90 (3 OCOCH₃), 35,51 (isobutiril-CH), 49,11 (C-5), 52,78 (COOCH₃), 57,88 (C-4), 62,05 (C-9), 67,61 (C-7), 70,80 (C-8), 77,01 (C-6), 93,83 (Ar-C-CN), 107,56 (C-3), 114,80 (CN), 117,58(Ar), 117,81 (Ar), 121,20 (Ar), 123,22 (Ar), 124,66 (Ar q carbono), 126,15 (Ar), 131,56 (Ar q carbono), 146,50 (C-2), 161,31 (COOCH₃), 170,10, 170,14, 170,57 (3 OCOCH₃), 177,07 (isobutiril-CO); LRMS [C₂₉H₃₃N₃O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 606,4 [M+Na]⁺.

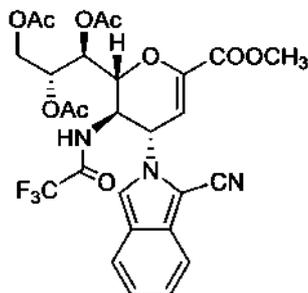
2,6-Anhidro-4-(1-ciano-2*H*-isoindol-2-il)-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE889-99).



IE889-99

^1H RMN (300 MHz, D_2O): 8,088 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobutiril- CH_3), 0,97 (d, $J = 6,9$ Hz, 3H, isobutiril- CH_3), 2,44 (m, 1H, isobutiril-CH), 3,62-3,75 (m, 2H, H-7, H-9), 3,93 (dd, $J = 12,0, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,04 (ddd, $J = 9,3, 6,3, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,56-4,66 (m, 2H, H-5, H-6), 5,47 (dd, $J = 9,6, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 5,95 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H-3), 7,20 (ddd, $J = 7,8, 6,8, 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,36 (ddd, $J = 8,3, 6,8, 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,70 (dd, $J = 8,6, 1,1$ Hz, 1H, Ar-H), 7,74-7,87 (m, 2H, 2 Ar-H); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O): 8,18,16, 18,59 (isobutiril- 2CH_3), 35,06 (isobutiril-CH), 49,13 (C-5), 59,30 (C-4), 63,07 (C-9), 68,20 (C-7), 69,81 (C-8), 75,45 (C-6), 92,08 (Ar-C-CN), 103,34 (C-3), 115,47 (CN), 117,33 (Ar), 120,04 (Ar), 121,38 (Ar), 122,81 (Ar), 124,04 (Ar q carbono), 126,01 (Ar), 132,04 (Ar q carbono), 150,37 (C-2), 168,87 (COONa), 180,37 (isobutiril-CO); LRMS [$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 488,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_7$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 488,1404; encontrado, 488,1400.

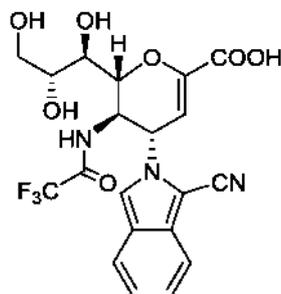
7,8,9-Tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-4-(1-ciano-2*H*-isoindol-2-il)-3,4,5-trideoxi-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)-*D*-glicero-*D*-galactono-2-enonato de metilo (IE927-93).



IE927-93

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 2,07 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 3,86 (s, 3H, COOCH_3), 4,22 (dd, $J = 12,5, 6,6$ Hz, 1H, H-9), 4,54 (q, $J = 9,9$ Hz, 1H, H-5), 4,68 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,82 (dd, $J = 10,6, 1,9$ Hz, 1H, H-6), 5,43 (td, $J = 6,0, 5,5, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,52 (dd, $J = 5,6, 1,8$ Hz, 1H, H-7), 5,62 (dd, $J = 9,7, 2,4$ Hz, 1H, H-4), 6,17 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, H-3), 7,13 (ddd, $J = 7,9, 6,8, 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,28 (ddd, $J = 8,4, 6,7, 1,0$ Hz, 1H, Ar-H), 7,52 (s, 1H, Ar-H-3'), 7,58-7,69 (m, 2H, Ar-H-4', Ar-H-7'), 7,91 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, NH); ^{13}H RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 20,50, 20,71, 20,91 (3 OCOCH_3), 49,81 (C-5), 52,93 (COOCH_3), 57,45 (C-4), 61,93 (C-9), 67,46 (C-7), 70,64 (C-8), 76,40 (C-6), 93,61 (Ar-C-CN), 107,14 (C-3), 113,24-117,05 (CF_3), 114,37 (CN), 117,73 (Ar), 117,80 (Ar), 121,08 (Ar), 123,65 (Ar), 124,93 (Ar q carbono), 126,55 (Ar), 131,85 (Ar q carbono), 146,73 (C-2), 157,56 (q, $J_{\text{C,F}} = 38,8$ Hz, COCF_3), 161,03 (COOCH_3), 169,91, 170,38, 170,71 (3 OCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 632,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

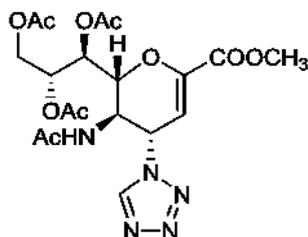
2,6-Anhidro-4-(1-ciano-2*H*-isoindol-2-il)-3,4,5-trideoxi-5-(2,2,2-trifluoroacetamido)-*D*-glicero-*D*-galactono-2-enonato de sodio (IE927-99).



IE927-99

^1H RMN (300 MHz, D_2O): 8,360-3,75 (m, 2H, H-7, H-9), 3,93 (dd, $J = 11,9, 2,7$ Hz, 1H, H-9'), 4,07 (ddd, $J = 9,4, 6,4, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 4,64-4,74 (m, 2H, H-5, H-6), 5,57 (dd, $J = 9,4, 2,3$ Hz, 1H, H-4), 6,00 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H-3), 7,21 (m, 1H, Ar-H), 7,36 (m, 1H, Ar-H), 7,69 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,84 (s, 1H, Ar-H-3'); ^{13}C RMN (75 MHz, D_2O) δ 50,48 (C-5), 58,73 (C-4), 63,00 (C-9), 68,08 (C-7), 69,66 (C-8), 75,05 (C-6), 91,94 (Ar-C-CN), 103,21 (C-3), 109,60-118,88 (CF_3), 115,01 (CN), 117,34 (Ar), 121,36 (Ar), 123,02 (Ar), 124,19 (Ar q carbono), 126,23 (Ar), 132,12 (Ar q carbono), 150,62 (C-2), 158,20 (q, $J_{\text{C,F}} = 38,8$ Hz, COCF_3), 168,44 (COONa); LRMS [$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_7$] (m/z): (modo iónico +vo) 514,1 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 492,2; HRMS (API) (m/z): [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{N}_3\text{Na}_2\text{O}_7$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 514,0830; encontrado, 514,0836.

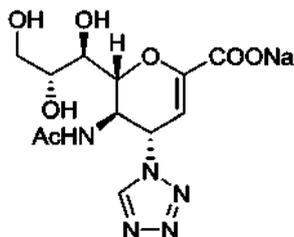
5-Acetamido-7,8,9-tri-*O*-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(1*H*-tetrazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de metilo (IE832-86).



IE832-86

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 1,95 (s, 3H, NAc), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 3,84 (s, 3H, COOCH_3), 4,02 (m, 1H, H-5), 4,22 (dd, $J = 12,6, 6,4$ Hz, 1H, H-9), 4,63 (dd, $J = 12,5, 2,6$ Hz, 1H, H-9'), 4,95 (dd, $J = 10,5, 1,8$ Hz, 1H, H-6), 5,38 (td, $J = 6,2, 2,6$ Hz, 1H, H-8), 5,49 (dd, $J = 5,9, 1,8$ Hz, 1H, H-7), 6,05 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H, H-3), 6,11 (dd, $J = 9,8, 2,5$ Hz, 1H, H-4), 6,67 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, tetrazol-CH); ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 20,72, 20,75, 20,91 (3 OCOCH_3), 23,13 (NHCOCH_3), 49,72 (C-5), 52,87 (COOCH_3), 55,92 (C-4), 61,93 (C-9), 67,62 (C-7), 70,50 (C-8), 75,70 (C-6), 105,19 (C-3), 140,84 (Tetrazol-C5), 146,64 (C-2), 161,07 (COOCH_3), 170,17, 170,27, 170,63, 171,54 (NHCOCH_3 , 3 OCOCH_3); LRMS [$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_{10}$] (m/z): (modo iónico +vo) 506,5 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

5-Acetamido-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-4-(1*H*-tetrazol-1-il)-*D*-glicero-*D*-galacto-non-2-enonato de sodio (IE832-98).



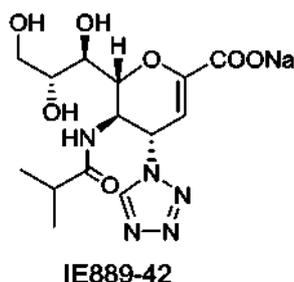
IE832-98

¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ 1,94 (s, 3H, NAc), 3,65-3,74 (m, 2H, H-7, H-9), 3,92 (dd, *J* = 11,9, 2,7 Hz, 1H, H-9'), 4,02 (ddd, *J* = 9,3, 6,2, 2,7 Hz, 1H, H-8), 4,44 (dd, *J* = 10,9, 9,7 Hz, 1H, H-5), 4,62 (dd, *J* = 11,0, 1,4 Hz, 1H, H-6), 5,73 (dd, *J* = 9,6, 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,88 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, H-3); ¹³C RMN (75 MHz, D₂O): δ 21,63 (NHCOCH₃), 48,44 (C-5), 58,77 (C-4), 63,04 (C-9), 67,99 (C-7), 69,67 (C-8), 75,29 (C-6), 100,61 (C-3), 143,99 (Tetrazol-C5) 7750,85 (C-2), 168,53 (COOCH₃), 173,82 (NHCOCH₃); LRMS [C₁₂H₁₆N₅NaO₇] (*m/z*): (modo iónico +vo) 388,4 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₁₂H₁₆N₅Na₂O₇ [M+Na]⁺ 388,083964; encontrado, 388,084945.

7,8,9-Tri-O-acetil-2,6-anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(1*H*-tetrazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de metilo (IE889-36).

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1,05 (d, *J* = 6,9 Hz, 6H, isobutiramido-2CH₃), 2,01 (s, 3H, OAc), 2,05 (s, 6H, 2OAc), 2,34 (m, 1H, isobutiramido-CH), 3,81 (s, 3H, COOCH₃), 4,01 (m, 1H, H-5), 4,18 (dd, *J* = 12,5, 6,3 Hz, 1H, H-9), 4,60 (dd, *J* = 12,6, 2,6 Hz, 1H, H-9'), 5,03 (dd, *J* = 10,5, 1,7 Hz, 1H, H-6), 5,32 (td, *J* = 6,1, 2,5 Hz, 1H, H-8), 5,46 (dd, *J* = 5,9, 1,8 Hz, 1H, H-7), 6,03 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, H-3), 6,14 (dd, *J* = 9,8, 2,5 Hz, 1H, H-4), 6,94 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, NH), 8,65 (s, 1H, tetrazol-CH); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 18,85, 19,27 (isobutiramido-2CH₃), 20,66, 20,84 (3 OCOCH₃), 35,56 (isobutiramido-CH), 49,69 (C-5), 52,79 (COOCH₃), 55,77 (C-4), 61,91 (C-9), 67,49 (C-7), 70,51 (C-8), 75,64 (C-6), 105,15 (C-3), 140,81 (Tetrazol-C5), 146,70 (C-2), 161,18 (COOCH₃), 170,04, 170,15, 170,58 (3 OCOCH₃), 178,53 (isobutiramido-CO); LRMS [C₂₁H₂₉N₅O₁₀] (*m/z*): (modo iónico +vo) 534,3 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₂₁H₂₉N₅NaO₁₀ [M+Na]⁺ 534,180663; encontrado, 543,1788531.

2,6-Anhidro-3,4,5-tridesoxi-5-isobutiramido-4-(1*H*-tetrazol-1-il)-D-glicero-D-galacto-non-2-enonato de sodio (IE889-42).



¹H RMN (300 MHz, D₂O): δ 0,99-1,04 (m, 6H, isobutiramido-2CH₃), 2,46 (m, 1H, isobutiramido-CH), 3,59-3,75 (m, 2H, H-7, H-9), 3,93 (dd, *J* = 12,0, 2,6 Hz, 1H, H-9'), 4,03 (ddd, *J* = 9,7, 6,2, 2,6 Hz, 1H, H-8), 4,49 (dd, *J* = 10,9, 9,7 Hz, 1H, H-5), 4,65 (dd, *J* = 10,9, 1,2 Hz, 1H, H-6), 5,76 (dd, *J* = 9,7, 2,3 Hz, 1H, H-4), 5,88 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, H-3), 9,38 (s, 1H, tetrazol-CH); LRMS [C₁₄H₂₀N₅NaO₇] (*m/z*): (modo iónico +vo) 416,0 [M+Na]⁺; HRMS (API) (*m/z*): [M+Na]⁺ calculado para C₁₄H₂₀N₅Na₂O₇ [M+Na]⁺ 416,115264; encontrado, 416,116886.

Biología

Células y virus:

Las células A549 (células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas) fueron proporcionadas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (86012804-1VL, Sigma Aldrich). Las células se propagaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con glutamina al 1 % (200 mM) y suero fetal bovino al 5 %. Para los procedimientos de infección y postinfección, las células A549 se mantuvieron en DMEM suplementado con glutamina al 1 % solamente. Las células epiteliales bronquiales/traqueales humanas normales (NHBE) (CC-2540, lote 313831, Lonza) se amplificaron en medio de crecimiento B-ALI™ (Lonza) y se usó el mismo medio para estudios de infección y postinfección. Las células LLC-MK2 (riñón de mono Rhesus, ATCC CCL-7) se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (Lonza) suplementado con glutamina al 1 % (200 mM) y 2 % de suero fetal bovino inactivado por calor. Durante la infección por hPIV-3 y la incubación posterior a la infección, las células LLC-MK2 se mantuvieron en EMEM suplementadas con glutamina al 1 %. Todas las líneas celulares se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂.

hPIV-3 (cepa C-243) se obtuvo de la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC, Manassas, VA). El virus se propagó en células LLC-MK2 con EMEM suplementado con glutamina (EMEM_{inf}) a 35 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂. El sobrenadante de cultivo que contenía virus se recogió 3 a 4 días después de la infección, a la vez que se monitorizaron los efectos citopáticos, y se clarificó a partir de los restos celulares mediante centrifugación (3000 RCF durante 15 min). El virus se concentró al menos 10 veces mediante el uso de una unidad de filtro Amicon Ultra de 30 kDa (Millipore, Billerica, MA) para usar en ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HI). Los ensayos de inhibición de la neuraminidasa (NI) y los experimentos de RMN STD utilizaron virus precipitado con PEG y después purificado como se describió anteriormente.

El sobrenadante de hPIV-3 clarificado se mezcló con PEG6000 (concentración final al 8 %) y NaCl (concentración final 0,4 M) y después se incubó durante la noche a 4 °C en agitación suave. El complejo PEG6000/hPIV-3 se sedimentó por centrifugación a 3000 RCF durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se usó un volumen de tampón GNTE (glicina 200 mM, NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4) correspondiente a al menos 1:40 del volumen de suspensión de virus inicial para resuspender el sedimento durante la noche a 4 °C. La suspensión de virus se homogeneizó mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo seguido de una interrupción mecánica de los agregados de virus restantes mediante el uso de un homogeneizador Dounce con mano de mortero "ajustada". El homogeneizado de hPIV-3 se cargó en la parte superior de un gradiente de sacarosa no lineal al 30 % - 60 % preparado en tampón GNTE y se centrifugó a 100 000 RCF durante 2 h 30 min a 4 °C sin freno para la desaceleración. El virus se concentró en la interfaz de sacarosa al 30 % - 60 % y después se recogió y almacenó a -80 °C para ensayos de NI o a 4 °C para experimentos de RMN STD.

Inhibidores de HN de hPIV-3: Los compuestos **2, 3, 5-10** se proporcionaron cada uno como un polvo liofilizado y después se solubilizaron en agua estéril para generar una solución madre 10 mM. Las soluciones se sonicaron durante 15 minutos para permitir la disolución completa y después se esterilizaron por filtración. La solución madre se almacenó en un frasco de vidrio a -20 °C y se diluyó en fresco en un tampón apropiado antes de su uso. Para experimentos de RMN STD, se prepararon soluciones madre en D₂O a 100 mM. Las soluciones se procesaron y almacenaron como se describió anteriormente.

Expresión y purificación de HN recombinante: La proteína HN se expresó mediante el uso del sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac® (Invitrogen, Carlsbad, CA) sobre la base de un procedimiento de la literatura sustancialmente modificado. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos para un péptido señal de melitina de abeja (HBM) se añadió hacia el extremo de la secuencia que codifica el ectodominio de HN (aminoácidos 125 a 572). Los codones de esta secuencia (HBM + HN) se optimizaron para la expresión en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) y se ordenó directamente a través del servicio de síntesis de genes DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA) como un gen denominado HBM-HNhPIV-3_{opt}. HBM-HNhPIV-3_{opt} se amplificó por PCR y se ligó en un vector pFastBac/CT-TOPO® que proporciona una etiqueta 6-histidina C-terminal adicional (His-Tag) para fines de purificación y detección.

La generación y la amplificación de baculovirus recombinante que contenía HBM-HNhPIV-3_{opt} se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células Sf9 (Invitrogen), cultivadas en medio de células de insecto sin proteína Insect-XPRESS (Lonza), se infectaron con una alta MOI de baculovirus HBM-HNhPIV-3_{opt}. Cuatro días después de la infección, se recogió el sobrenadante, que contenía HN recombinante, para producir la más alta expresión de proteína. El sobrenadante se aclaró por centrifugación (3000 RCF durante 15 minutos) para eliminar los restos celulares y después se purificó en una columna HisTrap excel de 5 ml (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) según el protocolo del fabricante. La HN recombinante se eluyó con una solución de imidazol 500 mM y las fracciones recogidas se evaluaron mediante un ensayo de actividad de neuraminidasa (NA) (véase más adelante). Las fracciones más activas se agruparon y se concentraron con una unidad de filtro Amicon Ultra de 10 kDa (Millipore) hasta un volumen final de 800 µl. Se realizó una etapa de purificación adicional que empleó cromatografía líquida rápida de proteínas (Amersham Biosciences) en una columna de filtración en gel Superdex 75 (GE Healthcare) a 4 °C y se recogieron fracciones de 1 ml con un Frac-920. Las fracciones que contenían proteínas, según se determinó mediante el monitoreo de la recolección de fracciones a 280 nm, se evaluaron en un ensayo de NA y se sometieron a SDS-PAGE. La proteína HN recombinante purificada y concentrada se almacenó a 4 °C.

Ensayo de inhibición de la hemaglutinación: los inhibidores de HN se evaluaron por duplicado en un ensayo de placa de 96 pocillos con fondo en U. Los compuestos se diluyeron en PBS como una solución 4X para cada concentración analizada (25 µl/pocillo, 1X final). Cada dilución se mezcló con 4 unidades de hemaglutinación (HAU) de hPIV-3 (25 µl/pocillo, 1 HAU final) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se transfirió a hielo y se añadió a cada pocillo un volumen equivalente (50 µl) de glóbulos rojos de cobayo al 0,75 % (Gp-RBC) o glóbulos rojos humanos al 1 % (h-RBC) fríos. La placa se incubó durante 1 h 30 min a 4 °C antes de leer el grado de hemaglutinación. La IC₅₀ de HI se consideró como la concentración de inhibidor que redujo la actividad de hemaglutinina (aglutinación) en un 50 % en comparación con las de una suspensión de virus no tratada.

Ensayo de inhibición de la neuraminidasa

hPIV-3 purificados, los inhibidores y MUN se prepararon y se diluyeron en tampón de reacción NA (NaOAc 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 4,6). La NA, mediante el empleo de diferentes diluciones de hPIV-3, se midió inicialmente para determinar la menor concentración de virus que se utilizaría en los ensayos. Los ensayos de NA se realizaron con suficiente virus purificado para obtener una señal de fluorescencia máxima al menos 5 veces mayor que el fondo para que el experimento se considere estadísticamente significativo. Los ensayos de inhibición de la neuraminidasa (NI) se realizaron por triplicado. Para cada concentración analizada, se añadieron a cada pocillo 2 ml de hPIV-3 purificado y 4 µl de solución inhibidora 2,5X (1X final). La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de que se añadieran a cada pocillo 4 µl de 2'-(4-metilumbeliferil) α-D-N-acetilneuraminida (MUN) 5 mM (2 mM final) y después la placa se incubó a 37 °C durante 30 min con agitación (1000 rpm). La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 190 µl de tampón de glicina (glicina 0,25 M, pH 10,4) a cada pocillo. Se incluyó un control negativo mediante la adición de MUN al virus y después la reacción enzimática se detuvo en t = 0. La fluorescencia relativa (RF) se midió con un lector de múltiples marcadores Victor 3 (PerkinElmer, Waltham, MA). Los datos se procesaron mediante sustracción del fondo (RF del control

negativo) y después se analizaron con GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) para calcular los valores de IC_{50} (regresión no lineal (ajuste de la curva), inhibición de la dosis-respuesta, 3 parámetros logísticos). La concentración del inhibidor que redujo la actividad de la neuraminidasa (fluorescencia relativa) en un 50 % en comparación con la de una suspensión de virus no tratada se consideró como el valor de IC_{50} de NI. Los valores de K_i de los inhibidores **6** y **10** se determinaron mediante experimentos cinéticos de enzimas con virus hPIV-3 completo sobre la base de procedimientos publicados previamente. Así, la actividad neuraminidasa se midió cada 5 minutos durante un periodo de 20 minutos, a cinco concentraciones de sustrato [S]: 2, 4, 8, 10 y 16 mM, y cuatro concentraciones de inhibidor [I]: 0, 0,5, 2,5 y 5 μ M para **10** o 0, 10, 20 y 60 μ M para **6**. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los datos finales se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para la inhibición competitiva mediante el uso de GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) para determinar la constante de Michaelis-Menten (K_m), mediante el uso de datos de los experimentos de [I] = 0 y la variable [S], y los valores de K_i .

Ensayo de inhibición del crecimiento viral: antes de evaluar los mejores inhibidores en los ensayos basados en células, se realizó un ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de los compuestos. No se observó ningún efecto citotóxico después de la incubación durante 48 h de células LLC-MK2 con **6**, **8** y **10** a 303 μ M, la mayor concentración analizada. La inhibición del crecimiento viral se evaluó con el uso de un ensayo de formación de foco mediante la titulación de la progenie en presencia de 2 μ M de **6**, **8** y **10** en EMEM_{inf} de una monocapa de LLC-MK2 confluyente infectada con MOI baja en un formato de placa de 48 pocillos. El inóculo de virus (100 FFU/pocillo) se incubó previamente con **6**, **8** y **10** durante 20 min. La infección se realizó por duplicado y continuó durante 1 hora a 37 °C con agitación suave cada 15 minutos. Se eliminaron los inóculos y se reemplazaron con 500 μ l/pocillo de cada dilución de compuesto 2 μ M respectiva (en EMEM_{inf}).

Se incluyó un control positivo para la infección mediante el uso de las mismas condiciones menos el compuesto. La proliferación de virus en monocapas de células infectadas se mantuvo durante 48 h a 37 °C, 5 % de CO₂. Los sobrenadantes de cultivo de los duplicados se recogieron, se agruparon y se clarificaron a 15,000 RCF durante 10 minutos y se almacenaron a -80 °C. Los sobrenadantes se diluyeron en EMEM_{inf} a 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ para evitar cualquier efecto de algún compuesto restante en la titulación viral posterior. Las titulaciones de virus se realizaron por duplicado mediante el uso de las condiciones descritas anteriormente para la infección por virus. Después de 1 h, se añadió directamente al inóculo Avicel (FMC BioPolymer, Philadelphia, PA) en EMEM_{inf} (concentración final al 1 %) para restringir y localizar la proliferación del virus. La placa se incubó durante 36 a 40 h a 37 °C, 5 % de CO₂ para permitir la formación de focos. Avicel se retiró suavemente y se reemplazó con Paraformaldehído/PBS al 3,7 % y después la placa se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente para la inactivación del virus y la fijación celular. Las monocapas celulares se lavaron tres veces durante 5 minutos cada una con PBS y la peroxidasa endógena se inactivó después con H₂O₂/PBS al 0,3 % durante 30 min a 37 °C. La placa se lavó nuevamente tres veces durante 5 minutos cada una con PBS y se incubó con IgG monoclonal de ratón anti-HN de hPIV-3 (Fitzgerald, clon # M02122321, 2,0 mg/ml) a 1 μ g/ml en leche/PBS al 5 % durante 1 h a 37 °C. Las monocapas de células se lavaron 3 veces durante 5 minutos con Tween20/PBS al 0,02 %. A cada pocillo se añadió un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H + L)-HRP (BioRad, ref # 170-6516) diluido a 1:1000 en leche/PBS al 5 % y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las monocapas celulares se lavaron como se describió previamente con Tween20/PBS al 0,02 % y después se enjuagaron dos veces con PBS. Los focos se revelaron al agregar solución TrueBlue (sustrato HRP) en cada pocillo e incubar la placa durante 1 h a 37 °C. La solución TrueBlue se descartó y la placa se enjuagó dos veces con agua y después se secó antes de escanear (Figura 2) y se contaron los focos. El valor de IC_{50} se consideró como la concentración de inhibidor que redujo el título de la progenie viral en un 50 % en comparación con una monocapa de LLC-MK2 infectada no tratada.

ELISA in situ: El ELISA *in situ* es una técnica útil para evaluar la inhibición del crecimiento viral. Mide, en un solo paso, el nivel de expresión de HN de hPIV-3 en la superficie celular de una monocapa celular infectada. El nivel de expresión se correlaciona directamente con la capacidad de un virus no inmovilizado para infectar y reinfectar células objetivo. La infección se realizó en una monocapa de células confluentes sembradas en una placa de 96 pocillos. El virus (40 FFU/pocillo) se incubó previamente durante 20 minutos con el compuesto **6** y **10** a una concentración final de 1000 μ M a 0,001 μ M como una serie de diluciones de 10 veces. La infección se realizó por triplicado y continuó durante 1 hora a 37 °C con agitación suave cada 15 minutos. Se eliminaron los inóculos y se reemplazaron con 200 μ l/pocillo de cada dilución del compuesto respectivo. Se incorporó un control positivo para la infección con el uso de condiciones experimentales idénticas, menos el inhibidor. Las monocapas de células infectadas se mantuvieron durante 36 - 40 h a 37 °C, 5 % de CO₂ para la proliferación viral. El virus se inactivó y las células se fijaron mediante la adición directa de 100 μ l de paraformaldehído/PBS al 11,1 %. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min y después se lavó 3 veces durante 5 min con PBS y las peroxidasas endógenas se inactivaron después mediante tratamiento con H₂O₂/PBS al 0,3 % durante 30 min a 37 °C. Las monocapas celulares se lavaron y se incubaron con IgG monoclonal de ratón anti-HN de hPIV-3 (Fitzgerald, clon # M02122321, 2,0 mg/ml) a 1 μ g/ml en leche/PBS al 5 % durante 1 hora a 37 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con Tween20/PBS al 0,02 %. A cada pocillo se añadió un conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H + L)-HRP (BioRad, ref # 170-6516), diluido a 1:2000 en leche/PBS al 5 % y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las monocapas celulares se lavaron con Tween20/PBS al 0,02 % y después se enjuagaron dos veces con PBS. Se añadió sustrato BD OptEIA/TMB (BD Biosciences, San José, CA, 100 μ l) a cada pocillo y después la placa se incubó a 37 °C. La reacción enzimática se detuvo después de 3 - 5 min mediante la adición de 50 μ l de 0,6 M de H₂SO₄ por pocillo. Los datos sin procesar se obtuvieron mediante la lectura de la absorbancia (OD) de cada pocillo a 450 nm durante 0,1 segundos con un lector de múltiples marcadores Victor 3 (PerkinElmer, Waltham, MA). Los OD finales se obtuvieron por sustracción de la OD del control negativo (células no infectadas) de la lectura inicial de OD y los datos se analizaron con GraphPadPrism4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) para calcular los valores de IC_{50} (regresión no

lineal (ajuste de la curva), inhibición de la dosis-respuesta, 4 parámetros logísticos). El valor de IC_{50} se consideró como la concentración de inhibidor que redujo la absorbancia a 450 nm en un 50 %, en comparación con una monocapa de células infectadas no tratadas.

5 Los compuestos de la presente invención pueden analizarse en un ensayo de inhibición de hPIV-3 en células epiteliales humanas de las vías respiratorias (HAE) bien diferenciadas mediante el uso de un modelo publicado. En resumen, el procedimiento de prueba es el siguiente: las células epiteliales de las vías respiratorias humanas (HAE) se aíslan, cultivan y diferencian como se describió anteriormente (Müller y otros, 2013). En resumen, las células epiteliales de las vías respiratorias nasales humanas se aíslan, expanden y siembran sobre soportes de membrana permeables recubiertos con colágeno. Una vez que las células están confluentes, se retira el medio apical y las células se mantienen en la interfaz aire-líquido durante aproximadamente 4 a 6 semanas para permitir la diferenciación epitelial. Los cultivos que contienen células ciliadas se inoculan a través de la superficie luminal con 5000 unidades formadoras de foco de hPIV-3 por pocillo durante 1 hora. Los compuestos de prueba de fórmula (I), (II), (III) y (IIIa) a diversas concentraciones se agregan al medio basolateral justo después de que las células se hayan infectado con el virus. La reducción de la carga viral se evalúa a los 1, 3 y 6 días después de la infección mediante titulación de virus mediante el uso de un ensayo de formación de foco o ELISA in situ en células A549 o LLC-MK2, como se publicó anteriormente (Guillon y otros, 2014). Estos resultados pueden compararse con un compuesto de referencia de la técnica anterior tal como un compuesto BCX que incluye BCX-2855 para dar una indicación de la potencia relativa (Guillon, P., Dirr, L., E-Deeb, I.M., Winger, M., Bailly, B., Haselhorst, T., Dyason, J.C. y von Itzstein, M. (2014). Structure-guided discovery of potent and dual-acting human parainfluenza virus haemagglutinin-neuraminidase inhibitors. *Nat. Commun.* 5.; y Müller, L., Brighton, L.E., Carson, J.L., Fischer, W.A. y Jaspers, I. (2013). Culturing of Human Nasal Epithelial Cells at Air Liquid Interface. *J. Vis. Exp.*)

Resultados

25 Se realizó una comparación de la potencia de los derivados de Neu5Ac2en modificados en C4 y sintetizados, contra HN de hPIV-3 y, por conveniencia, los valores de IC_{50} se dividieron en dos grupos sobre la base del grupo acilamino presente en C5. Los inhibidores del grupo 1 tienen una funcionalidad acetamido en C5 y los inhibidores del grupo 2 tienen una funcionalidad isobutiramido en C5 (Figura 3 y Figura 4A-C). El inhibidor de neuraminidasa Neu5Ac2en (**2**), de amplio espectro, de referencia, y bien caracterizado, mostró la inhibición más débil con valores de IC_{50} de 1565 μ M y 1438 μ M para NI e HI de HN de hPIV-3, respectivamente. La inhibición observada para **3**, el análogo acetamido en C5 de BCX 2798 (**6**), mejoró en comparación con **2**, aunque todavía estaba en el intervalo micromolar alto con valores de IC_{50} de 138 μ M y 210 μ M para NI y HI de HN de hPIV-3, respectivamente. Estos valores de IC_{50} fueron similares a los observados para nuestro novedoso inhibidor **7**, un derivado de Neu5Ac2en con triazol funcionalizado con metoximetilo en C4, con valores de IC_{50} de NI e HI de HN de hPIV-3 determinados experimentalmente de 154 μ M y 313 μ M, respectivamente. Se observó una mejora significativa en la potencia tras la sustitución del resto metoximetilo del triazol en C4 (**7**) con un grupo fenilo más voluminoso (**8**). Se determinaron valores de IC_{50} de 6,5 μ M y 4,6 μ M para NI e HI de HN de hPIV-3 para **8**, respectivamente. Los valores se resumen en la tabla 2.

40 En el segundo grupo de inhibidores, que contienen una funcionalidad isobutiramido en C5, era obvio que la afinidad de cada inhibidor mejoró en relación con su análogo acetamido en C5. El orden de potencia, no inesperadamente, era idéntico dentro de este grupo. Por lo tanto, se encontró que la inhibición más débil fue para **5**, el análogo isobutiramido en C5 de Neu5Ac2en, con valores de IC_{50} de 188 μ M y 358 μ M para NI e HI, respectivamente, y se determinaron valores de IC_{50} de 21,5 μ M y 16,1 μ M respectivamente para NI e HI para el inhibidor de hPIV de referencia BCX 2798 (**6**). El inhibidor **9**, con el sustituyente metoximetilo relativamente pequeño en el anillo de triazol, tenía valores de IC_{50} cercanos a los determinados para el análogo de azido en C4 **6** (IC_{50} = 14,2 μ M y 13,8 μ M para NI e HI respectivamente). De manera similar, como se observó en los inhibidores del Grupo 1 que contienen acetamido en C5, el aumento del tamaño desde el sustituyente del grupo metoximetilo en el inhibidor **9** a un resto fenilo más voluminoso como en el inhibidor **10**, dio como resultado una mejora notable en la potencia con valores de IC_{50} de 2,7 μ M y 1,5 μ M para NI e HI, respectivamente. Curiosamente, se observó una mejora en los valores de IC_{50} de HI cuando se usaron glóbulos rojos humanos en lugar de glóbulos rojos de cobayo (Figura 2). Es muy probable que esta mejora refleje el contenido de ácido siálico y/o las diferencias en la presentación de enlaces entre los glóbulos rojos humanos y los de cobayo. Por ejemplo, es bien sabido que los tejidos y las células humanas, incluidos los glóbulos rojos, solo expresan receptores de glicoconjugados que contienen ácido *N*-acetilneuramínico, mientras que otros animales también expresan receptores basados en ácido *N*-glicolilneuramínico. Sin embargo, independientemente de los glóbulos rojos específicos utilizados, nuestro inhibidor de diseño **10** tenía una potencia significativamente mayor en comparación con el compuesto de referencia **6**. Un valor de K_m para MUN de 5,1 μ M y valores de K_i de 1,3 μ M y 16 μ M para el inhibidor **10** y **6**, respectivamente.

Tabla 2: valores de IC_{50} para NI e HI. Valores medios de IC_{50} para cada uno de los compuestos analizados con cálculo de la desviación estándar y el error estándar.

5	Inhibidor	2		3		7		8	
		NI	HI	NI	HI	NI	HI	NI	HI
	IC₅₀ media	1565	1438	138,1	210	154,4	312,5	6,512	4,583
	Desviación std.	439,1	427	55,69	65,19	18,93	25	0,6305	0,7217
10	Error estándar	219,6	213,5	21,05	29,15	8,467	12,5	0,364	0,4167
		5		6		9		10	
		NI	HI	NI	HI	NI	HI	NI	HI
15		187,7	358,3	21,46	16,12	14,16	13,75	2,74	1,458
		39,52	52,04	4,753	4,891	2,028	4,787	0,2319	0,3608
		19,76	30,05	1,797	2,187	1,171	2,394	0,1339	0,2083

20 Ensayos basados en células

Después de la selección enzimática inicial, el inhibidor **10** más potente y el inhibidor de hPIV de referencia (BCX 2798, **6**) se evaluaron en un ensayo de inhibición del crecimiento para comparar su capacidad de inhibir la infección y propagación del virus hPIV-3 en células LLC-MK2 (FIG. 5A y B). El compuesto **6** se eligió como un inhibidor de referencia, ya que es el inhibidor de hPIV-3 basado en Neu5Ac2en más documentado hasta la fecha y tiene una potencia razonable contra el virus hPIV-3 *in vitro*. En un ensayo inicial, a una concentración de inhibidor de 2 µM, el virus se propagó durante 48 h en presencia de **6** o **10** y se determinaron los títulos de virus. A esta concentración de inhibidor, se calculó una reducción de 14 % y 94 % en el título del virus por **6** y **10** respectivamente (Figura 5B). Los valores de IC₅₀ para la inhibición del crecimiento viral se determinaron para los dos inhibidores en una técnica ELISA *in situ* bien establecida mediante el uso de tres líneas celulares diferentes. Se eligió la línea celular LLC-MK2 (células epiteliales de riñón de mono) ya que se usa ampliamente en estudios de infección de hPIV-3 basados en células, así como las líneas de células respiratorias humanas A549 susceptibles a hPIV-3 (células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón) y células primarias epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) para investigar la inhibición del crecimiento viral en células naturales relacionadas con los tejidos. El método en sí tiene ventajas útiles sobre el método de titulación de virus, ya que es una técnica no subjetiva más rápida, de un solo paso que correlaciona el crecimiento de virus no inmovilizado con los niveles de expresión de HN de una monocapa de células infectadas con baja multiplicidad de infección (MOI). Curiosamente, se determinaron valores de IC₅₀ ligeramente menores en cuanto a la inhibición del crecimiento viral para **10** y **6** con la línea celular LLC-MK2 establecida en el laboratorio en relación con las líneas celulares humanas. En general, se observa la misma tendencia para las tres líneas celulares con relación a que se determina un efecto antiviral significativamente más fuerte del inhibidor **10** (IC₅₀ = 2,1 -13,9 µM) en comparación con el inhibidor **6** (IC₅₀ = 54,6 - 130,6 µM) (figura 6).

Biología estructural

45 *Preparación de muestras y experimentos de RMN ¹H*: Todos los experimentos de RMN se realizaron en un espectrómetro de RMN 600 MHz (Bruker) equipado con una sonda TXI 5 mm con gradientes de triple eje. Una suspensión de virus intacto o HN de hPIV-3 recombinante se sometieron a intercambio de tampón contra acetato de sodio deuterado 50 mM, CaCl₂ 5 mM en D₂O en pD 4,6 mediante ultrafiltración con el uso de una unidad de filtro Amicon (*Millipore*) con un valor de corte de 30 kDa o 10 kDa, respectivamente. Para cada experimento se usó una proteína HN de hPIV-3 20 µM y una relación molar proteína:ligando de 1:100 en un volumen final de 200 µl.

50 Los espectros de RMN ¹H se adquirieron con 32 exploraciones a 283 K, un retraso de relajación de 2 s en un ancho espectral de 6000 Hz. Debido al manejo más seguro y fácil de la proteína en comparación con el virus y para proporcionar exactamente la misma concentración de proteína en cada experimento, el experimento de RMN STD inicial se llevó a cabo para el compuesto **10** en complejo con el virus hPIV-3 intacto, mientras que todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con el uso de la proteína HN recombinante.

55 *Experimentos de RMN de diferencia de transferencia de saturación (STD)*: la proteína se saturó en resonancia a -1,0 ppm y fuera de resonancia a 300 ppm con una cascada de 60 pulsos selectivos en forma de Gauss de 50 ms de duración, lo que resultó en un tiempo de saturación total de 3 s y el retraso de relajación se estableció en 4 s. Cada experimento de RMN STD se adquirió con un total de 1056 exploraciones (HN de hPIV-3 recombinante) o 1512 exploraciones (virus intacto) y se usó una secuencia WATERGATE para suprimir la señal residual de HDO. Se aplicó un filtro Spin-lock con una fuerza de 5 kHz y una duración de 10 ms para suprimir el fondo de proteína. Los experimentos de RMN STD de control se realizaron con una configuración experimental idéntica y la misma concentración de ligando pero en ausencia de proteína. Los espectros en resonancia y fuera de resonancia se almacenaron y procesaron por separado, y los espectros de RMN STD finales se obtuvieron restando los espectros en resonancia de los espectros fuera de resonancia. Todos los efectos de STD se cuantificaron mediante el uso de la ecuación $A_{STD} = (I_0 - I_{sat})/I_0 = I_{STD}/I_0$. Por lo tanto, las

intensidades de la señal del espectro de RMN STD (I_{STD}) se compararon con las intensidades de señal correspondientes de un espectro de referencia (I_0). La señal de STD más fuerte en el espectro se asignó a un valor del 100 % y se usó como referencia para calcular los efectos de STD relativos en consecuencia.

5 Los experimentos de RMN de diferencia de transferencia de saturación (STD) de **8** en complejo con HN de hPIV-3 expresada recombinantemente (Figura 7) y el inhibidor más potente **10** en complejo con HN de hPIV-3 expresada recombinantemente (Figura 8) o virus hPIV-3 intacto (Figura 9) se llevaron a cabo para apoyar aún más los estudios computacionales y biológicos que demostraron la unión específica y la inhibición.

10 Las intensidades de señal de RMN STD para todos los protones asociados con **8** o **10** se observaron claramente, en diferentes grados, cuando el inhibidor está en complejo con virus intacto o HN de hPIV-3 recombinante y demostró claramente que el ligando se une en ambos casos. Las señales menores visibles a 3,25, 3,5 y 4,0 ppm en el espectro de RMN ^1H de **10** adquiridas en presencia de partículas virales intactas fueron consecuencia de impurezas del proceso de purificación del virus y no pertenecen ni a las partículas virales ni a **10**. Como se anticipó, ninguna de estas señales se observó en el espectro de RMN STD y demuestra claramente que las impurezas no se unen al virus (Figura 9). Estos experimentos demuestran claramente la unión específica de **10** al virus hPIV-3 intacto y a la HN de hPIV-3, lo que confirma aún más la relevancia biológica y el potencial del inhibidor.

20 Es importante destacar que una superposición de las señales de los protones de fenilo aromáticos observados a 7,1-7,6 ppm en los espectros de RMN STD tanto para el virus intacto como para la proteína HN recombinante también revela que el epítipo de unión del inhibidor **10** es similar, si no idéntico, cuando se une al virus hPIV-3 intacto o a la proteína HN de hPIV-3 recombinante (Figura 10).

Mapeo de epítipos del inhibidor 10

25 Se determinó un epítipo completo de unión a ligando mediante el análisis de los espectros de RMN STD (Figura 8) de la proteína HN de hPIV-3 en complejo con **10**. Todas las señales de RMN STD de **10** se normalizaron con respecto a la señal de RMN STD más fuerte observada, el protón de H4' del inhibidor a 7,18 ppm. Después se calcularon los efectos relativos de RMN STD para todos los protones del inhibidor (Tabla 2). El grado de intensidad de la señal de RMN STD depende en gran medida de la proximidad del protón a la superficie de la proteína y revela cómo el inhibidor diseñado **10** se acopla al sitio de unión de la proteína HN.

35 Tabla 3: Efectos relativos de RMN de STD^a de 8 y 10 en complejo con HN de hPIV-3. ^aEfectos de STD calculados de acuerdo con la fórmula $A_{STD} = (I_0 - I_{sat}) / I_0 - I_{STD} / I_0$. Todos los efectos de RMN STD se dan en relación con la mayor intensidad de RMN STD del triazol ArH4' en C4.

	Inhibidor 8 (%)	Inhibidor 10 (%)	
40	Triazol CH	63	75
	ArH2' ArH6'	92	95
	ArH3' ArH5'	100	100
	ArH4'	100	100
45	H3	85	80
	H4	59	59
	H5	50	49
	H6	49	47
50	H7	30	36
	H8	30	35
	H9	12	24
	H9'	18	21
55	Isoprop-CH	-	54
	Isoprop-2CH ₃	-	42
	NHAc	41	-

60 En particular, se observaron efectos de RMN STD relativos muy fuertes para los protones del grupo fenilo H2', H3', H4', H5' y H6' entre 7,1 ppm y 7,6 ppm que revelan un contacto cercano en esa región de la molécula con la superficie de la proteína. Además, también se detectó un efecto significativo de RMN STD para el CH del resto triazol. En contraste, los protones del resto isobutiramido en C5 del inhibidor mostraron menos efecto (intensidades de señal de RMN STD relativas en el intervalo de 42-54 %).

65 Los protones asociados con la estructura del núcleo de Neu5Ac2en de 10 muestran efectos de RMN STD relativos variables. Una intensidad significativa de la señal de RMN STD relativa para H3 (80 %) sugiere una fuerte interacción de

esta parte de la molécula con HN de hPIV-3. Además, las intensidades de señal de RMN STD relativas para H4, H5 y H6 del 59 %, 50 % y 49 %, respectivamente, demuestran que los protones del anillo de la estructura del núcleo Neu5Ac2en también están involucrados en el acoplamiento del inhibidor con la proteína.

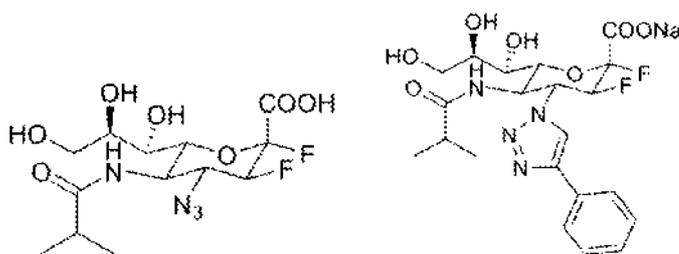
5 Finalmente, se observaron efectos de RMN STD relativos más débiles de 36 %, 35 %, 24 % y 21 % para los protones de la cadena lateral de glicerol H7, H8, H9 y H9', respectivamente, y sugieren que la cadena lateral de glicerol contribuye menos al evento de unión del inhibidor en comparación con la funcionalidad del triazol en C4 y la estructura del anillo central del inhibidor (figura 8). El mapa de epítopos del inhibidor 8 (Figura 7) fue para todos los intentos y propósitos idénticos al del inhibidor 10, con el resto triazol en C4 claramente en contacto cercano con la superficie de la proteína.

10

Análogos difluoro (referencia)

15 Los compuestos de la descripción pueden incluir compuestos difluorados y se han realizado pruebas en miembros seleccionados de esta clase (I-170, I-179 e I-104 que se muestran a continuación). El objetivo de tales compuestos es la hemaglutinina-neuraminidasa de hPIV-3 y hPIV-1. Se ha obtenido una estructura cocrystalina de HN de hPIV-3 en complejo con I-170. Todos los compuestos a continuación se han analizado en (i) los ensayos enzimáticos de NI contra hPIV-3 (y también I70 contra hPIV-1); (ii) los ensayos basados en células con las células de la línea celular humana A549 (células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas) que se han evaluado con hPIV-3; (iii) las pruebas de citotoxicidad celular de los compuestos contra células A549; y (iv) los ensayos enzimáticos de NI contra la Neuraminidasa 2 humana no mostraron actividad. No se observó citotoxicidad celular para ninguno de los compuestos a 150 μM con el uso de células A549 como se muestra en la Figura 11. No se observó actividad contra Neu2 humano como se indica en la Figura 12.

25

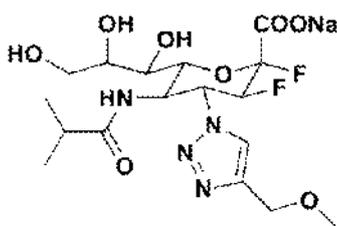


30

I-170

I-179

35



40

I-104

45

50 Tabla 4: Ensayos enzimáticos y basados en células para seleccionar compuestos difluorados con I-57 e I-40 como los compuestos 'en' no fluorados correspondientes para comparación.

μM	6	I-70	I-57	I-79	I-40	I-104
IC ₅₀ de NI con hPIV-3	18	6	2,5	63	12	4
IC ₅₀ por ELISA basado en células	130	14	10	45	80	25

55

60

Ensayo de actividad sialidasa del virus de la gripe

65

En un formato de placa estándar de 96 pocillos, con el uso de sialidasa del virus de la Gripe A y B, los compuestos sintetizados pueden analizarse para determinar su capacidad para inhibir la sialidasa del virus de la gripe mediante una modificación (Biochim. Biophys. Acta 1991, 10,65 - 71) del método fluorométrico de Potier y otros (Anal. Bio-chem. 1979, 94, 287 - 296) con el uso del sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil *M*-acetil- α -D-neuraminida (MUN). Todos los ensayos

de inhibición se pueden hacer por triplicado en más de seis concentraciones del inhibidor y con MUN 0,1 mM. Específicamente, se agregan 7 µl de tampón de acetato de sodio 50 µM-CaCl₂ 6 mM (pH 5,5) a cada pocillo de una placa negra sólida de 96 pocillos en hielo, seguido de 1 µl de inhibidor, 1 µl de sialidasa y finalmente 1 µl del sustrato MUN. Después, la placa se centrifuga brevemente hasta 1000 rpm durante aproximadamente 10 s para combinar todos los componentes, y la mezcla se puede incubar a 37 °C con agitación a 900 rpm durante 20 min. Para detener la reacción, se pueden agregar 250 µl de glicina 0,25 M, pH 10, a cada pocillo, y se puede leer la fluorescencia (1 s por pocillo) a una excitación de 355 nm y emisión de 460 nm con un lector de múltiples marcadores Victor 3 (PerkinElmer, Waltham, MA). Los datos pueden procesarse por sustracción del fondo (RF del control negativo) y después analizarse con GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) para calcular los valores de IC₅₀ (regresión no lineal (ajuste de la curva), inhibición de la respuesta a la dosis, 3 parámetros logísticos).

ELISA celular *in situ* para el virus de la gripe A y B

Para evaluar la inhibición del crecimiento viral del virus A de la gripe y el virus B de la gripe para los compuestos sintetizados, las células MDCK se infectarán con el virus A o el virus B de la gripe en un ELISA celular *in situ* desarrollado en base a los principios descritos por Berkowitz y Levin, 1985 (Antimicrob. Agents Chemother, 28, 207-210) y adaptado a IAV por Myc y otros, 1999 (J. Virol. Methods 77, 165-177 (1999)). Las células MDCK en 100 µl de Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con glutamina 2 mM y FBS al 10 % se siembran en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos y se incuban durante la noche. Al día siguiente, se retira el medio de cultivo y las células se lavan con medio. Se añaden un total de 50 ml de inóculo viral (40 FFU/pocillo) a los pocillos y se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 1 hora con agitación suave cada 15 minutos. Después se extrae el inóculo viral y se reemplaza con 100 ml de medio de infección (EMEM suplementado con glutamina 2 mM y 3,0 mg/ml de tripsina tratada con TPCK). Las células MDCK infectadas se incuban durante 12-20 h adicionales, según sea necesario, y se aspira el medio. Las células se pueden fijar con paraformaldehído al 3,7 % en PBS. El día del ensayo, las células fijadas se lavan y las peroxidasas endógenas se inactivan con H₂O₂/PBS al 0,35 % durante 30 minutos a 37 °C. Los pocillos se lavan nuevamente y se incuban con 50 µl de 1,5 mg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón anti-hemaglutinina del virus A de la gripe o anti-hemaglutinina del virus B de la gripe y se incuban durante 45 minutos a 37 °C. Las células se lavan cuatro veces con tampón de lavado (PBS y Tween-20 al 0,02 %), y se incuban con 50 ml de dilución 1:2000 de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (H + L) conjugado con HRP (BioRad, ref. 170-6516) durante 45 minutos a 37 °C. Las placas se lavan como se indicó anteriormente con tampón de lavado y se añaden 100 µl de sustrato BD OptEIA/TMB (BD Biosciences, San José, CA) a cada pocillo, después la placa se puede incubar a 37 °C.

La reacción enzimática se puede detener después de 3-5 minutos mediante la adición de 50 µl de 1 M de H₂SO₄ por pocillo. Los datos sin procesar se obtienen mediante la lectura de la absorbancia (OD) de cada pocillo a 450 nm durante 0,1 segundo con un lector de múltiples marcadores Victor 3 (PerkinElmer, Waltham, MA). Las OD finales se obtienen por sustracción de la OD del control negativo (células no infectadas) de la lectura inicial de OD y los datos se analizan con GraphPadPrism4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) para calcular los valores de IC₅₀ (regresión no lineal (ajuste de la curva), inhibición de la respuesta a la dosis, 4 parámetros logísticos). El valor de IC₅₀ se considera como la concentración de inhibidor que redujo la absorbancia a 450 nm en un 50 %, en comparación con una monocapa de células infectadas no tratadas.

El ELISA basado en células *in situ* se puede realizar como para hPIV-3 con modificaciones menores que incluyen diferencias entre las pruebas de hPIV-1 y 3, tales como: Anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal de ratón anti-HN de hPIV-3 (Fitzgerald, clon M02122321); anticuerpo monoclonal de ratón anti-HN de hPIV-1 (LSbio, ref LS-C74109); Medios de infección de hPIV-3: EMEM + glutamina 2 mM; Medios de infección de hPIV-1: EMEM + glutamina 2 mM + TrypLE select 1,2 %.

Valores de IC₅₀ de NI de hPIV-3 y NI de hPIV-1 para los compuestos de la invención

Los valores de IC₅₀ para varios compuestos del primer aspecto se determinaron mediante métodos de ensayo estándar descritos previamente en Guillon, P y otros, Nature Communications (2014). En las tablas siguientes se muestran los valores de IC₅₀ para los compuestos preparados en donde la identificación química se alinea con las referencias y las estructuras de compuestos proporcionadas en la sección de caracterización experimental.

Tabla 5 - Valores de IC₅₀ de hPIV-3 y hPIV-1 para los compuestos analizados

NI de hPIV-3 (valores de IC50)	
<i>ID química</i>	<i>IC50 (μM)</i>
IE1172-78	2,47
IE1172-82	3,95
IE1172-83	5,61
IE1172-87	77,35
IE1172-45	315
IE1172-102	> 1000
IE1257-84	2,19
IE1398-33	1,97
IE832-8	54,43
IE832-12	51,85
IE832-17	148,5
IE832-20	6,28
IE832-26	67,67
IE832-27	106,1
IE832-31	22,92
IE832-37	2,4
IE889-34	3,23
IE889-52	5,85
NI de hPIV-3 (valores de IC50)	
<i>ID química</i>	<i>IC50 (μM)</i>
IE927-60	13,13
IE927-67	114,3
IE984-5	1,38
IE1257-24	8,49
IE889-80	2,68
IE889-99	0,599
IE927-99	0,268
IE832-98	27,38
IE889-42	5,11
NI de hPIV-1 (valores de IC50)	
<i>ID química</i>	<i>IC50 (μM)</i>
IE1172-78	75,15
IE1172-82	57,18
IE1172-83	73,62
IE1172-87	92,79
IE1172-45	> 1000
IE1172-102	793,4
IE1257-84	24,88

NI de hPIV-1 (valores de IC50)	
IE1398-33	sin datos
IE832-8	300,6
IE832-12	215,3
IE832-17	19,82
IE832-20	192,7
IE832-26	95,49
IE832-27	301,9
IE832-31	303,5
IE832-37	200,6
IE889-34	30,3
IE889-52	168,5
IE927-60	0,489
IE927-67	47,74
IE984-5	21,88
IE1257-24	0,36
IE889-80	16,9
IE889-99	6,22
IE927-99	3,09
IE832-98	7,44
NI de hPIV-1 (valores de IC50)	
<i>ID química</i>	<i>IC50 (µM)</i>
IE889-42	0,159

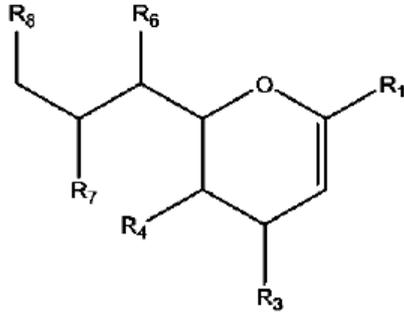
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable de este:

5

10

15



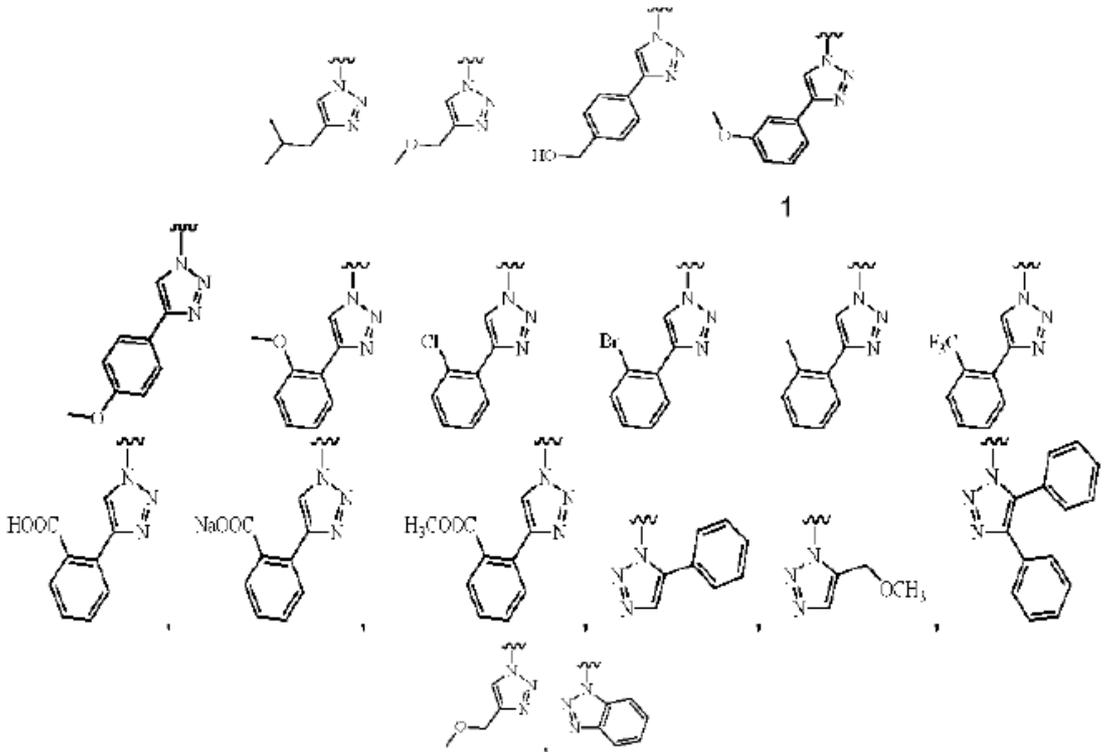
Fórmula (I)

20

en donde,

R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, o una sal de este, C(O)NR₉R₁₀, C(O)OR₁₁ en donde R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; R₃ se selecciona del grupo que consiste en tetrazol unido a N opcionalmente sustituido, indol unido a N opcionalmente sustituido, isoindol unido a N opcionalmente sustituido, benzotriazol unido a N opcionalmente sustituido y triazol unido a N seleccionado del grupo que consiste en:

25

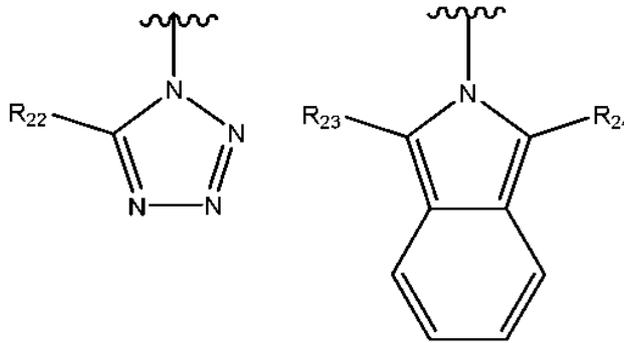


y R₄ es NHC(O)R₁₇ en donde R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₃-C₆;

R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, NH₂, alquilo C₁-C₆, NR₁₈R_{18'}, alcoxi C₁-C₆, -OC(O)R₁₈, -NH(C=O)R₁₈ y S(O)_nR₁₈, en donde n = 0 - 2 y cada R₁₈ y R_{18'} son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido; en donde "opcionalmente sustituido" significa la sustitución opcional con uno o más grupos seleccionados de alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, CN, OH, oxo, NH₂, Cl, F, Br, I, arilo y heterociclilo, estos dos últimos pueden estar opcionalmente sustituidos.

2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 en donde R₁ es COOH, o una sal de este o C(O)OR₁₁ en donde R₁₁ se selecciona de metilo, etilo y propilo.

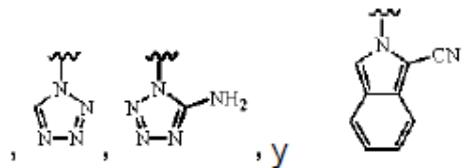
3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde R₃ se selecciona del grupo que consiste en:



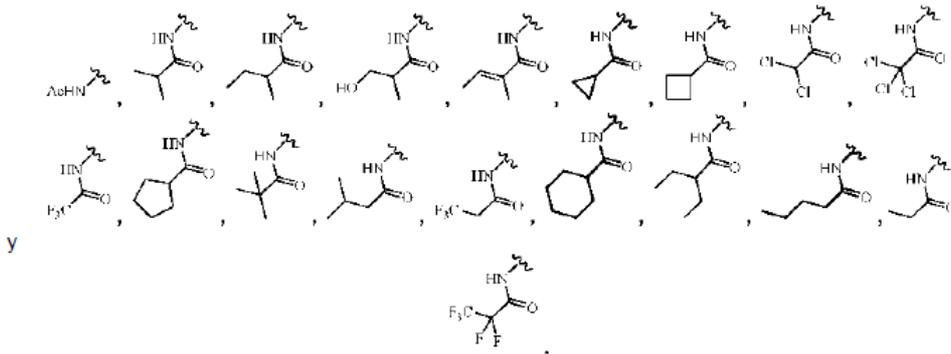
en donde, R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y fenilo opcionalmente sustituido; y R₂₃ y R₂₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, ciano, halo, alquilo C₁-C₆ y haloalquilo C₁-C₆.

4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3 en donde cuando R₂₂ es fenilo opcionalmente sustituido entonces la sustitución es con un resto seleccionado del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, alquilhidroxilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, halo, - C(O)OMe y -CH₂OCH₃.

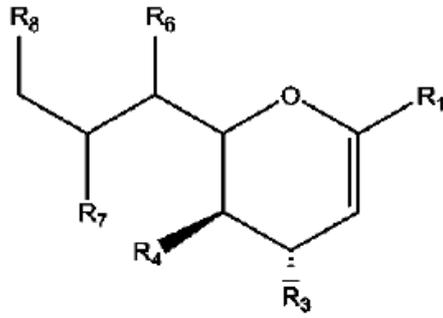
5. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde R₃ se selecciona del grupo que consiste en:



6. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde R₄ se selecciona del grupo que consiste en:



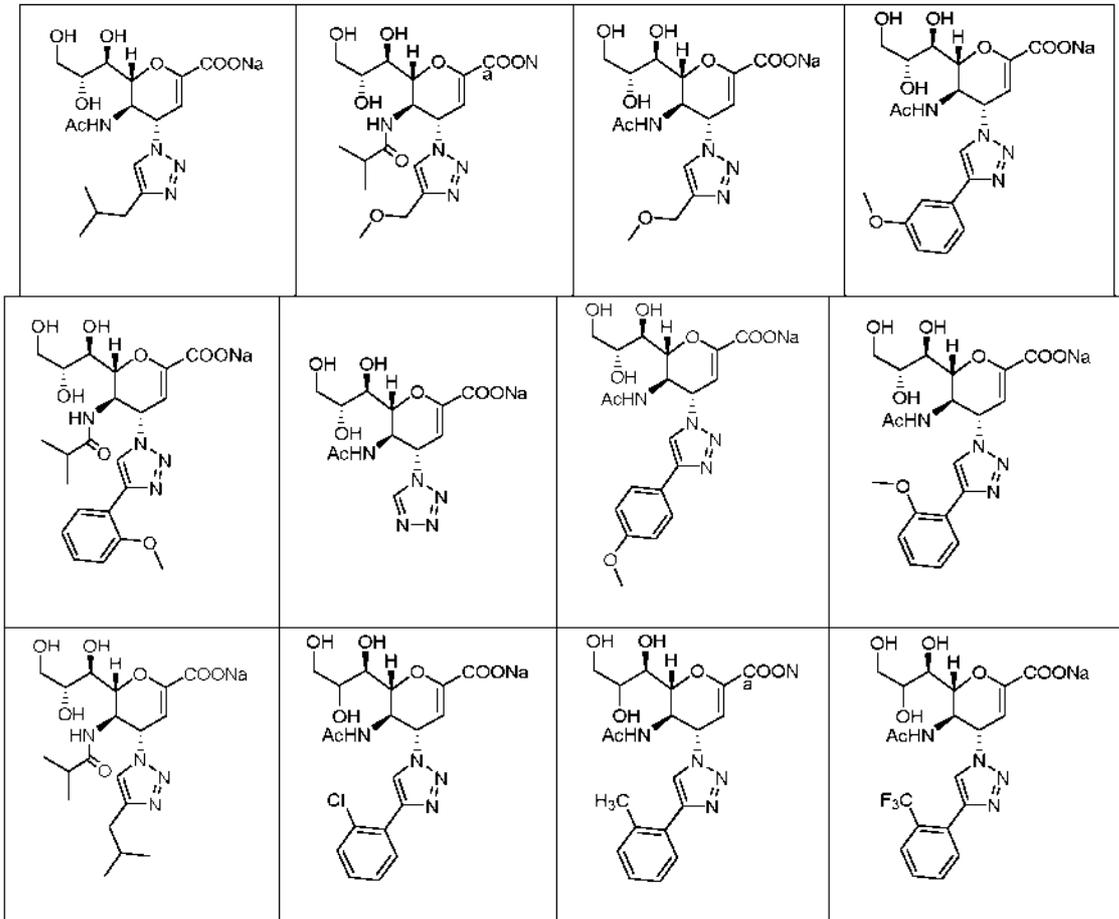
7. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde R_6 , R_7 y R_8 se seleccionan independientemente de OH y OAc.
8. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II):



Fórmula (II)

en donde, R_1 , R_3 , R_4 , R_6 , R_7 y R_8 son como se describen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

9. El compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el compuesto de fórmula (I) o fórmula (II) es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



5

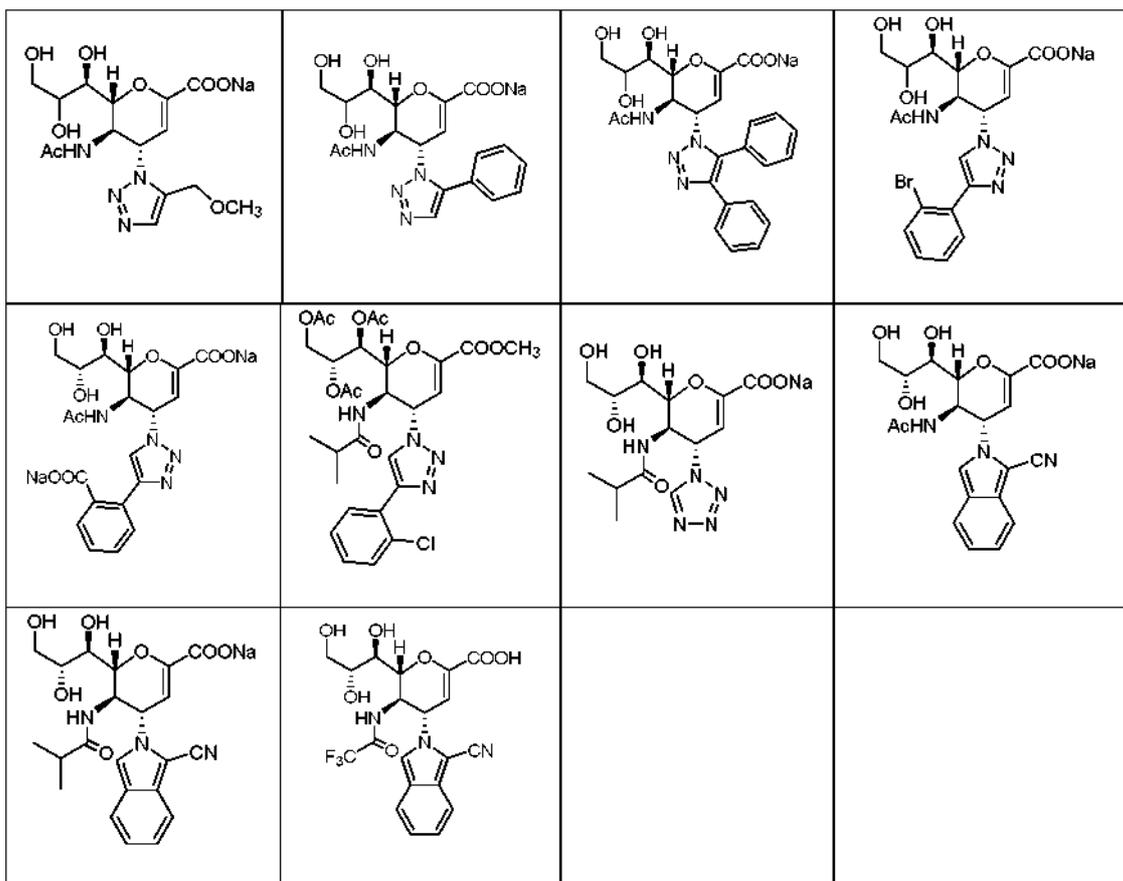
10

15

20

25

30



35

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente en donde la composición farmacéutica es para usar en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal.

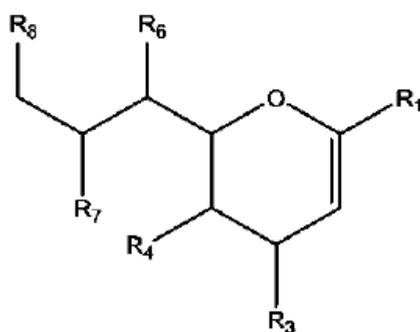
40

11. Un compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente eficaz de este, para usar en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad, trastorno o afección causada por una infección por virus paragripal en un paciente:

45

50

55



Fórmula (I)

60

en donde,

60

R₁ se selecciona del grupo que consiste en COOH, o una sal de este, C(O)NR₉R₁₀, C(O)OR₁₁ en donde R₉, R₁₀ y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido;

65

R₃ se selecciona del grupo que consiste en triazol unido a N sustituido en uno o ambos átomos de carbono del anillo, tetrazol unido a N opcionalmente sustituido, indol unido a N opcionalmente sustituido y benzotriazol unido a N opcionalmente sustituido;

65

R₄ es NHC(O)R₁₇ en donde R₁₇ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆ y

cicloalquilo C₃-C₆;

R₆, R₇ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en OH, NH₂, alquilo C₁-C₆, NR₁₈R_{18'}, alcoxi C₁-C₆, -OC(O)R₁₈, -NH(C=O)R₁₈ y S(O)_nR₁₈, en donde n = 0 - 2 y cada R₁₈ y R_{18'} son independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido.

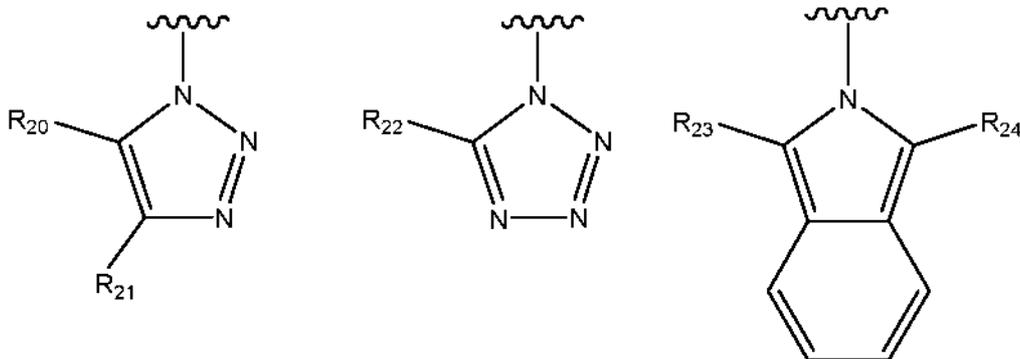
5

12. El compuesto, o la sal farmacéuticamente eficaz de este, para usar de acuerdo con la reivindicación 11 en donde R₃ se selecciona del grupo que consiste en:

10

15

20



25

en donde, R₂₀ y R₂₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, ciano, halo, alquilo C₁-C₆, haloalquilo C₁-C₆, éter de alquilo C₁-C₆, piridilo opcionalmente sustituido y fenilo opcionalmente sustituido, y en donde al menos uno de R₂₀ y R₂₁ no es hidrógeno;

R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆ y fenilo opcionalmente sustituido; y

R₂₃ y R₂₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, ciano, halo, alquilo C₁-C₆ y haloalquilo C₁-C₆.

30

13. El compuesto o la sal farmacéuticamente eficaz de este para usar de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 en donde la enfermedad, trastorno o afección es una infección causada por un virus paragripal seleccionado del grupo que consiste en el virus hPIV-1, 2 y 3.

35

14. El compuesto o la sal farmacéuticamente eficaz de este para usar de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 13 en donde el paciente es un animal doméstico o de ganado o un ser humano.

40

15. Un método in vitro para modular la actividad de una enzima hemaglutinina y/o neuraminidasa de un virus paragripal que incluye la etapa de poner en contacto la enzima con un compuesto de fórmula (I), como se define en la reivindicación 11 o la reivindicación 12, o una sal farmacéuticamente eficaz de este.

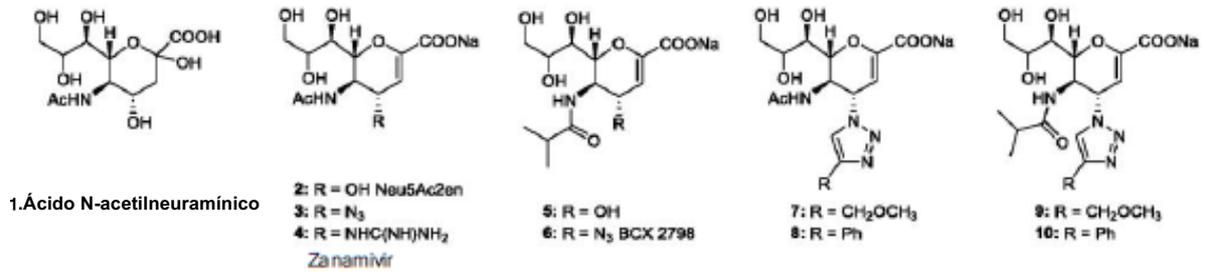


FIGURA 1

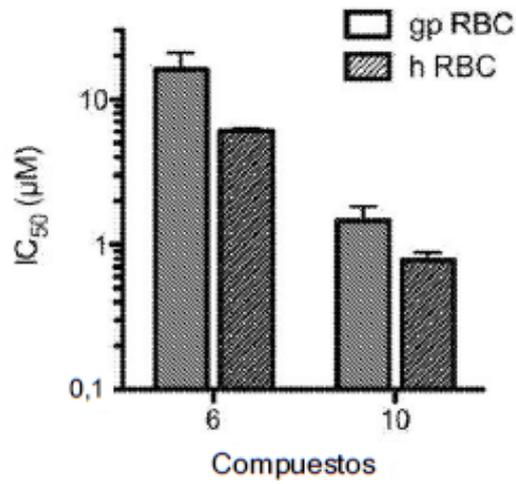


FIGURA 2

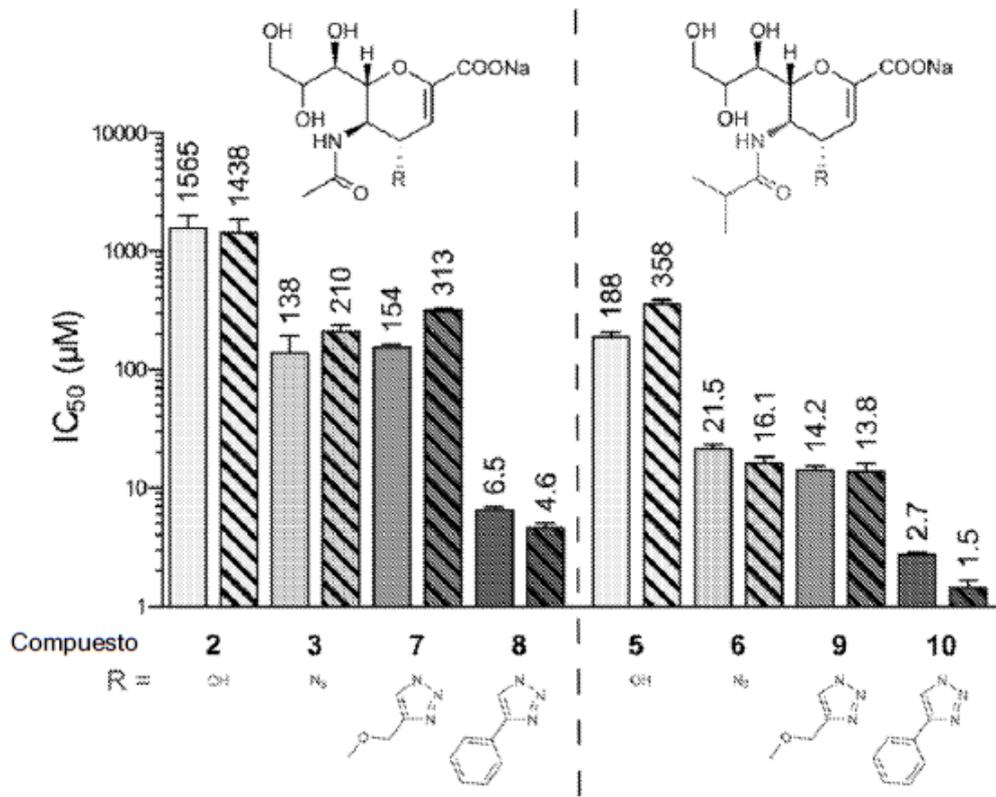


FIGURA 3

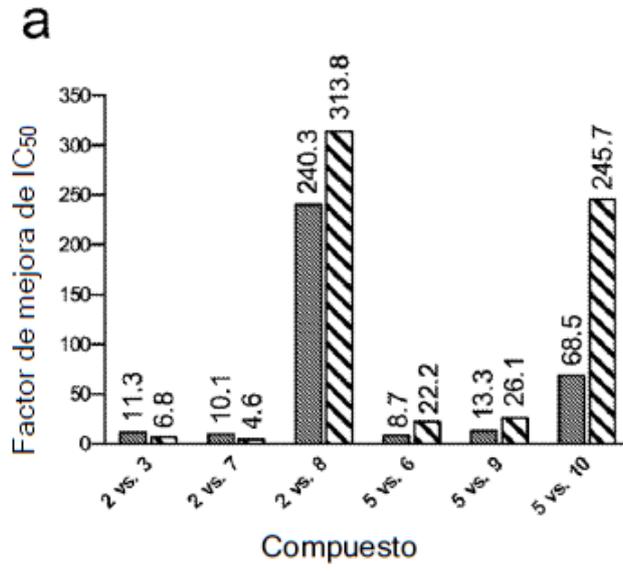


FIGURA 4A

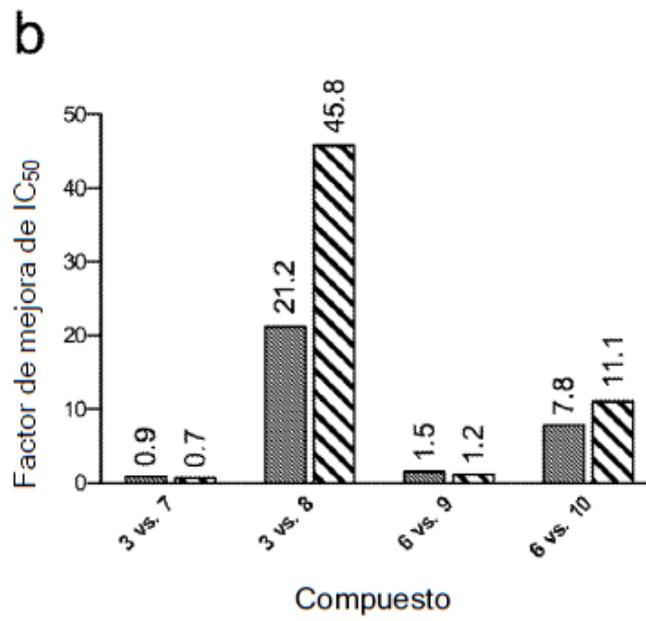


FIGURA 4B

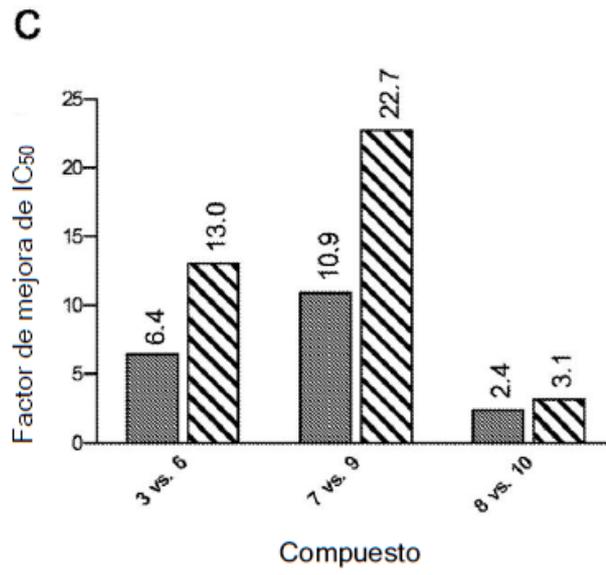


FIGURA 4C

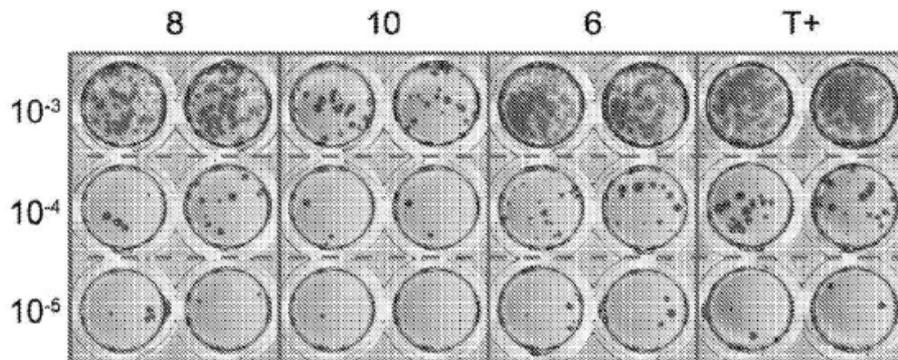


FIGURA 5A

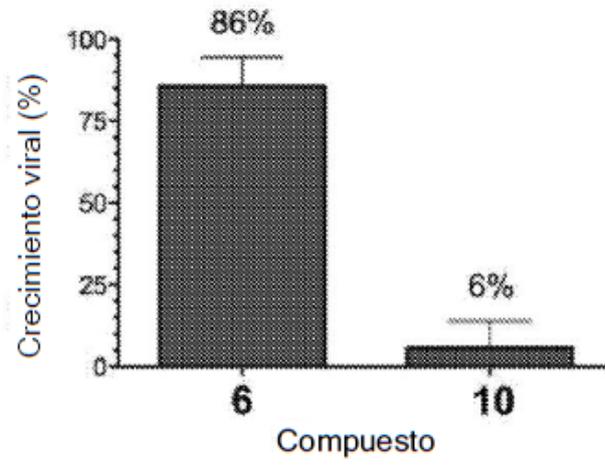


FIGURA 5B

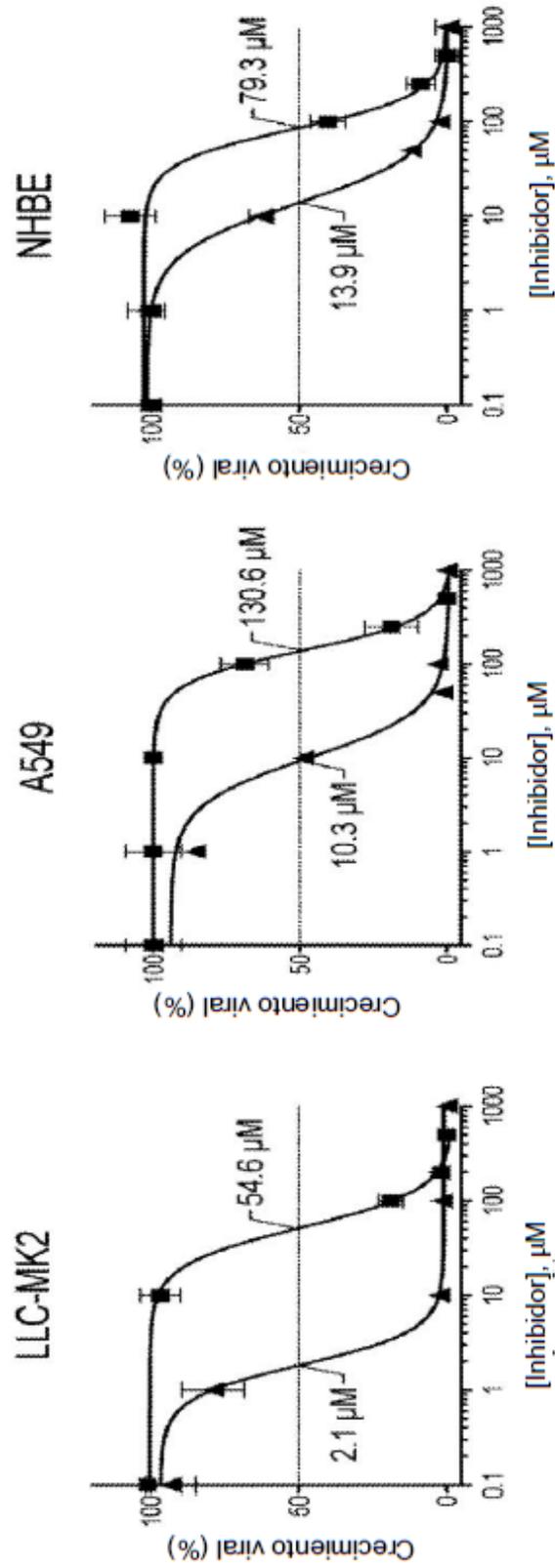


FIGURA 6

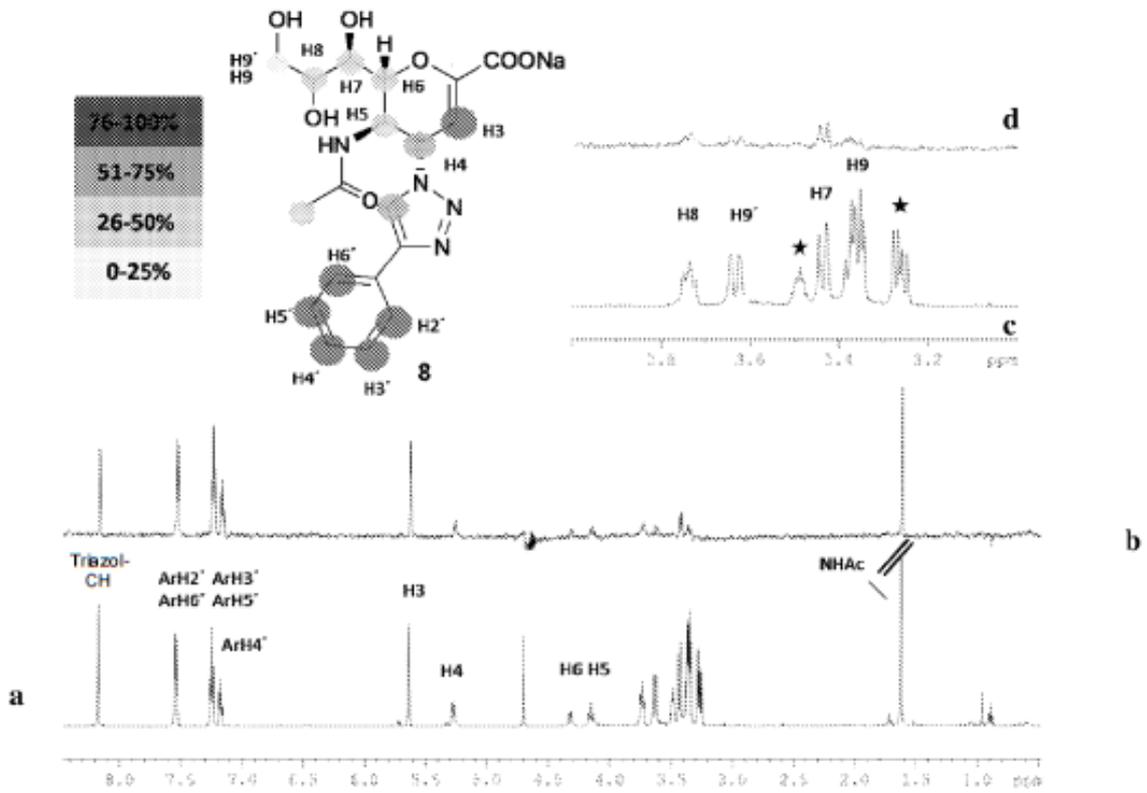


FIGURA 7

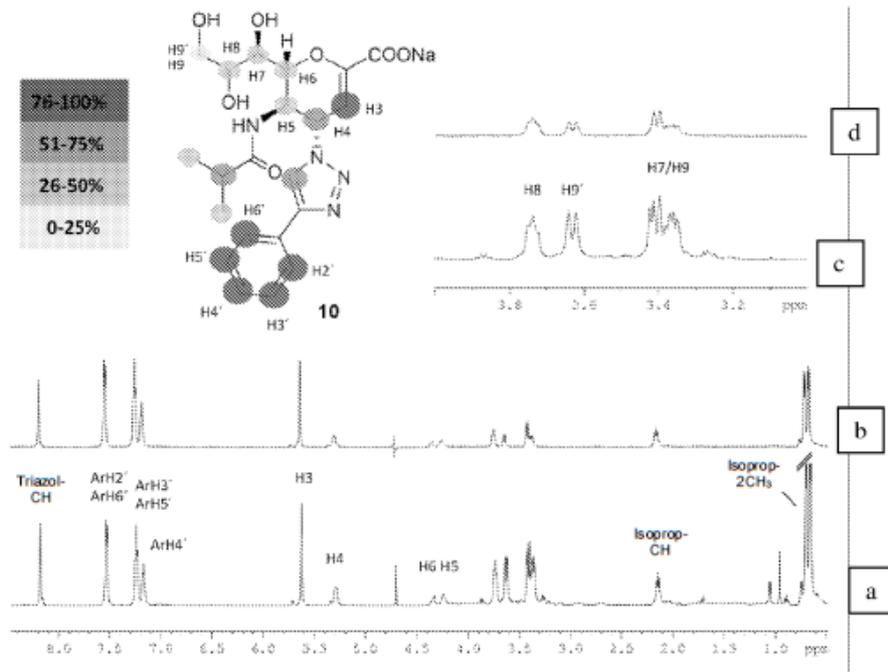


FIGURA 8

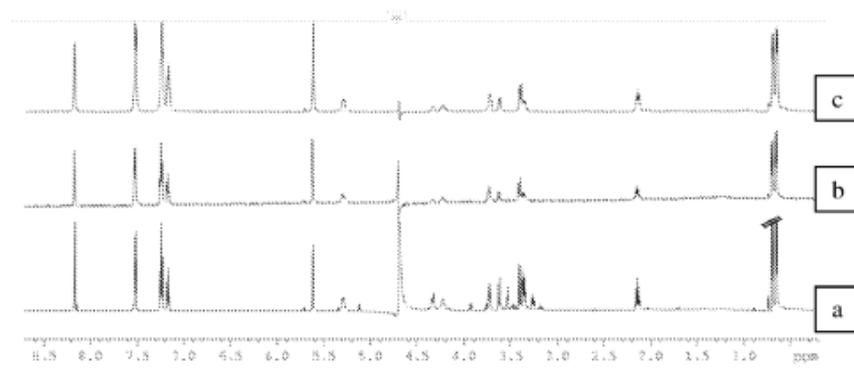


FIGURA 9

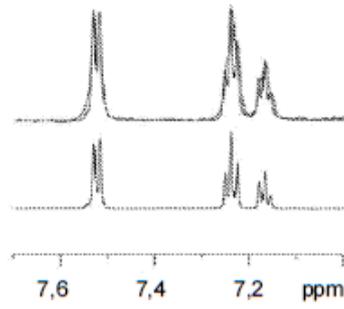


FIGURA 10

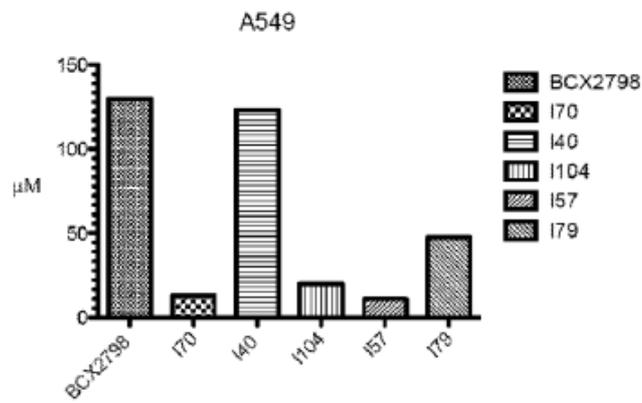


FIGURA 11

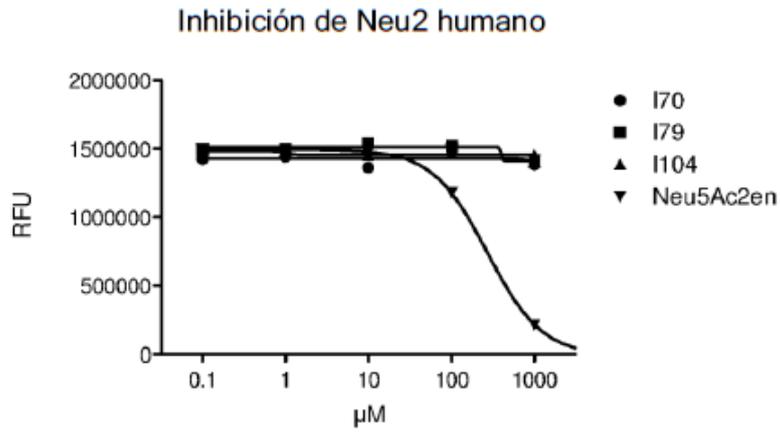


FIGURA 12