



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO
DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS**

DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**OBTENCIÓN ESTEREOSELECTIVA DE
HETEROCICLOS ESPIRÁNICOS,
SELENODERIVADOS ESTEROIDALES Y
GLICOCLUSTERS MULTIVALENTES DE
INTERÉS BIOLÓGICO**

**Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Químicas en el Área de Química Orgánica**

Presenta

M.C. Laura Leticia Romero Hernández

Directoras de tesis

Dra. Sara Montiel Smith

Dra. Penélope Merino Montiel

Agosto 2018



BUAP



NUI Galway
OÉ Gaillimh

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección de las Dras. Sara Montiel Smith y Penélope Merino Montiel, con el apoyo otorgado por el CONACYT a través de la beca nacional con número (CVU/Becario) 444340/268274 y del proyecto de ciencia básica 240329. El capítulo de derivados sacarídicos se llevó a cabo en la National University of Ireland, Galway (Irlanda), en el departamento de Química bioactiva y medicinal bajo la dirección del Profesor Paul V. Murphy, con el apoyo del CONACYT a través de la beca mixta 2015-MZO2016 Movilidad en el extranjero (290936) y de la VIEP-BUAP.

Parte de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se han publicado en:

- Fuentes-Aguilar, A.; **Romero-Hernández, L. L.**; Arenas-González, A.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. New selenosteroids as antiproliferative agents. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5041–5054.
- **Romero-Hernández, L. L.**; Merino-Montiel, P.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; López, Ó.; Padrón, J. M.; Montiel-Smith, S. Synthesis of unprecedented steroidal spiro heterocycles as potential antiproliferative drugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 21–32.
- Kaltner, H.; Manning, J. C.; García Caballero, G.; Di Salvo, C.; Gabba, A.; **Romero-Hernández, L. L.**; Knospe, C.; Wu, D.; Daly, H. C.; O’Shea, D. F.; Gabius, H.-J.; Murphy, P. V. Revealing biomedically relevant cell and lectin type-dependent structure-activity profiles for glycoclusters by using tissue sections as assay platform. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 28716–28735.



New selenosteroids as antiproliferative agents†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2017, **15**, 5041

Alma Fuentes-Aguilar,^{‡a} Laura L. Romero-Hernández,^{‡a} Ailed Arenas-González,^{‡a} Penélope Merino-Montiel,^{*a} Sara Montiel-Smith,^a Socorro Meza-Reyes,^a José Luis Vega-Báez,^a Gabriela B. Plata,^b José M. Padrón,^b Óscar López^{id} ^{*c} and José G. Fernández-Bolaños^{id} ^c

Received 23rd February 2017,
Accepted 22nd May 2017

DOI: 10.1039/c7ob00458c

rsc.li/obc

Starting from natural steroids (diosgenin, hecogenin, smilagenin, estrone), we have prepared a wide panel of selenoderivatives, including benzoselenazolones, selenosemicarbazones, isoselenocyanates, selenoureas, selenocyanates and diselenides, with the aim of developing new families of potential chemotherapeutic agents. The modification of the organoselenium moieties, and their position on the steroid provided valuable information concerning the antiproliferative activities. Among all the families accessed herein, the best profile was achieved for selenoureas on the A ring of estrone, which exhibited GI₅₀ values in the range 2.0–4.1 μM for all the tested tumor cell lines, with increased potency compared with commonly used chemotherapeutic agents, like 5-fluorouracil and cisplatin. Cell cycle analysis revealed that selenoureas induced accumulation of cells in the G₁ phase of the cell cycle in the breast cancer cell lines HBL-100 and T-47D; therefore, a different mechanism than cisplatin, that induces cell cycle accumulation in the S phase as a result of DNA damage, must be involved. In the rest of the tumor cells, a slight increase of the S compartment was observed. Moreover, selenosteroids turned out to be excellent glutathione peroxidase (GPx) mimics for the catalytic removal of deleterious H₂O₂ (t_{1/2} 8.0–22.5 min) and alkyl peroxides (t_{1/2} 23.0–38.9 min) when used in substoichiometric amounts (1% molar ratio), thus providing a valuable tool for reducing the intrinsic oxidative stress in tumor progression.

Introduction

Steroids are attractive frameworks featured with relevant biological properties, among which hormonal, anti-inflammatory, or structural functions can be highlighted; these biomolecules are currently considered as key leads in medicinal chemistry¹ for the development of new therapeutic agents.

Accordingly, selective modifications of the substituents,² ring size,³ the tetracyclic steroid backbone⁴ and also the pending side-chain⁵ have been conducted, furnishing a wide variety of biologically-active compounds, comprising antifungal agents,⁶ aromatase inhibitors for the chemoprevention

of estrogen-dependent breast cancer,⁷ 5-α-reductase inhibitors for the treatment of benign prostatic hyperplasia,⁸ neuromuscular blocking agents with interest as muscle relaxants in surgery,⁹ or antitumor agents,¹⁰ among others.

Despite the widely-known biological activities of numerous organoselenium derivatives,^{11–13} including antitumor properties,^{14–17} the number of reported steroids bearing selenium-containing motifs is relatively scarce.^{18–25}

Concerned by the increasing incidence of cancer cases within world population, we envisioned the possibility of decorating natural steroids, endowed with relevant antiproliferative activities, with different organoselenium motifs with the aim of developing new antiproliferative agents with improved properties. In particular, three structurally close saponins (diosgenin, hecogenin and smilagenin) and the estrogen estrone were chosen. The biological properties of diosgenin, the aglycon of dioscin, a spirostane saponin found in some edible plants like in the roots of wild yam (*Dioscorea* sp.), have been extensively studied. Diosgenin has shown promising anticancer properties against a series of cancer cells (e.g. leukemia, prostate, colorectal, breast, or lung, among others), by inhibiting the growth and proliferation of such cells,^{26–28} as well as inducing apoptosis.²⁹ Both diosgenin and smilagenin (a constituent of *Smilax ornata*) exhibited strong inhibition of the

^aFacultad de Ciencias Químicas, Ciudad Universitaria, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 72570 Puebla, PUE, Mexico.

E-mail: penelope.merino@correo.buap.mx; Tel: +52 222 2295500-7382

^bBioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Universidad de La Laguna, c/ Astrofísico Francisco Sánchez 2, E-38206 La Laguna, Spain

^cDepartamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apartado 1203, E-41071 Sevilla, Spain. E-mail: osc-lopez@us.es;

Fax: +34 954624960; Tel: +34 954 559997

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7ob00458c

‡ These authors contributed equally to the experimental part of the manuscript.



Research paper

Synthesis of unprecedented steroidal spiro heterocycles as potential antiproliferative drugs



Laura L. Romero-Hernández^a, Penélope Merino-Montiel^{a,*}, Socorro Meza-Reyes^a,
José Luis Vega-Baez^a, Óscar López^b, José M. Padrón^c, Sara Montiel-Smith^{a,**}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Ciudad Universitaria, 72570 Puebla, Pue., Mexico

^b Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apartado 1203, E-41071 Sevilla, Spain

^c BioLab, Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO-AG), Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Universidad de La Laguna, c/ Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2017

Received in revised form

9 October 2017

Accepted 22 October 2017

Available online 2 November 2017

Keywords:

Steroids

Oxazoline

Oxazolidine

Heterocycles

Antiproliferative activity

ABSTRACT

Herein we report the straightforward preparation of novel conformationally-restricted steroids from *trans*-androsterone and estrone, decorated with spiranic oxazolidin-2-one or 2-aminooxazoline motifs at C-17 as potential antiproliferative agents. Such unprecedented pharmacophores were accessed using an aminomethylalcohol derivative at C-17 as the key intermediate; reaction of such functionality with triphosgene, or conversion into N-substituted thioureas, followed by an intramolecular cyclodesulfurization reaction promoted by yellow HgO, furnished such spirocycles in excellent yields.

Title compounds were tested *in vitro* against a panel of six human tumor cell lines, named A549 (non-small cell lung), HBL-100 (breast), HeLa (cervix), SW1573 (non-small cell lung), T-47D (breast) and WiDr (colon), and the results were compared with steroidal chemotherapeutic agents (abiraterone and galeterone); the A-ring of the steroidal backbone, the nature of the heterocycle and the N-substituents proved to be essential motifs for establishing structure-activity relationships concerning not only the potency but also the selectivity against tumor cell lines. Estrone derivatives, particularly those bearing a spiranic 2-aminooxazoline scaffold were found to be the most active compounds, with GI₅₀ values ranging from the low micromolar to the submicromolar level (0.34–1.5 μM). Noteworthy, the lead compounds showed a remarkable increase in activity against the resistant cancer cell lines (T-47D and WiDr) compared to the anticancer reference drugs (up to 120-fold).

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Heterocyclic moieties are considered as privileged structures [1], endowed with a pivotal importance from a biological and pharmaceutical point of view [2–6]. They are promising targets in the drug discovery process [7–12], and are subsequently

ubiquitous motifs in a plethora of commercially-available drugs for the treatment of numerous diseases; in fact, it is estimated that roughly 59% of small drugs approved by the US FDA contain a nitrogen-based heterocycle [13].

Heterocycles exhibit a great variety of pharmaceutical properties, including antidepressant [14], antimicrobial [15,16], antibacterial [17], and anticancer [18,19], among others [20]. The broad spectrum of biological activities of such molecules has encouraged the synthesis of new compounds with improved properties; heterocycles are widely-used for the isosteric replacement of a series of functional groups, as H-acceptors and H-donors, as metal chelators, or for modulating the polarity of the drug, thus enhancing its bioavailability [21].

In this context, the conjugation of a heterocyclic motif with a steroidal framework has allowed a synergic effect of both biologically-active pharmacophores, leading to unique properties, such as anti-inflammatory [22], antibacterial [23,24],

Abbreviations: COSY, Correlation Spectroscopy; DEPT, Distortionless Enhancement by Polarization Transfer; EI, Electronic Impact; ESI, ElectroSpray Ionization; FAB, Fast Atom Bombardment; FDA, Food and Drug Administration; GI₅₀, Growth Inhibition of 50%; HMBC, Heteronuclear Multiple Bond Correlation; HSQC, Heteronuclear Single Quantum Correlation; NOESY, Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: penelope.merino@correo.buap.mx (P. Merino-Montiel), maria.montiel@correo.buap.mx (S. Montiel-Smith).

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.063>

0223-5234/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2018, 8, 28716

Revealing biomedically relevant cell and lectin type-dependent structure–activity profiles for glycoclusters by using tissue sections as an assay platform†

Herbert Kaltner,^a Joachim C. Manning,^a Gabriel García Caballero,^a Claudia Di Salvo,^b Adele Gabba,^b Laura L. Romero-Hernández,^b Clemens Knosp,^{b,c} Dan Wu,^d Harrison C. Daly,^d Donal F. O'Shea,^{b,d} Hans-Joachim Gabius^a and Paul V. Murphy^{b,*}

The increasing realization of the involvement of lectin-glycan recognition in (patho)physiological processes inspires envisioning therapeutic intervention by high-avidity/specificity blocking reagents. Synthetic glycoclusters are proving to have potential for becoming such inhibitors but the commonly used assays have their drawbacks to predict *in vivo* efficacy. They do not represent the natural complexity of (i) cell types and (ii) spatial and structural complexity of glycoconjugate representation. Moreover, testing lectins in mixtures, as present *in situ*, remains a major challenge, giving direction to this work. Using a toolbox with four lectins and six bi- to tetravalent glycoclusters bearing the cognate sugar in a model study, we here document the efficient and versatile application of tissue sections (from murine jejunum as the model) as a platform for routine and systematic glycocluster testing without commonly encountered limitations. The nature of glycocluster structure, especially core and valency, and of protein features, *i.e.* architecture, fine-specificity and valency, are shown to have an influence, as cell types can differ in response profiles. Proceeding from light microscopy to monitoring by fluorescence microscopy enables grading of glycocluster activity on individual lectins tested in mixtures. This work provides a robust tool for testing glycoclusters prior to considering *in vivo* experiments.

Received 23rd June 2018
Accepted 24th July 2018

DOI: 10.1039/c8ra05382k

rsc.li/rsc-advances

Introduction

The realization of the unsurpassed capacity of glycans to store biological information in a minimum of space enables elucidating the chain of molecular events, from oligosaccharide synthesis and establishing the spatial aspects of their presentation on glycoconjugates and membranes to actual cellular effects, to become a staple of current research.¹ Shaping a paradigm for this area, these efforts disclosed that reading of sugar-encoded messages by tissue lectins is an efficient means to facilitate molecular bridging. When occurring between cells and also between cells and the extracellular matrix (*in trans*), it can lead to adhesion.^{2–5} Cross-linking of constituents within

a membrane (*in cis*) will form so-called glycoconjugate-lectin lattices that can trigger ensuing signalling.^{6–10} In each case, the intimate interplay of structural and topological parameters on both sides minimises stabilisation of random contacts, thus underlying the functional pairing of a lectin with not just any glycoconjugate, but with its matching counterreceptor(s). Hereby, glycan-encoded messages are read and then translated into particular post-binding responses. This theme of mutually specific protein(lectin)-glycan recognition appears to have a broad physiological significance.^{11–14}

Naturally, these emerging insights give strong incentive to search for compounds that will block this type of interaction if clinically unfavourable, and mimetics of polyvalent glycans termed glycoclusters have already been found to be particularly active.^{15–18} Besides their design and synthesis, a central challenge to master toward a prospect of biomedical application is the experimental set-up to measure inhibitory capacity. Optimally, it should come as closely as possible to the *in vivo* situation (in animals and man) with its diversity on the levels of glycans presented by glycoconjugates^{19–22} and of cell types, at the same time allowing for wide-scale testing in a robust manner with a clear read-out. The experimental approach to meet this challenge presented herein is a logical extension of classical lectin histochemistry.

^aInstitute of Physiological Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

^bSchool of Chemistry, National University of Ireland Galway, University Road, Galway, Ireland. E-mail: paul.v.murphy@nuigalway.ie

^cInstitute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilians-University Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

^dDepartment of Chemistry, Royal College of Surgeons of Ireland (RCSI), 123 St. Stephen's Green, Dublin 2, Ireland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8ra05382k

Y fueron presentados en las siguientes reuniones:

- **Laura Leticia Romero Hernández**, Sara Montiel Smith, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, José G. Fernández-Bolaños, Óscar López, Gabriela B. Plata, José M. Padrón. Síntesis de un seleno-derivado esteroidal. Póster: P-30. **XIX Semana Científica “Antonio González”. La Laguna, Tenerife, España del 6 al 9 de octubre de 2015.**
- Óscar López, José G. Fernández-Bolaños, Inés Maya, Paloma Begines, **Laura L. Romero-Hernández**, Ailed Arenas-González, Sara Montiel-Smith, Penélope Merino-Montiel, Socorro Meza-Reyes, José Luis Vega-Báez, Gabriela B. Plata, José M. Padrón. Diseño, síntesis y evaluación biológica de nuevos compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales. Ponencia: CP-7. **XIX Semana Científica “Antonio González”. La Laguna, Tenerife, España del 6 al 9 de octubre de 2015.**
- **Laura Leticia Romero Hernández**, Ángel Alejandro Nolasco Hernández, Sara Montiel Smith, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes. Síntesis y caracterización de un nuevo espirocarbamato derivado de estrona. Póster: QORG-P2-O. **50° Congreso Mexicano de Química. Querétaro, Querétaro, México del 7 al 10 de octubre de 2015.**
- Jorge Izhak Miranda Rivera, **Laura Leticia Romero Hernández**, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith. Síntesis de 2-aminoxazolinas esteroideas mediante ciclación intramolecular. Póster: QORG-E13-C. **50° Congreso Mexicano de Química. Querétaro, Querétaro, México del 7 al 10 de octubre de 2015.**
- **Laura Leticia Romero Hernández**, Sara Montiel Smith, Penélope Merino Montiel. Síntesis y evaluación biológica de espiroheterociclos esteroideas y derivados de selenio. Ponencia: D-2014-2 O3 (D29). **XX Simposio Interno del Posgrado en**

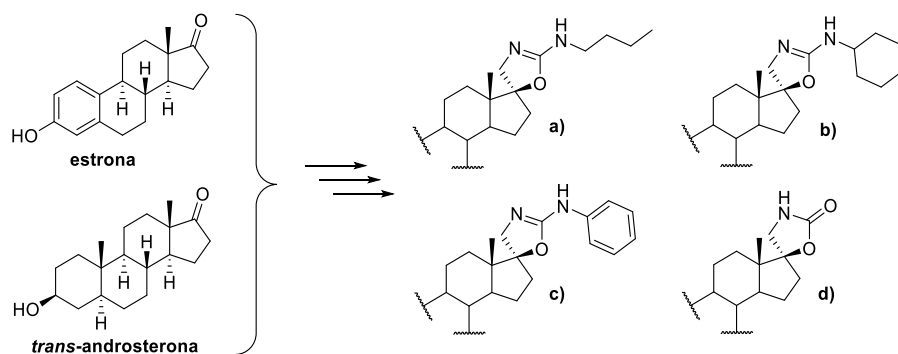
Ciencias Químicas BUAP. Puebla, Puebla, México del 12 al 15 de octubre de 2015.

- **L.L. Romero-Hernández, R. Martínez-Pascual, S. Montiel-Smith, P. Merino-Montiel, S. Meza-Reyes, J.G. Fernández-Bolaños, O. López, G. B. Plata, J. M. Padrón.** Synthesis of novel steroidal spiro heterocycles from estrone. Póster: P012. **3rd. International Congress on Steroid Research. Chicago, Illinois, Estados Unidos del 15 al 18 de noviembre de 2015.**
- **Laura Leticia Romero Hernández, Sara Montiel Smith, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, José M. Padrón.** Síntesis y evaluación antiproliferativa de espirocarbamatos y espiroisoureas derivados de estrona y *trans*-androsterona. Póster: QFA00014. **XLIX Congreso Nacional y VII Internacional de Ciencias Farmacéuticas. Huatulco, Oaxaca, México del 04 al 08 de septiembre de 2016.**
- **Laura Leticia Romero Hernández, Sara Montiel Smith, Penélope Merino Montiel, Socorro Meza Reyes, José M. Padrón.** Síntesis y evaluación antiproliferativa de espiroheterociclos esteroidales. Ponencia. **Congreso Mesoamericano de Investigación UNACH 2016. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México del 5 al 7 de octubre de 2016.**
- **Laura Leticia Romero Hernández, Paul Murphy, Penélope Merino Montiel, Sara Montiel Smith.** Síntesis de glicoconjugados de lactosa y α -GalNAc. Ponencia. **XXI Simposio Interno del Posgrado en Ciencias Químicas BUAP. Puebla, Puebla, México del 24 al 28 de octubre de 2016.**
- **L.L. Romero-Hernández, P. Merino-Montiel, S. Meza-Reyes, J.L. Vega-Báez, Ó. López, J.M. Padrón, S. Montiel-Smith.** Synthesis of unprecedented steroidal spiro heterocycles as potential antiproliferative drugs. Póster: P1.17. **19th Tetrahedron Symposium. Riva del Garda, Lake Garda, Italia del 26 al 29 de junio de 2018.**

Resumen

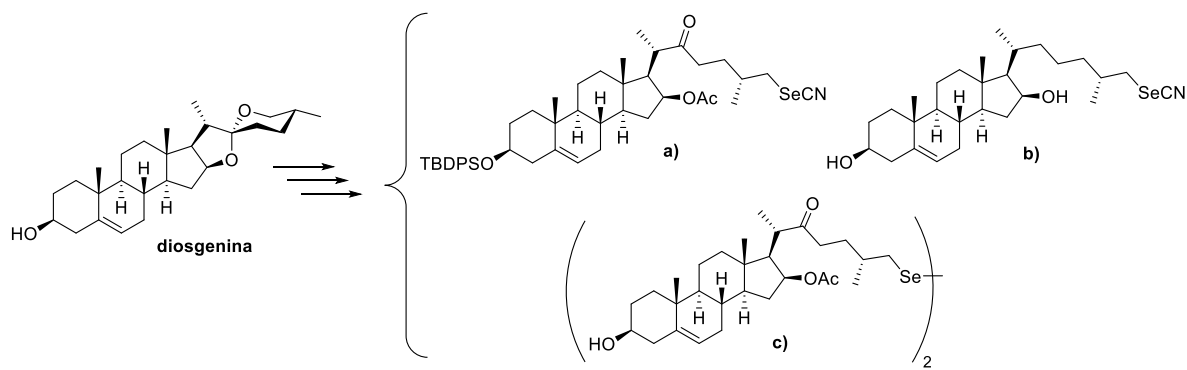
En el capítulo I de este trabajo de Tesis se presenta la síntesis de derivados esteroidales con actividad antiproliferativa frente a líneas celulares cancerosas.

En primer lugar, se presenta la síntesis de espiroheterociclos derivados de estrona y *trans*-androsterona sobre el C-17 del esqueleto esteroide. Se sintetizaron espiroisoureas (**a-c**) y espirocarbamatos (**d**) mediante una ruta sintética de 5 o 6 pasos a partir de la estrona con rendimientos del 34-63% y de 4 o 5 pasos a partir de la *trans*-androsterona con rendimientos del 36-55% (**Esquema A**).



Esquema A. Espiroheterociclos esteroidales.

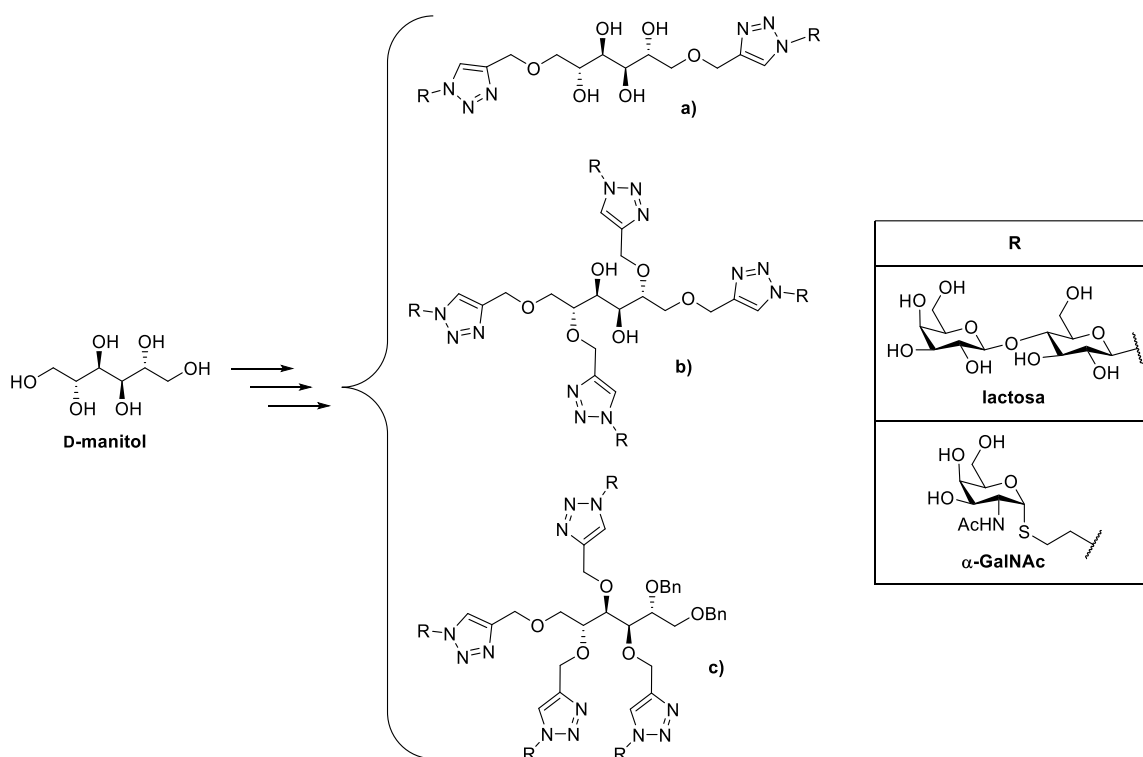
Además, se describe la formación de selenoderivados esteroidales a partir de diosgenina. Se sintetizaron dos selenocianatos (**a, b**) y un diselenuro esteroide (**c**). Estos derivados se obtuvieron con rendimientos moderados del 9-40% (**Esquema B**).



Esquema B. Obtención de selenoderivados a partir de diosgenina.

Finalmente, se presentan los resultados de antiproliferación de los derivados sintetizados. Los heterociclos y los selenoderivados esteroidales, así como algunos compuestos intermediarios, fueron evaluados *in vitro* como agentes antiproliferativos frente a 6 líneas celulares de tumores sólidos humanos. Los derivados que resultaron más activos fueron las espiroisoureas (**a-c, esquema A**) derivadas de estrona ($GI_{50} = 0.34-4.4 \mu M$) y de *trans*-androsterona ($GI_{50} = 0.9-2.1 \mu M$), así como el selenocianato derivado de diosgenina ($GI_{50} = 1.7-5.5 \mu M$) (**b, esquema B**).

En el capítulo II de este trabajo se presenta la síntesis de ligandos multivalentes derivados de lactosa y α -GalNAc (glicoclusters) con interés como inhibidores de lectinas (galectinas y lectina tipo C en macrófagos). Se sintetizaron cuatro glicoclusters, tres derivados de lactosa (**a-c, esquema C**) y uno derivado de α -GalNAc (**b, esquema C**).



Esquema C. Síntesis de glicoclusters derivados de lactosa y α -GalNAc.

Para la síntesis de estos derivados se utilizó D-manitol como espaciador entre los azúcares y la reacción *click chemistry* de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) como proceso clave.

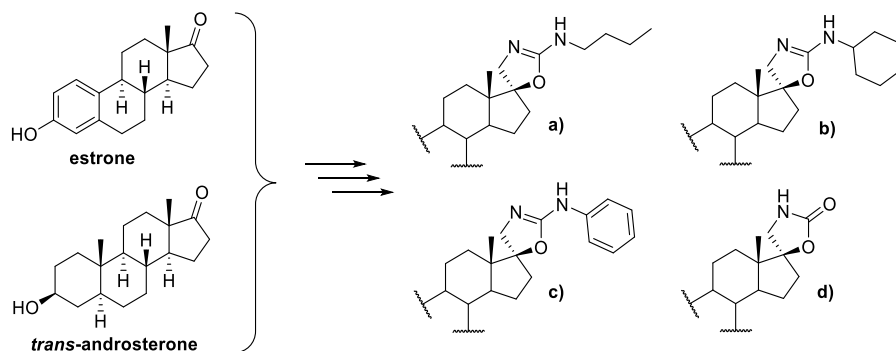
La síntesis de los azúcares utilizados se llevó a cabo en dos pasos para el derivado de lactosa (83%) y en cinco pasos para el derivado de α -GalNAc (37%). Mientras que la síntesis de los ligandos multivalentes se realizó mediante rutas de seis y siete pasos con rendimientos globales moderados que van del 9-21% (**Esquema C**).

La actividad biológica del glicocluster de GalNAc, así como un ensayo biológico diseñado a partir de un grupo de glicoclusters que poseen este carbohidrato (incluyendo el compuesto descrito en esta tesis) es brevemente descrito al final del capítulo.

Abstract

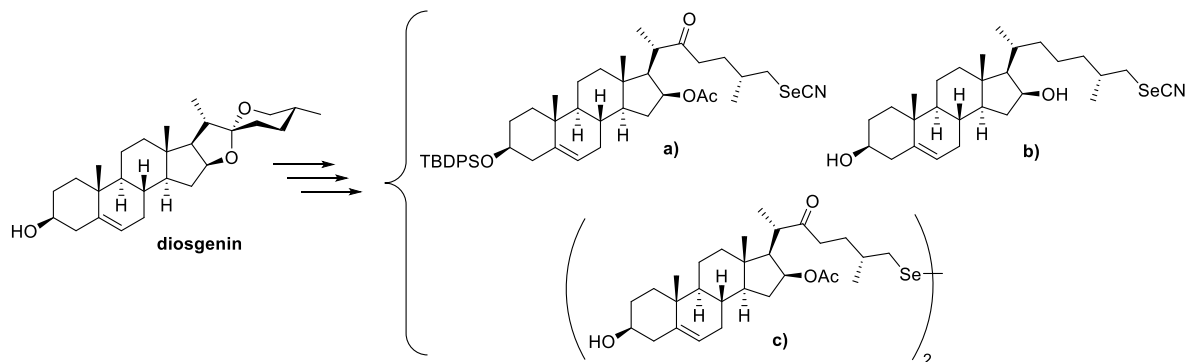
The Chapter I of this thesis describes the synthesis of steroidal derivatives with antiproliferative activity against cancer cell lines.

Firstly, it is presented the synthesis of spiroheterocycles derived from estrone and *trans*-androsterone on C-17 of the steroidal skeleton. Spiroisoureas (**a-c**) and spirocarbamates (**d**) were synthesized through 5 or 6 steps from estrone with 34-63% overall yields and through 4 or 5 steps from *trans*-androsterone with 36-55% overall yields (**Scheme A**).



Scheme A. Steroidal spiroheterocycles.

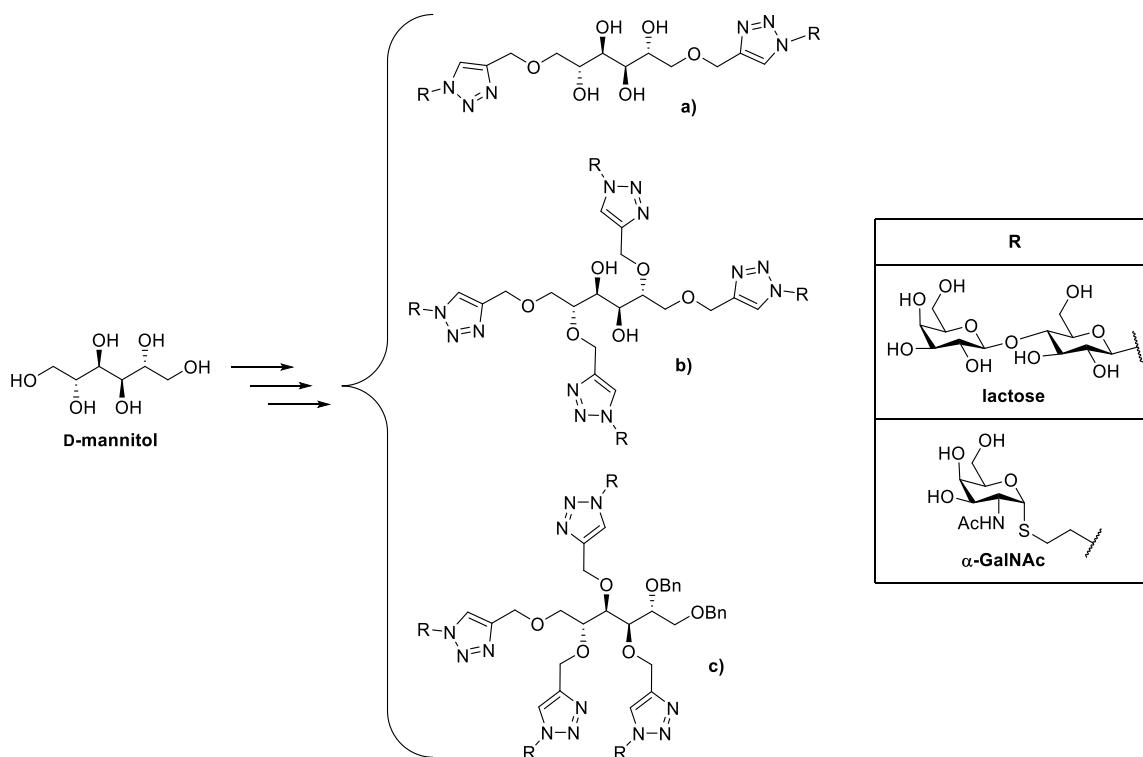
Furthermore, it was accomplished the synthesis of steroidal selenoderivatives from diosgenin. Two selenocyanates (**a, b**) and a steroidal diselenide (**c**) were synthesized. These derivatives were obtained with moderate yields (9-40%) (**Scheme B**).



Scheme B. Synthesis of selenoderivatives from diosgenin.

Finally, the antiproliferative results of the synthesized derivatives are presented. Steroidal heterocycles and selenoderivatives, as well as some intermediate compounds, were evaluated *in vitro* as antiproliferative agents against a panel of six human solid tumour cell lines. The most potent compounds were spiroisoureas (a-c, Scheme A) derived from estrone ($GI_{50} = 0.34\text{-}4.4\ \mu\text{M}$) and *trans*-androsterone ($GI_{50} = 0.9\text{-}2.1\ \mu\text{M}$), as well as the selenocyanate compound derived from diosgenin ($GI_{50} = 1.7\text{-}5.5\ \mu\text{M}$) (**b**, Scheme B).

In Chapter II of this thesis, it is described the synthesis of multivalent ligands derived from lactose y α -GalNAc (glycoclusters) with interest as lectins inhibitors (galectins and macrophage galactose C-type lectin). Four glycoclusters were synthesized, three of them derived from lactose (**a-c**, Scheme C) and one derived from α -GalNAc (**b**, Scheme C).



Scheme C. Synthesis of glycoclusters derived from lactose and α -GalNAc.

The synthesis of these compounds was made using D-mannitol as linker between carbohydrates, while the click chemistry reaction of copper catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) was used as the key step.

The synthesis of carbohydrates was made in two steps for the lactose derivative (83% overall yield) and in five steps for the α -GalNAc derivative (37% overall yield), while the synthesis of multivalent ligands was made in six or seven steps with moderate yields (9-21%) (**Scheme C**).

The biological activity of the GalNAc glycocluster, as well as a biological assay design from a panel of glycoclusters with the same carbohydrate (including the compound described in this thesis) is briefly described at the end of the chapter.

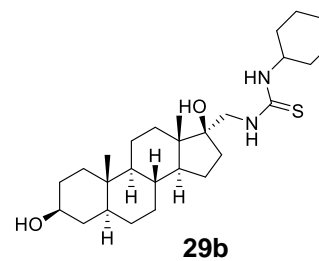
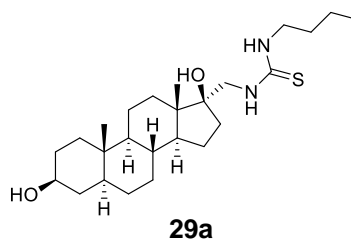
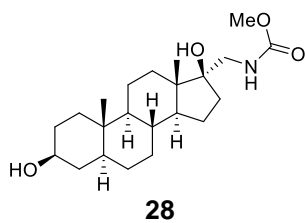
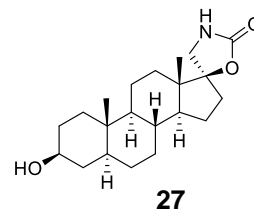
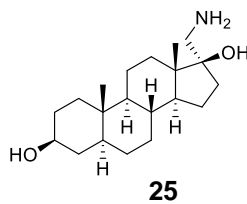
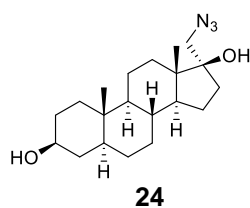
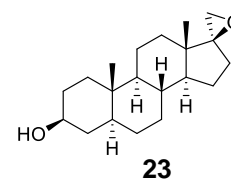
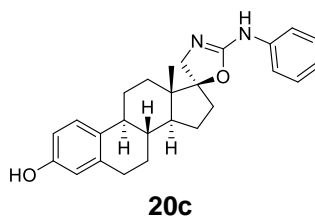
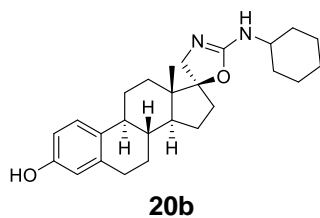
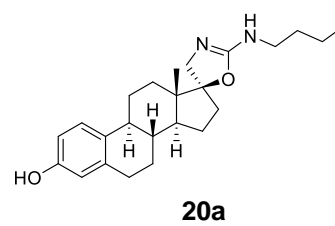
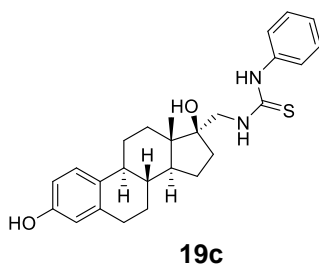
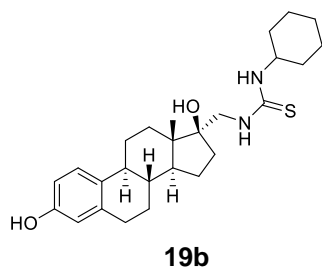
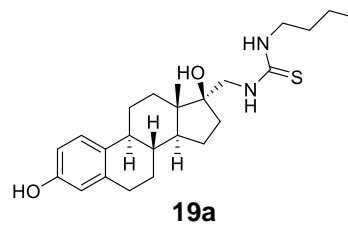
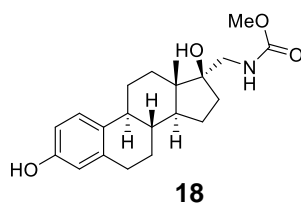
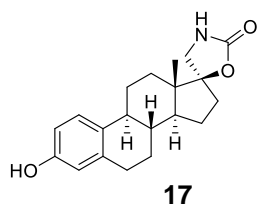
Índice

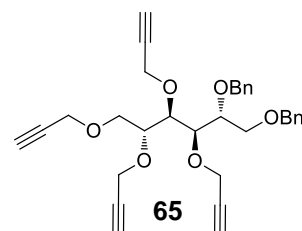
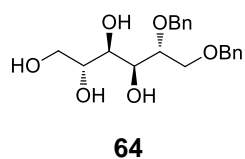
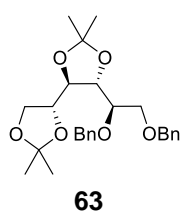
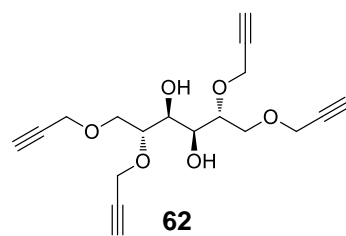
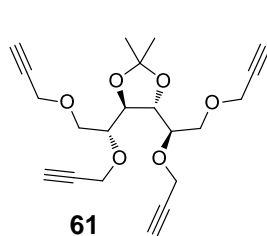
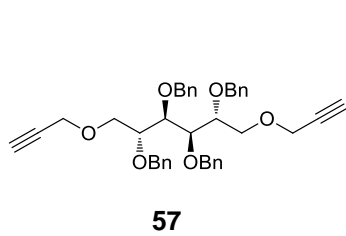
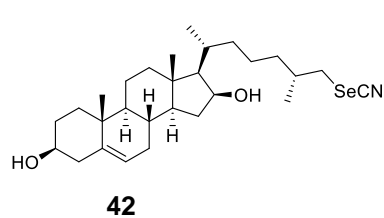
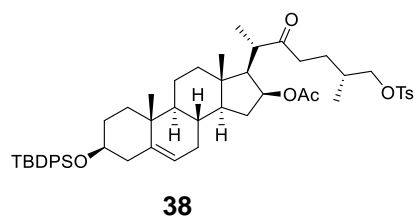
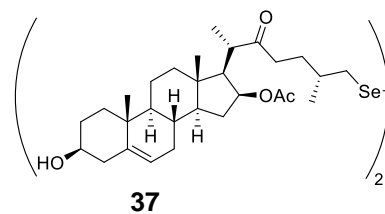
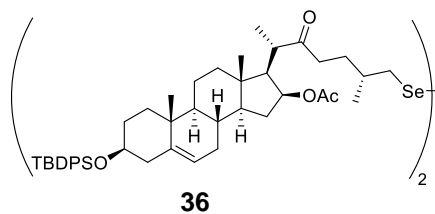
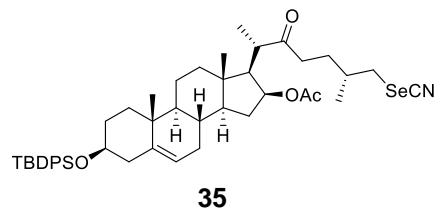
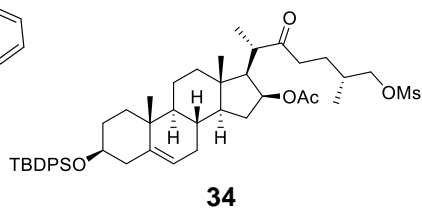
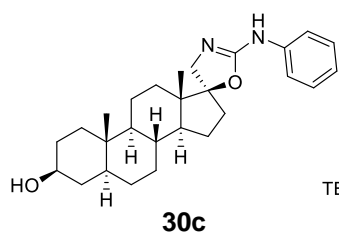
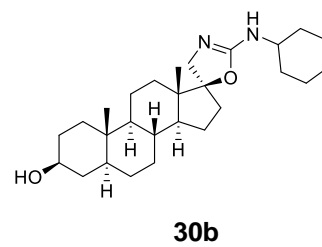
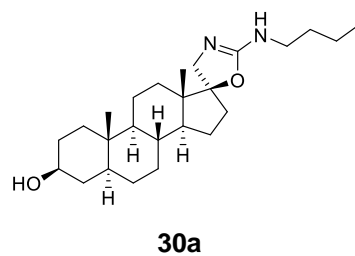
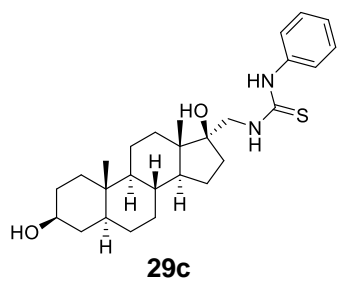
Resumen	ix
Abstract	xii
Nuevos compuestos	xviii
Abreviaturas y siglas	xxiii
Capítulo I. Espiroheterociclos esteroidales y derivados de selenio	1
1.1 Introducción	1
1.2 Antecedentes	4
1.2.1 Heterociclos derivados de oxazol	4
1.2.1.1 Síntesis de oxazolidin-2-onas y 2-aminooxazolininas	5
1.2.2 Selenoderivados	10
1.3 Objetivos	12
1.4 Discusión de resultados	13
1.4.1 Síntesis de espiroheterociclos	13
1.4.1.1 Síntesis de derivados de estrona	17
1.4.1.1.1 Síntesis del anillo espirooxazolidin-2-ona	20
1.4.1.1.2 Síntesis del anillo espiránico 2-aminooxazolina	21
1.4.1.1.3 Síntesis del anillo espirooxazolidina-2-tiona	24
1.4.1.2 Síntesis de derivados de <i>trans</i> -androsterona	25
1.4.1.2.1 Síntesis del anillo espirooxazolidin-2-ona	27
1.4.1.2.2 Síntesis del anillo espiránico 2-aminooxazolina	29
1.4.2 Síntesis de selenoderivados	30
1.4.2.1 Síntesis de derivados oxocolestánicos	30
1.4.2.2 Síntesis de derivados colestánicos	37
1.4.3 Actividad antiproliferativa	39

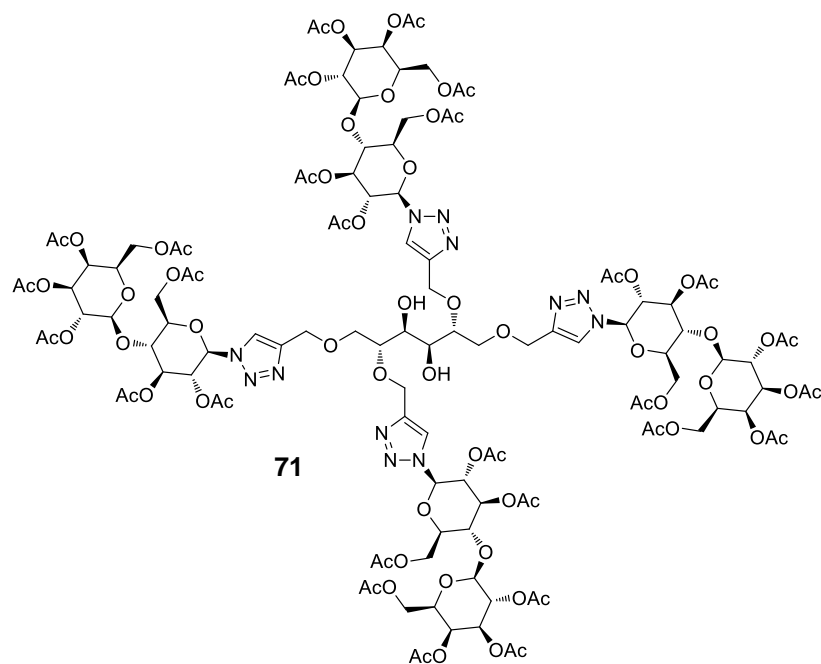
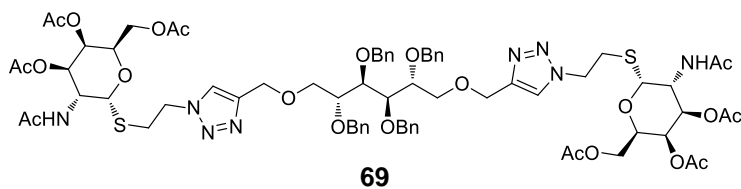
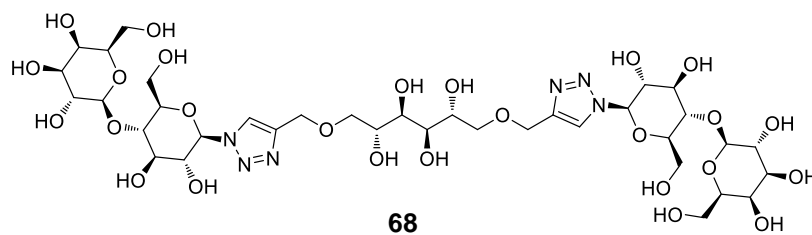
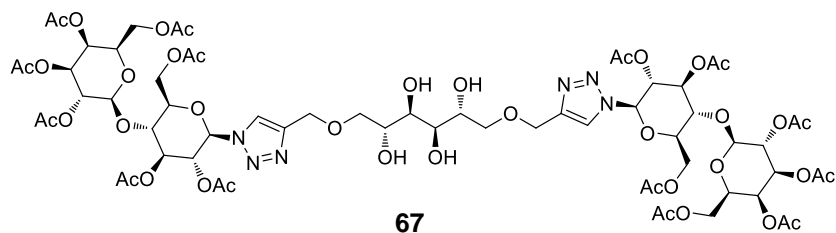
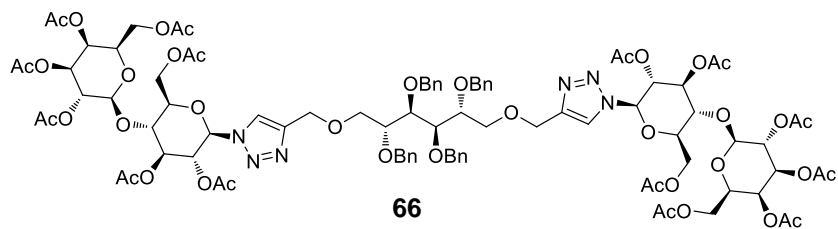
1.4.3.1	Actividad en derivados de estrona y <i>trans</i> -androsterona	39
1.4.3.2	Actividad en selenoderivados	42
1.5	Conclusiones	44
1.6	Desarrollo experimental	45
1.6.1	Métodos generales	45
1.6.2	Métodos de síntesis, datos físicos y espectroscópicos de los compuestos obtenidos	46
1.6.3	Pruebas de antiproliferación	74
1.7	Bibliografía	76
Capítulo II. Glicoclusters de lactosa y α-GalNAc		81
2.1	Introducción	81
2.2	Antecedentes	82
2.2.1	Tipos de lectinas	82
2.2.1.1	Galectinas (Lectinas tipo S)	83
2.2.1.2	Lectina tipo C en macrófagos	84
2.2.2	Multivalencia	85
2.2.3	Glicoclusters de lactosa y GalNAc	87
2.2.4	<i>Click chemistry</i>	89
2.3	Objetivos	92
2.4	Discusión de resultados	93
2.4.1	Síntesis de carbohidratos	93
2.4.1.1	Síntesis del derivado de lactosa	93
2.4.1.2	Síntesis del derivado de GalNAc	94
2.4.2	Síntesis de espaciadores	96
2.4.2.1	Síntesis del derivado bivalente 57	97
2.4.2.2	Síntesis del derivado tetravalente simétrico 62	99
2.4.2.3	Síntesis del derivado tetravalente asimétrico 65	101
2.4.3	Síntesis de glicoclusters	103

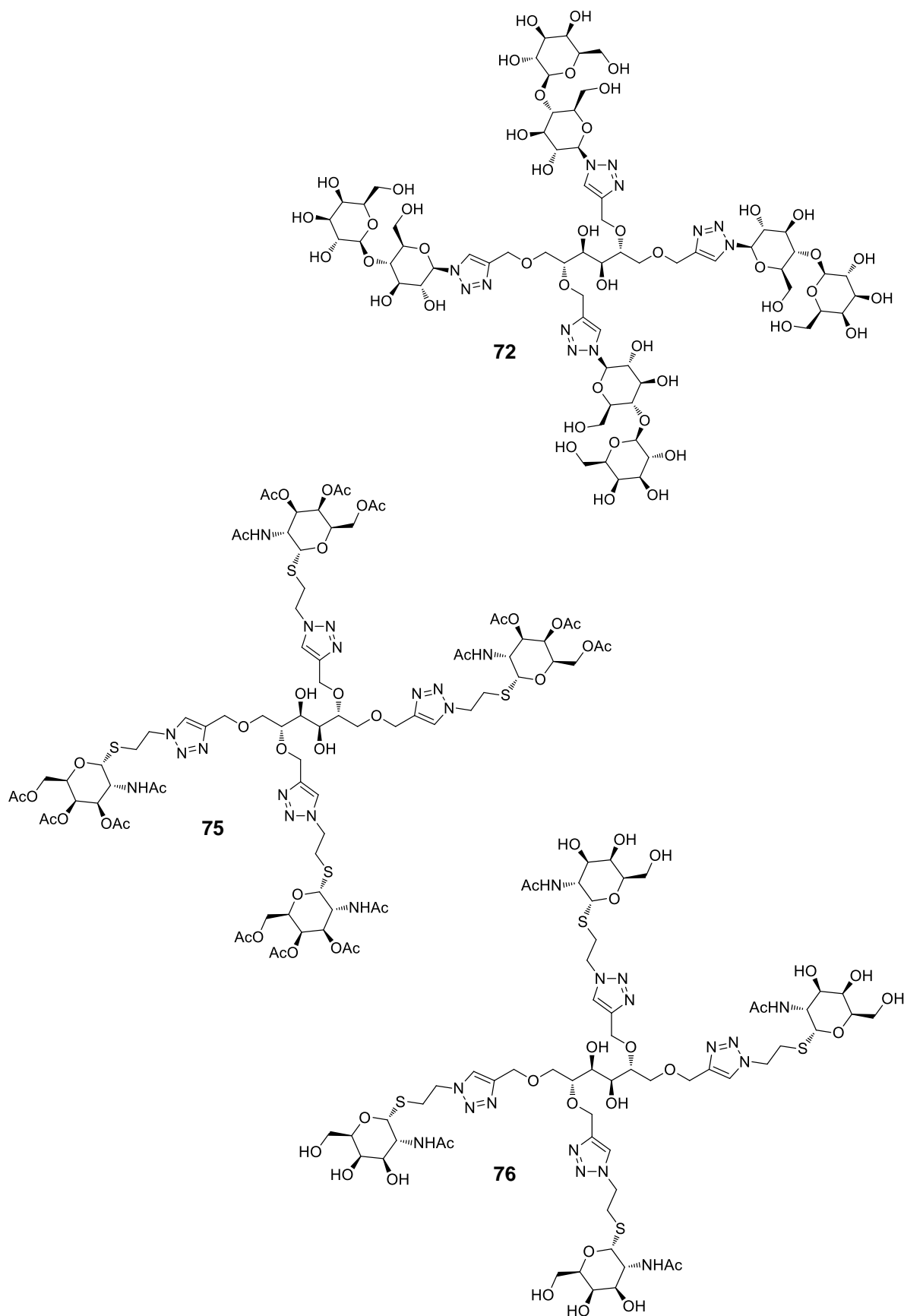
2.4.3.1 Síntesis del glicocluster bivalente de lactosa 68	103
2.4.3.2 Síntesis del glicocluster bivalente de GalNAc 69	105
2.4.3.3 Síntesis del glicocluster tetravalente de lactosa 72	106
2.4.3.4 Síntesis del glicocluster tetravalente de GalNAc 76	108
2.4.3.5 Síntesis del glicocluster tetravalente de lactosa 78	110
2.4.4 Actividad biológica	111
2.5 Conclusiones	113
2.6 Desarrollo experimental	114
2.6.1 Métodos generales	114
2.6.2 Métodos de síntesis, datos físicos y espectroscópicos de los compuestos obtenidos	115
2.7 Bibliografía	140
Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C	142

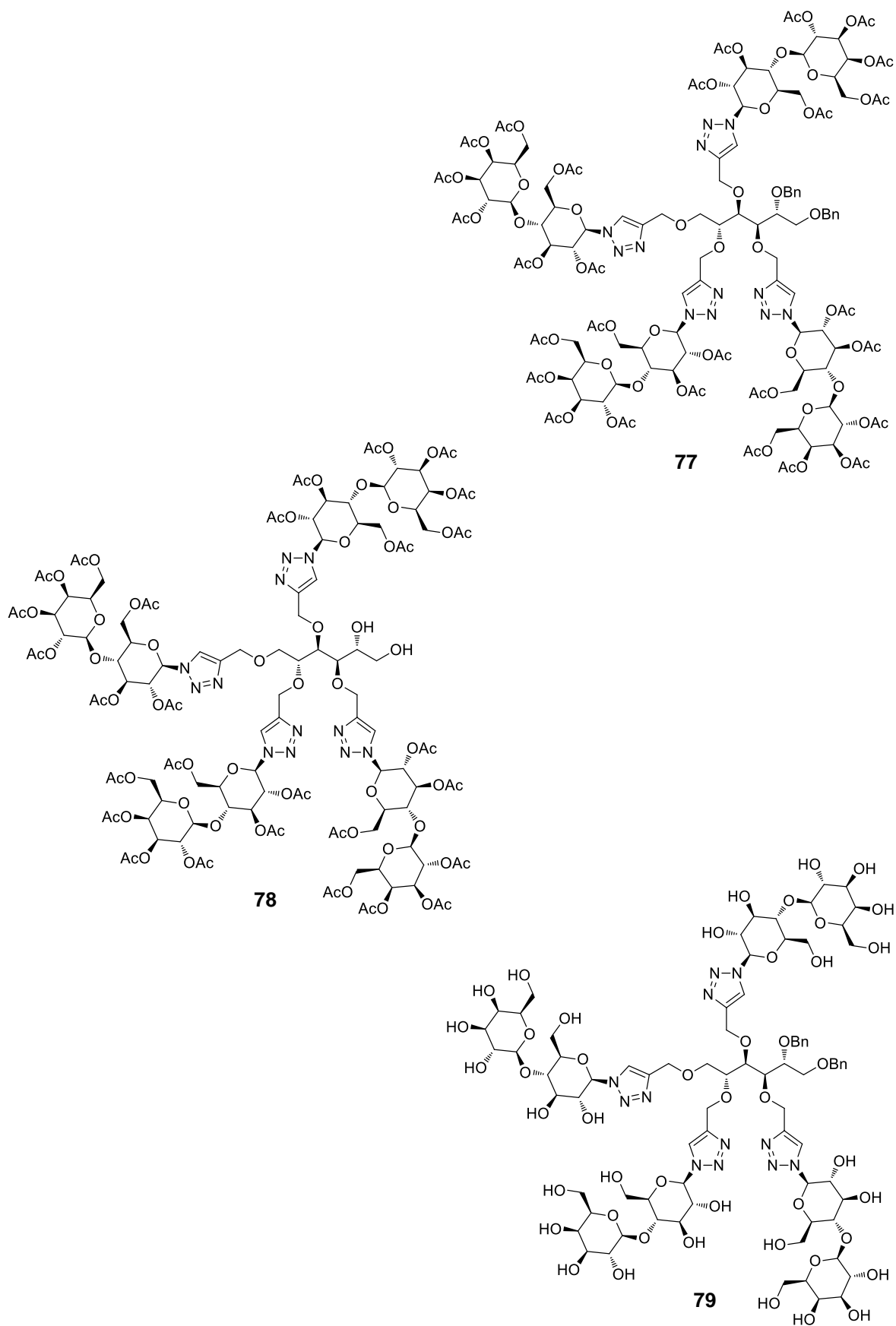
Nuevos compuestos











Abreviaturas y siglas

5-FU	5-Fluorouracilo
ac	Acuoso
APT	<i>Attached Proton Test</i>
ax	Axial
<i>c</i>	Concentración
ccf	Cromatografía en capa fina
CDDP	<i>cis</i> -Diaminodicloroplatino(II) (cisplatino)
CDs	Células dendríticas
conc.	Concentrado
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CuAAC	Cicloadición azida-alquino catalizada por Cu
Cy	Ciclohexilo
δ	Desplazamiento químico
d	Doble
DCM	Diclorometano
DRC	Dominio de reconocimiento de carbohidrato
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
desc	Descomposición
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica

dq	Doble de cuádruple
dt	Doble de triple
ec	Ecuatorial
EI	<i>Electron Impact</i>
EI-MS	<i>Electron Impact Mass Spectrometry</i>
eq	Equivalentes
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FAB-MS	<i>Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Gal	Galactosa
GAL	Galectina
GalNAc	<i>N-Acetil-D-galactosamina</i>
gem	Geminal
GI ₅₀	<i>Growth inhibition of 50%</i>
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N-Acetilglucosamina</i>
GPx	Glutación peroxidasa
HREI-MS	<i>High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry</i>
HRESI-MS	<i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HRFAB-MS	<i>High Resolution Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IR	Infrarrojo
lit.	Literatura
LD ₅₀	<i>Lethal Dose 50%</i>

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Múltiple
MeBQ	Metil- <i>p</i> -benzoquinona
MGL	Lectina tipo C, tipo galactosa en macrófagos
MHz	Megahertz
MMT	Monometoxitritilo
Ms	Mesilo
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2- <i>H</i> -tetrazolio
MW	Microondas
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
Ns	Nitrobencensulfonilo
PC	Porcentaje de crecimiento
Ph	Fenilo
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
py	Piridina
qd	Cuádruple de dobles
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
s	Simple
sa	Simple ancha
t	Triple
t.a.	Temperatura ambiente
td	Triple de doble
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TBAHS	Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio
TBAI	Ioduro de tetrabutilamonio

TBDPS	<i>Terc</i> -butildifenilsilano
THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
TMSCN	Cianuro de trimetilsilano
TMSN ₃	Trimetilsilil azida
tpa	Trifenilacetato
Ts	Tosilo
VAA	Aglutinina <i>Viscum album</i>
VP-16	Etopósido

Capítulo I. Espiroheterociclos esteroidales y derivados de selenio

1.1 Introducción

Los heterociclos constituyen un amplio grupo de compuestos orgánicos con importancia química y biológica. Podemos encontrarlos de manera extendida en la naturaleza como parte de hormonas, ácidos nucleicos, vitaminas, antibióticos y alcaloides (**Figura 1.1**); mientras que la síntesis orgánica ha permitido que formen parte de colorantes, herbicidas, fungicidas entre otros (**Figura 1.2**).

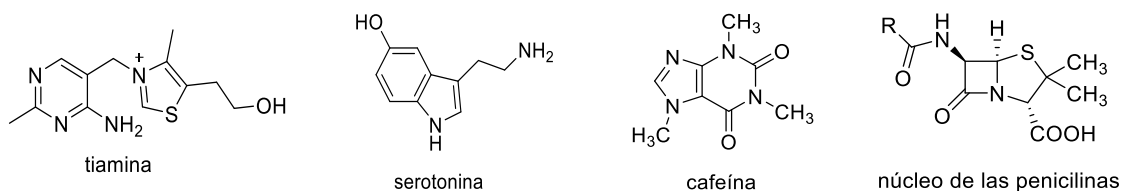


Figura 1.1 Compuestos heterocíclicos presentes en la naturaleza.

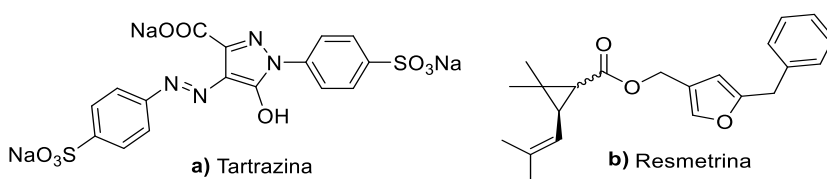


Figura 1.2 Compuestos heterocíclicos sintéticos. a) Colorante alimentario b) Insecticida.

Los heterociclos también son estructuras importantes desde el punto de vista farmacéutico por la diversa actividad biológica que presentan; de hecho, muchos de los fármacos de moléculas pequeñas aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) contienen un heterociclo nitrogenado en su estructura.¹

De manera general, los compuestos que poseen heterociclos, principalmente de nitrógeno, oxígeno y azufre, han mostrado actividad como antibacterianos,^{2,3} anticancerígenos,^{4,5} antifúngicos,⁶ etc.

En el campo de los esteroides, se han sintetizado heterociclos unidos o fusionados a esqueletos esteroidales y en menor cantidad espiroheterociclos esteroidales, lo cual les ha conferido propiedades biológicas importantes. Se sabe que los esteroides, al poseer un esqueleto hidrofóbico pasan espontáneamente a través de la membrana celular hacia el citosol donde se unen a los receptores;⁷ de manera que el efecto sinérgico de los heterociclos y la actividad única de los esteroides han culminado en diferentes propiedades farmacológicas; en lo que a esto respecta, diversos autores han reportado que los heterociclos esteroidales tienen actividad como antibacteriales,^{8,9} antifúngicos¹⁰ y antiinflamatorios,¹¹ entre otras¹² (**Figura 1.3**). Además, han mostrado actuar como antitumorales¹³ y anticancerígenos¹⁴⁻¹⁶ a través de diferentes mecanismos de acción; algunos de ellos funcionando como inhibidores de enzimas tales como la aromatasa¹⁷ (responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos) y la 5 α -reductasa¹⁸ (responsable de la conversión de testosterona a dihidrotestosterona) implicadas en la aparición del cáncer de mama y próstata respectivamente.

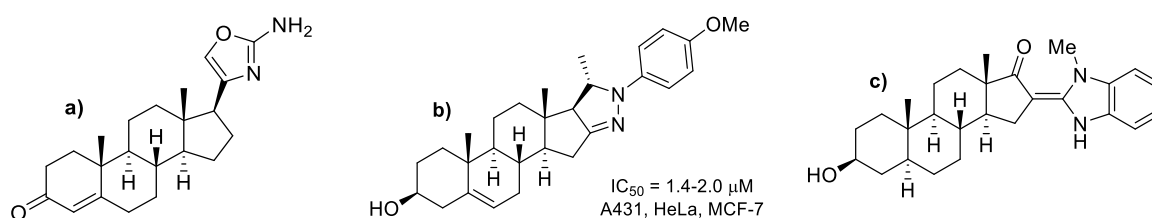


Figura 1.3 Heterociclos esteroidales con actividad farmacológica. a) Antiinflamatorio. b) Citotóxico. c) Antibacteriano.

Del grupo de los heterociclos esteroidales los espiroheterociclos han llamado especialmente nuestra atención, pues se ha demostrado en algunas moléculas que la restricción conformacional incrementa ciertas propiedades biológicas como la selectividad del receptor y la afinidad de unión, tal como lo describen algunos autores.¹⁹⁻²¹

Otro grupo de compuestos con importancia en la química medicinal son aquellos que contienen selenio en su estructura. Se ha observado que muchos selenoderivados tienen propiedades en contra de especies pro-oxidantes y se pueden comportar como miméticos de la glutatión peroxidasa (GPx),²² enzima que actúa en el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo; además, han mostrado tener propiedad como agentes citotóxicos y antiproliferativos.^{23,24}

Los selenoderivados esteroidales son compuestos descritos escasamente en la bibliografía.²⁵ En nuestro laboratorio se desarrollaron dos metodologías para la obtención de derivados 22- y 26-selenocianatos,²⁶ en el caso de los últimos derivados se determinó su actividad antiproliferativa frente tres líneas celulares relacionadas con el cáncer de cérvix (HeLa, CaSki y ViBo). El derivado de diosgenina tuvo un IC₅₀ de 10-18 μM, mientras que el de hecogenina fue de 95-97 μM.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se han sintetizado algunos derivados de selenoureas con actividad biológica relevante, en concreto como agentes antiproliferativos y antioxidantes. (Figura 1.4).^{27,28}

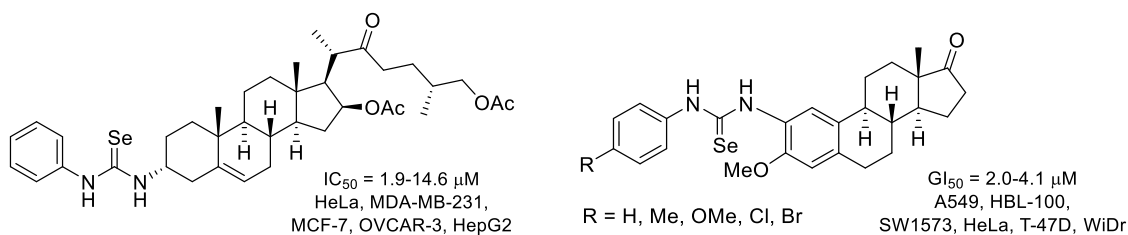


Figura 1.4 Selenoureas esteroidales con actividad antioxidante y antiproliferativa.

De esta manera, en este capítulo del trabajo de Tesis se propuso sintetizar derivados esteroidales con un espiroheterociclo en su estructura, específicamente un espirocarbamato o una espiroisourea en C-17. Además, se reporta la síntesis de algunos selenoderivados esteroidales. Todos los derivados finales, así como algunos compuestos intermediarios fueron probados como agentes antiproliferativos frente a diversas líneas celulares tumorales. El análisis de las estructuras, así como de la actividad presentada permitió deducir algunas relaciones estructura-actividad.

1.2 Antecedentes

1.2.1 Heterociclos derivados de oxazol

Se denominan heterociclos a aquellos compuestos cíclicos que tienen como miembros del anillo a átomos de al menos dos elementos diferentes.²⁹ Si el anillo no contiene átomos de carbono el compuesto se denomina heterociclo inorgánico, pero si en el anillo hay al menos un átomo de carbono, hablamos entonces de un heterociclo orgánico y por lo tanto todos los demás átomos diferentes de C se denominan heteroátomos. En principio, cualquier elemento (excepto los metales alcalinos) puede actuar como átomo del anillo. Los heteroátomos más comunes son el N, O y S.³⁰

El número de átomos en el anillo determina el tamaño del heterociclo, aunque no existe un límite en el tamaño, el anillo más pequeño es de 3 átomos y los más comunes tienen 5 o 6 átomos. Los heterociclos se clasifican en saturados y no saturados. Los no saturados a su vez pueden ser aromáticos y no aromáticos.

Este trabajo se enfocará en la síntesis de heterociclos derivados del oxazol, específicamente en los derivados de 2-oxazolidinona y en las 2-aminoxazolinas (**Figura 1.5a**). En la siguiente tabla se muestran los heterociclos más comunes de 5 miembros con nitrógeno y oxígeno como heteroátomos (**Figura 1.5b**).

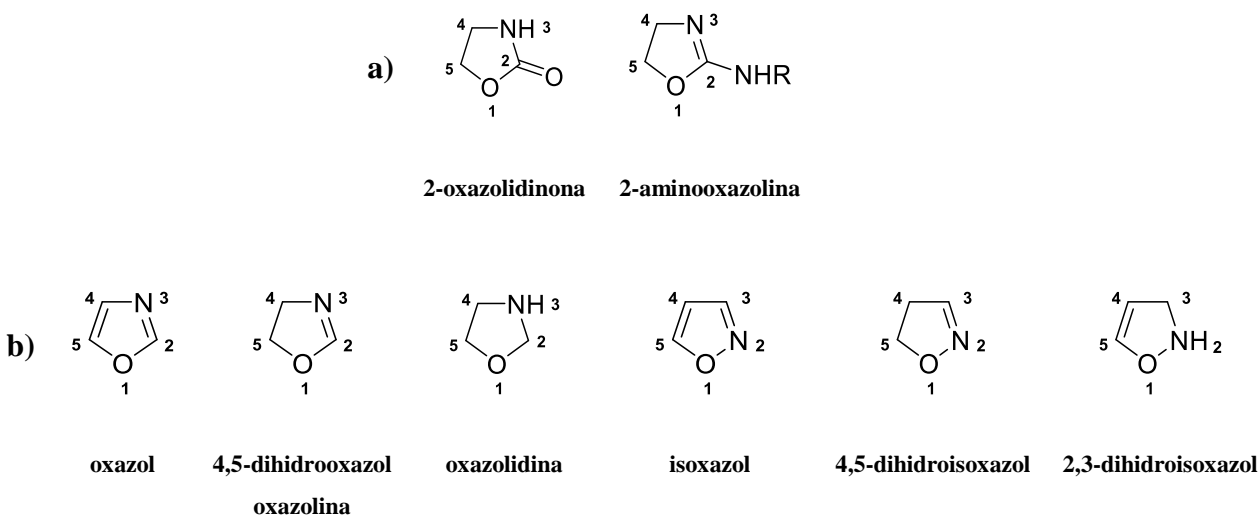
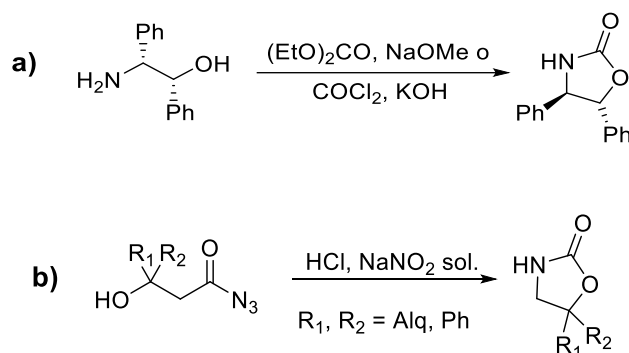


Figura 1.5 a) Anillos de 2-oxazolidinona y 2-aminoxazolinas. b) Heterociclos de 5 miembros con N y O.

1.2.1.1 Síntesis de oxazolidin-2-onas y 2-aminoxazolininas

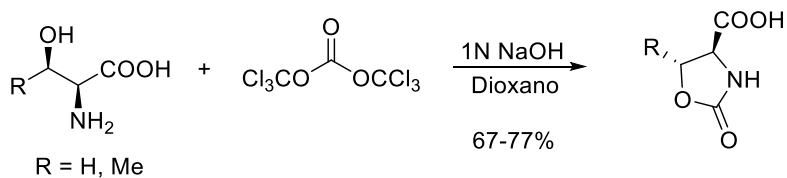
El anillo oxazolidin-2-ona está presente en gran cantidad de compuestos naturales y sintéticos, que generalmente presentan actividad biológica.³¹⁻³³ La importancia de este heterociclo también reside en que sus derivados quirales han sido ampliamente utilizados como auxiliares en una gran variedad de reacciones asimétricas.³⁴

La síntesis de oxazolidin-2-onas se ha realizado mediante diferentes metodologías. Los primeros reportes describen el uso de fosgeno o dietilcarbonato en la ciclación de β-aminoalcoholes (**Esquema 1.1, a**), así como la ciclación de β-hidroxiacilazidas a través de un rearrreglo de Curtius (**Esquema 1.1, b**).^{35,36}



Esquema 1.1 Síntesis de 2-oxazolidinonas **a)** a partir de β-aminoalcoholes, **b)** a partir de β-hidroxiacilazidas.

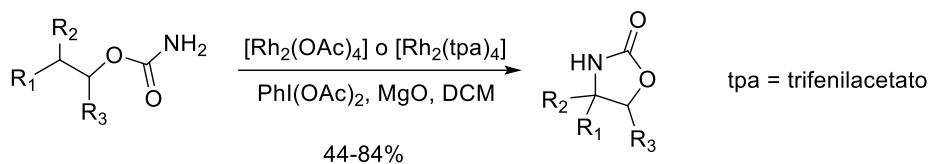
En 1993 Falb *et al.* describieron el uso de trifosgeno en la síntesis de oxazolidin-2-onas. El procedimiento evita el uso de fosgeno como reactivo, además, de acuerdo a su experiencia se obtienen mejores resultados comparados con el uso de 1,1'-carbonildiimidazol. Los derivados fueron preparados a partir de aminoácidos desprotegidos (L-treonina y L-serina) utilizando tiempos de reacción cortos y con rendimientos moderados (**Esquema 1.2**).³⁷



Esquema 1.2 Síntesis de oxazolidin-2-onas quirales a partir de aminoácidos.

Se han reportado muchas metodologías para la síntesis de estos heterociclos utilizando generalmente derivados de β -aminoalcoholes como materias primas y una variedad de reactivos tales como isocianatos, dialquilcarbonatos, alquilcloroformatos, CO_2 , etc.³⁸ Procedimientos más recientes emplean el uso de catalizadores inorgánicos en la síntesis de carbamatos cíclicos.

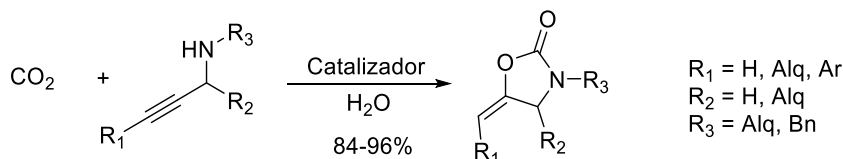
En 2001 Espino y Du Bois³⁹ desarrollaron una metodología para la obtención de oxazolidinonas sustituidas a partir de carbamatos lineales a través de un proceso de inserción de C-H catalizado por Rh. El procedimiento implica el uso de los catalizadores $[\text{Rh}_2(\text{OAc})_4]$ o $[\text{Rh}_2(\text{tpa})_4]$ y del oxidante $\text{PhI}(\text{OAc})_2$. Esta metodología permite obtener carbamatos fusionados cuando \mathbf{R}_1 y \mathbf{R}_3 o \mathbf{R}_2 y \mathbf{R}_3 son átomos que pertenecen a un mismo ciclo, espirocarbamatos cuando \mathbf{R}_1 y \mathbf{R}_2 son átomos que pertenecen a un mismo ciclo, o carbamatos unidos a una cadena alifática o a un sistema aromático (**Esquema 1.3**).



Esquema 1.3 Síntesis de carbamatos cíclicos utilizando catalizadores de rodio.

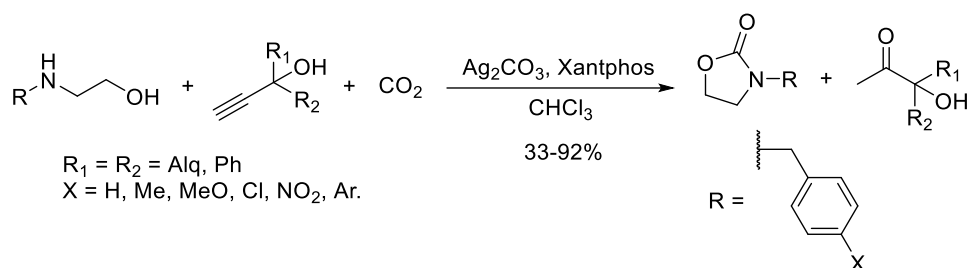
Procedimientos similares utilizando sustratos insaturados y modificando el catalizador y/o el oxidante⁴⁰ condujeron a carbamatos cíclicos fusionados o carbamatos espiro.^{41,42}

Recientemente se ha descrito la síntesis de oxazolidin-2-onas utilizando un catalizador de Au(I) y tetrazolilideno inmovilizado en partículas nanoporosas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{KCC-1}$ (nanosílice fibrosa). La reacción se lleva a cabo entre una amina propargílica y CO_2 (**Esquema 1.4**). El catalizador puede recuperarse con un imán y utilizarse al menos 10 veces más sin disminuir ni su actividad ni su selectividad.⁴³



Esquema 1.4. Síntesis de carbamatos cíclicos a partir de una amina propargílica y CO_2 .

Un procedimiento similar se ha descrito por Song *et al.* En esta metodología se lleva a cabo una reacción de tres componentes: un alcohol propargílico, CO₂ y 2-aminoalcoholes utilizando Ag₂CO₃ como catalizador y el ligando bidentado Xantphos como aditivo (**Esquema 1.5**).⁴⁴ Este procedimiento está limitado al estudio de 2-aminoalcoholes *N*-bencil sustituidos.



Esquema 1.5 Síntesis de carbamatos cíclicos a partir de una reacción de tres componentes.

Las 2-aminoxazolininas son heterociclos con propiedades farmacológicas importantes. De manera natural podemos encontrarlos en los inhibidores de glicosidasas trehazolina (inhibidor de la trehalasa)⁴⁵ y alosamidina (inhibidor de quitinasas)⁴⁶ (**Figura 1.6**). Además, forman parte de la estructura de diversos fármacos tales como el Aminorex (anorético) y la Rilmenidina (hipotensor). Algunos otros derivados han mostrado actividad como antidepresivos⁴⁷ y contra el Alzheimer.⁴⁸

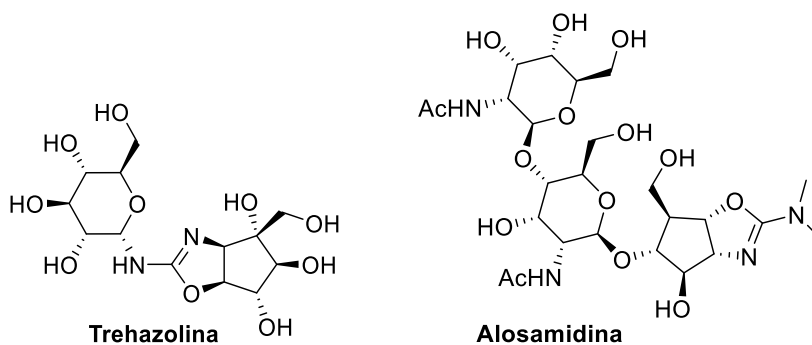
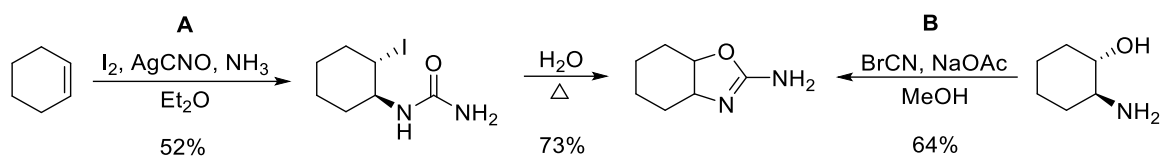


Figura 1.6 Estructura de inhibidores enzimáticos.

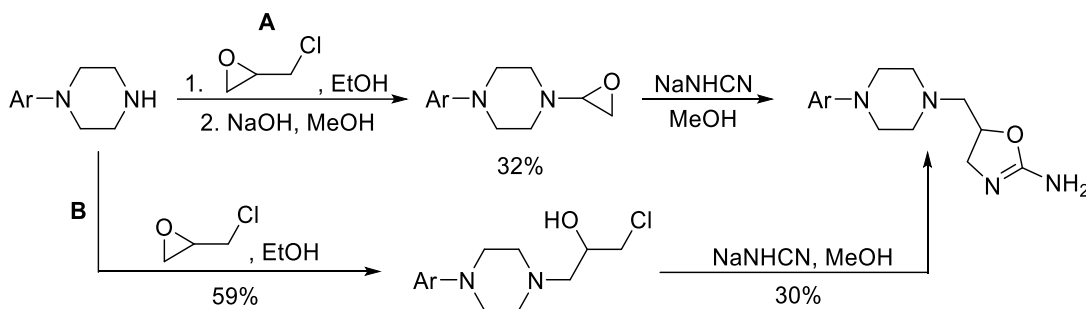
Las primeras síntesis reportan la formación de isoureas cíclicas a partir de la ciclación térmica de ureas o la ciclación de aminoalcoholes utilizando BrCN (**Esquema 1.6**).



Esquema 1.6 Síntesis de 2-aminooxazolininas

El procedimiento **A** permite obtener una fusión *cis* de la isourea con el ciclohexano, mientras que la estereoquímica es *trans* al realizar la metodología **B**.^{49,50} Un procedimiento similar para generar espiroisoureas ha sido reportado recientemente.⁴⁸

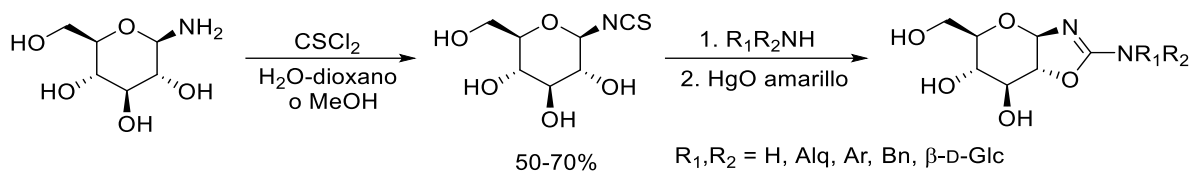
Bosc *et al.* reportaron la síntesis de 2-aminooxazolininas con rendimientos moderados a partir de epóxidos o 2-cloroalcoholes utilizando cianamida monosódica (**Esquema 1.7**). Ambas materias primas se obtuvieron a partir de 1-arylpirazina y epíclorhidrina.⁴⁷



Esquema 1.7 Síntesis de 2-aminooxazolininas a partir de epóxidos (ruta A) o 2-cloroalcoholes (ruta B).

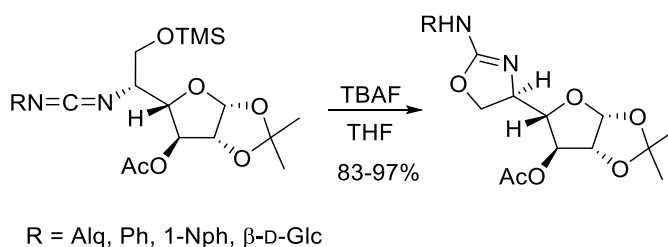
En el 2002 López *et al.* desarrollaron una metodología *one-pot* de tres pasos para la síntesis de isoureas *trans*-fusionadas a partir de β -D-glucopiranosilamina. El procedimiento implica la formación de un isotiocianato seguido de la formación de la tiourea, para finalmente realizar la ciclodesulfuración utilizando HgO amarillo (**Esquema 1.8**); se postuló que la reacción transcurre mediante la formación de una carbodiimida intermedia seguida de ciclación intramolecular del hidroxilo situado en C-2.⁵¹

Basado en esa metodología, años más tarde el mismo grupo describió la preparación de isoureas y guanidinas espiránicas derivadas de carbohidratos.⁵²



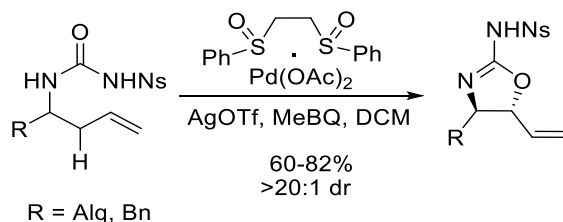
Esquema 1.8 Síntesis *one-pot* de isoureas *trans*-fusionadas.

Posteriormente Aguilar-Moncayo *et al.* describieron la formación de 2-aminoxazolininas derivadas de la D-glucofuranosa mediante la ciclación de alcoholes con carbodiimidas. El procedimiento implica la desprotección de un silil éter utilizando TBAF y la ciclación espontánea del grupo hidroxilo con una carbodiimida en posición β, la cual es fácilmente accesible a partir de la azida. Los rendimientos reportados van del 83 al 97% (**Esquema 1.9**).⁵³



Esquema 1.9 Obtención de isoureas cíclicas a partir de carbodiimidas.

Algunos otros procedimientos implican el uso de catalizadores metálicos en la formación de las 2-aminoxazolininas. En 2013 Strambeanu y White describieron la síntesis estereoselectiva de estos derivados a partir de la ciclación intramolecular de ureas Ns-protegidas en posiciones alílicas utilizando un catalizador de Pd y el ácido de Lewis AgOTf como co-catalizador (**Esquema 1.10**).⁵⁴



Esquema 1.10 Síntesis estereoselectiva de 2-aminoxazolininas.

1.2.2 Selenoderivados

El selenio (Se) es un elemento que fue considerado por muchos años como tóxico y sin ningún beneficio para el ser humano, no fue hasta 1957 cuando Schwarz *et al.* demostraron que el Se es un nutriente esencial en humanos y animales y que su deficiencia provoca un mal funcionamiento del organismo.⁵⁵ Se encuentra presente en una gran cantidad de proteínas (selenoproteínas) que generalmente desempeñan roles enzimáticos catalizando reacciones de oxidación-reducción (oxidoreductasas), en donde el Se forma parte del aminoácido selenocisteína que actúa como sitio activo.

Podemos mencionar como ejemplos de selenoproteínas en mamíferos a las tioredoxina reductasas (TRs), las dehidrogenasas (DIs) y las glutatión peroxidasas (GPxs), estas últimas tienen una importante función en el mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo de las células, catalizando la reducción de especies reactivas de oxígeno dañinas (ROS) tales como los radicales libres y los hidroperóxidos.⁵⁶ Cabe mencionar que no se ha podido establecer la función en el organismo de la mitad de todas las selenoproteínas conocidas.

El Se ha mostrado ser importante en la prevención y tratamiento del cáncer. Las evidencias de la actividad anticancerígena de este micronutriente se han observado de diferentes maneras. En la década de los 60's se demostró una correlación inversa entre la tasa de mortalidad por cáncer y la cantidad de Se presente tanto en cultivos forrajeros como en la sangre humana en diferentes ciudades de los Estados Unidos.^{57,58} Se han realizado además experimentos animales en donde se observa que la administración de compuestos de Se reduce la tumorigénesis,⁵⁹ incluso se han realizado ensayos clínicos para comprobar que la administración de determinadas dosis de Se reduce el riesgo de cáncer en humanos.⁶⁰

Con estos antecedentes, la síntesis de derivados de selenio ha emergido como una herramienta en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anticancerígena. En la bibliografía se han descrito diversos selenoderivados con actividad citotóxica y antiproliferativa en contra de líneas celulares de cáncer.

En 2008 Madhunapantula *et al.* reportaron la síntesis de una bisisosenourea con actividad antiproliferativa contra el melanoma maligno (**Figura 1.7**). El derivado mostró un $IC_{50} = 2.4 \mu M$ actuando como un inhibidor de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), de la vía de señalización de Akt3 y del activador de cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), lo que produjo una inhibición en la proliferación celular y un incremento en la muerte celular por apoptosis. El selenoderivado mostró además reducir tumores en ratones en un 30-50%.⁶¹

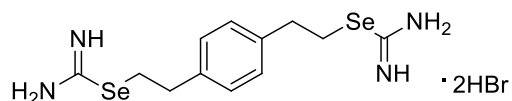


Figura 1.7 Bisisosenourea con actividad contra el melanoma maligno.

Plano *et al.* describieron la síntesis de imidoselenocarbamatos como agentes citotóxicos en las células de cáncer de próstata. El compuesto que tuvo mejores valores ($IC_{50} = 1.8 \mu M$) fue el derivado que posee un *p*-tolil y $R = Me$ (**Figura 1.8**). Además, las pruebas en una línea celular no tumoral de próstata mostraron que los compuestos tienen baja toxicidad con valores de $LD_{50} > 10 \mu M$.²³

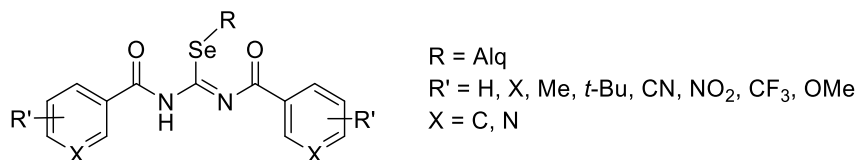


Figura 1.8 Imidoselenocarbamatos con actividad citotóxica.

Recientemente el mismo grupo de investigación describió la síntesis de selenoésteres con actividad citostática contra la línea celular de cáncer de próstata (PC-3) y contra tres líneas celulares tumorales (MCF-7, A-549 y HT-29). Los derivados más potentes mostraron valores de $GI_{50} = 0.009-0.5 \mu M$ y de $LD_{50} > 100 \mu M$ en todas las líneas celulares (**Figura 1.9**).⁶²

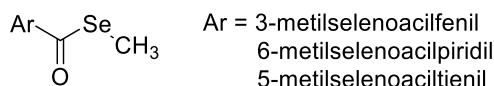


Figura 1.9 Selenoésteres con actividad citostática.

1.3 Objetivos

Objetivo general

- Sintetizar nuevos derivados esteroidales como potenciales agentes antiproliferativos.

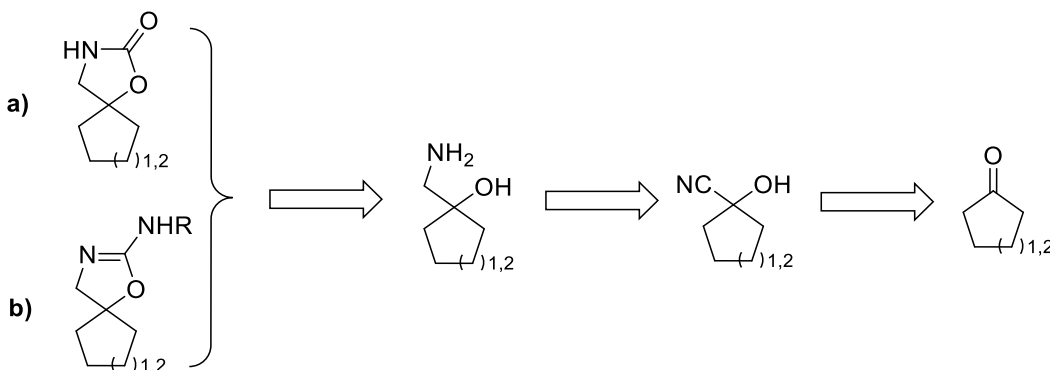
Objetivos particulares

- Sintetizar heterociclos esteroidales que contengan un anillo espiránico de oxazolidin-2-ona (espirocarbamatos) y 2-aminooxazolina (espiroisoureas).
- Sintetizar selenoderivados esteroidales.
- Establecer una metodología efectiva para la síntesis de los espiroheterociclos.
- Obtener los derivados esteroidales con buenos rendimientos y a partir de materias primas fácilmente accesibles.
- Caracterizar los compuestos obtenidos mediante métodos físicos y espectroscópicos.
- Evaluar los derivados sintetizados como agentes antiproliferativos frente a diversas líneas celulares tumorales.
- Evaluar la relación estructura-actividad a partir de los resultados de antiproliferación obtenidos.

1.4 Discusión de resultados

1.4.1 Síntesis de espiroheterociclos

De acuerdo a las diferentes metodologías revisadas para la síntesis de los derivados de tipo espirocarbamato (**a**) y espiroisourea (**b**), se planteó la retrosíntesis mostrada en el **Esquema 1.11**. La retrosíntesis describe la formación de ambos espiroheterociclos a partir de una materia prima en común, los 1,2-aminoalcoholes. Estos derivados pueden provenir de la reducción del nitrilo de una cianohidrina, la cual a su vez provendría de una cetona.



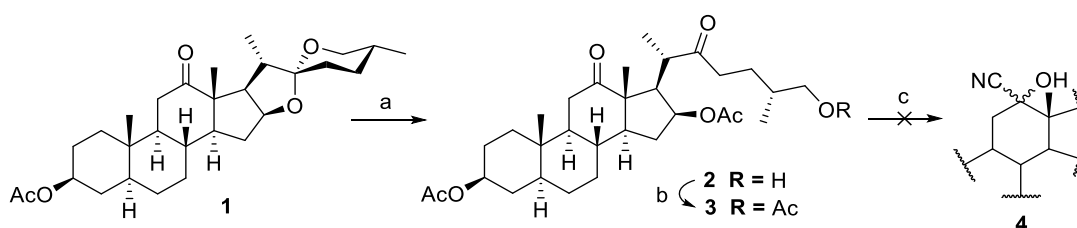
Esquema 1.11 Retrosíntesis de espirocarbamatos y espiroisoureas.

De esta manera, se decidió utilizar a un esteroide que tuviera un grupo carbonilo en su estructura, como es el caso del acetato de hecogenina (**1**), la cual posee el carbonilo en C-12.

En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una metodología para obtener un esqueleto análogo de la aglicona del OSW-1 (un potente agente antiproliferativo),⁶³ y ya que diferentes esteroideos han mostrado actividad interesante al poseer la cadena lateral de esta aglicona,^{25,64} se decidió sintetizar esta estructura a partir del acetato de hecogenina (**1**) y formar los nuevos heterociclos a partir de este derivado.

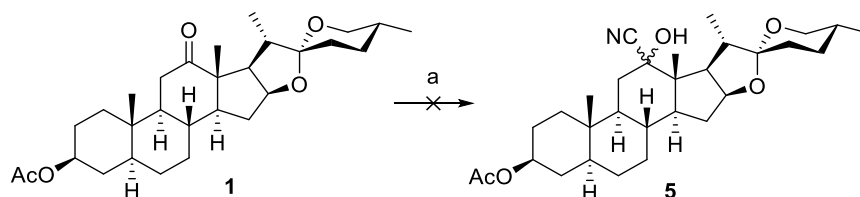
Por lo tanto, se inició con una reacción de acetólisis sobre el acetato de hecogenina (**1**), lo que produjo la cadena lateral deseada sobre el anillo D, aislándose el derivado 26-hidroxilado **2**, el cual fue acetilado para obtener un derivado más estable (**3**). La formación de la cianohidrina se

ensayó mediante condiciones diastereoselectivas con TMSCN e $\text{Ti}(\text{O-}i\text{Pr})_4$ (una modificación de la metodología de Van Nhien *et al.*),⁶⁵ sin embargo, la cianohidrina **4** no se obtuvo a pesar de aumentar los equivalentes de reactivo, del ácido de Lewis, el tiempo y temperatura de reacción (**Esquema 1.12**).



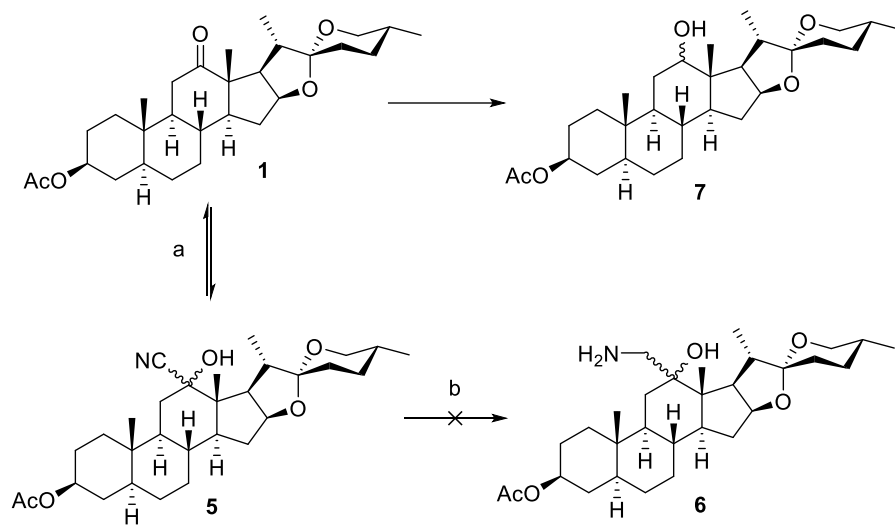
Esquema 1.12 Ensayo para la obtención de la cianohidrina **4** a partir de acetato de hecogenina (**1**). Reactivos: a) Ac_2O , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 ; b) Ac_2O , DMAP, CH_2Cl_2 ; c) TMSCN, $\text{Ti}(\text{O-}i\text{Pr})_4$, MeOH.

Se pensó que la libertad de giro de la cadena lateral podría estar impidiendo la formación de la cianohidrina en C-12 debido al impedimento estérico, por lo que se ensayaron las condiciones de TMSCN e $\text{Ti}(\text{O-}i\text{Pr})_4$ directamente sobre el compuesto **1** sin tener éxito (**Esquema 1.13**).



Esquema 1.13 Ensayo para la obtención de la cianohidrina **5** a partir de acetato de hecogenina (**1**). Reactivos: a) TMSCN, $\text{Ti}(\text{O-}i\text{Pr})_4$, MeOH.

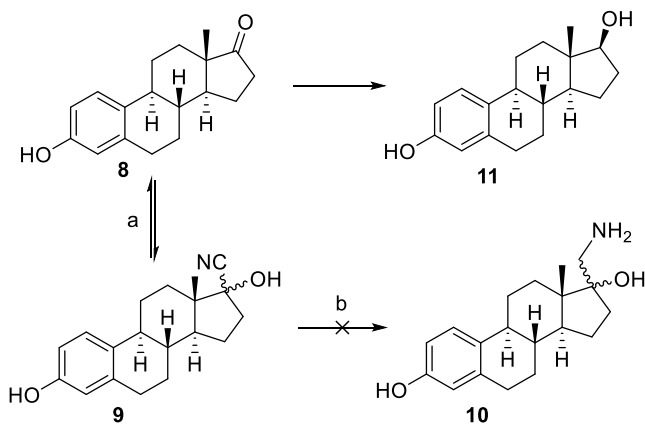
Finalmente se ensayaron las condiciones clásicas para formación de cianohidrinas (KCN y AcOH)⁶⁶ sobre el compuesto **1** obteniendo la mezcla de diastereoisómeros **5** (**Esquema 1.14**). La reacción de reducción del nitrilo **5** se ensayó utilizando LiAlH_4 pero en lugar de obtener los aminoalcoholes **6** se obtuvo la mezcla de alcoholes **7**, obtenidos a partir de la reducción del carbonilo en C-12 del compuesto **1**.



Esquema 1.14 Obtención del derivado **7**. Reactivos: a) KCN, AcOH, EtOH-THF; b) LiAlH₄, K₂CO₃, THF.

Debido a que la formación de cianohidrinas se ha ensayado con éxito en diversos sustratos, se decidió ensayar con otra materia prima como estrona (**8**), la cual posee un carbonilo en C-17. En un primer ensayo, se utilizó la mezcla TMSCN e Ti(O-*i*Pr)₄ para formar la cianohidrina en C-17 pero la reacción no procedió.

El uso de KCN y AcOH condujo a la mezcla de cianohidrinas **9**, pero nuevamente el tratamiento con LiAlH₄ para formar **10** derivó en la reducción estereoselectiva del carbonilo en C-17 de **8** para dar como único producto 17β-estradiol (**11**) (**Esquema 1.15**).

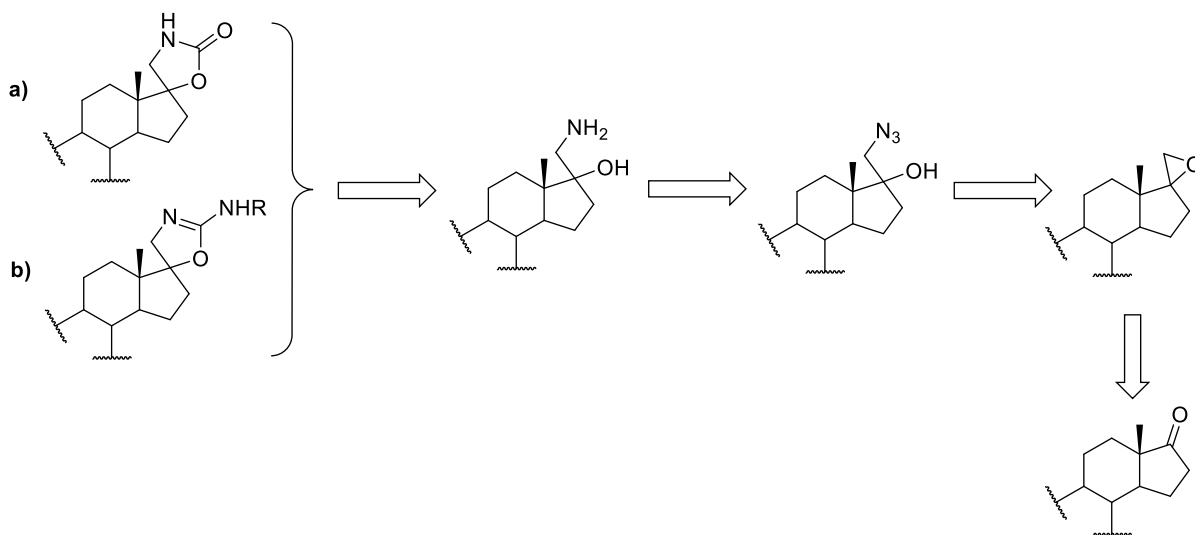


Esquema 1.15 Obtención del derivado **11**. Reactivos: a) KCN, AcOH, EtOH-THF; b) LiAlH₄, K₂CO₃, THF.

Se sabe que la reacción de formación de las cianohidrinas es reversible, con constantes de equilibrio que dependen de efectos estéricos. De manera que, en esta reacción los aldehídos tienen K más grandes que las cetonas alifáticas y éstas a su vez que las cetonas estéricamente impedidas. Además, si la cianohidrina se encuentra en presencia de una solución acuosa básica, el equilibrio se desplazará hacia el carbonilo original, ya que el cianuro es un buen grupo saliente.

Bajo estas condiciones de reacción y con el análisis de los productos obtenidos en ambas reducciones de cianohidrinas (**5** y **9**) se puede concluir que el LiAlH_4 , extrajo el protón ácido del hidroxilo en C-17, pues además de ser un agente reductor es una base muy fuerte. La regeneración del carbonilo y su posterior reducción en el mismo medio generó los alcoholes observados (**7** y **11**).

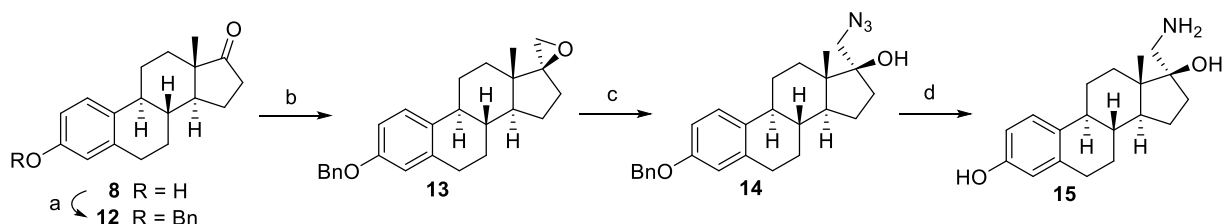
Con los resultados obtenidos, fue necesario proponer una nueva retrosíntesis. Se planteó que el aminoalcohol necesario para la obtención del espirocarbamato (**a**) y las espiroisoureas (**b**) podría provenir de un β -azido alcohol, y este a su vez de la apertura de un epóxido formado a partir del carbonilo en C-17 (**Esquema 1.16**)



Esquema 1.16 Retrosíntesis para la obtención de espirocarbamatos y espiroisoureas en C-17.

1.4.1.1 Síntesis de derivados de estrona

La formación del aminoalcohol derivado de estrona se consiguió mediante la ruta sintética mostrada en el **Esquema 1.17**.



Esquema 1.17 Síntesis del aminoalcohol **15**. Reactivos y condiciones: a) BnBr, K₂CO₃, CH₃CN, reflujo, 8.5 h, 99%; b) SMe₃I, *t*BuOK, DMF, 0°C → t.a., 1 h, 95%; c) NaN₃, H₃BO₃, DMF, reflujo, 4 h, 95%; d) 10% Pd/C, H₂, 1 atm, MeOH-CH₂Cl₂, t. a., 25 h, 86%.

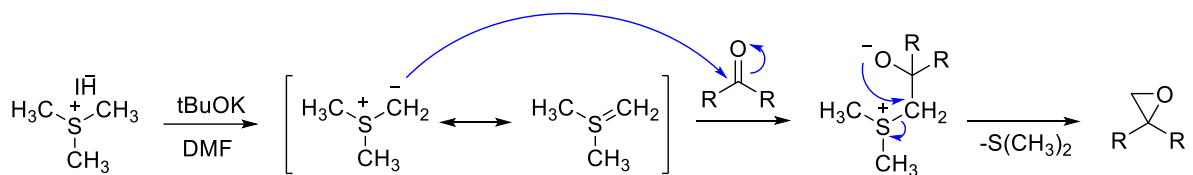
El primer paso en la síntesis de espiroheterociclos fue la protección del alcohol aromático de la estrona (**8**) con un grupo bencilo. Debido a que el hidrógeno del anillo fenólico es muy ácido, el K₂CO₃ es suficientemente básico para extraer el protón y formar el fenolato, el cual reacciona por una S_N2 sobre el BnBr formando el derivado **12**. La reacción de protección es bastante limpia y se obtiene con un rendimiento cuantitativo.

Otras metodologías reportadas en la bibliografía para la protección de la estrona con un grupo bencilo utilizan diferentes bases y/o disolventes.^{67,68}

Las señales observadas en el espectro de RMN de ¹H que evidenciaron la formación de **12** fueron la aparición de señales múltiples a frecuencias altas (7.32-7.46 ppm) pertenecientes a los hidrógenos del anillo aromático y una señal simple en 5.05 ppm perteneciente al metileno del bencilo. De la misma forma, en el espectro de RMN de ¹³C se observaron las señales del grupo aromático de 127.5-137.3 ppm y la señal del metileno del bencilo a 70.0 ppm. Los demás datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.⁶⁹

Posteriormente, la formación del epóxido **13** se obtuvo a través de la reacción de Corey-Chaykovsky en excelente rendimiento y de manera estereoselectiva.

La reacción de Corey-Chaykovsky consiste en el ataque nucleofílico de un iluro de azufre sobre un carbonilo, seguido de una reacción S_N2 intramolecular del oxígeno aniónico sobre el carbono que sostiene el catión sulfonio. En esta reacción el iluro de azufre fue formado *in situ* mediante la reacción de *t*BuOK y SMe₃I (**Esquema 1.18**).



Esquema 1.18 Mecanismo de reacción de Corey-Chaykovsky para formación de epóxidos.

La cristalización del epóxido en una mezcla hexano-AcOEt permitió determinar la configuración absoluta del nuevo carbono quiral (*S*) por medio de difracción de rayos X (Cambridge Crystallographic Data Centre 1561885) (**Figura 1.10**).

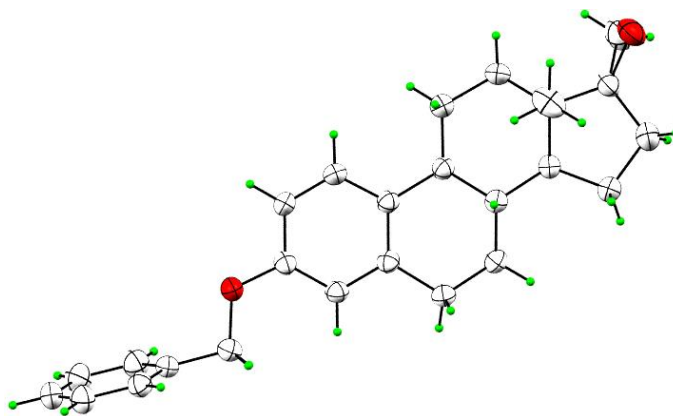


Figura 1.10 Diagrama ORTEP del compuesto **13**, con los elipsoides al 30% de probabilidad.

La RMN de ¹H del compuesto **13** muestra dos señales dobles en 2.66 y 2.98 ppm correspondientes a los protones diastereotópicos del oxirano (**Espectro 1**), mientras que el espectro de RMN de ¹³C presenta una nueva señal en 53.8 ppm debida al CH₂ del mismo ciclo. El carbono espiránico C-17 se observa en 70.7 ppm (**Espectro 2**).

La apertura del epóxido para formar el nuevo derivado se llevó a cabo utilizando NaN₃ en presencia de H₃BO₃. La reacción S_N2 se llevó a cabo de manera regioselectiva sobre el carbono

menos impedido del epóxido obteniendo como único producto el compuesto **14**. La reacción se obtuvo de manera limpia y con un rendimiento del 95% (**Esquema 1.17**).

Los espectros de RMN muestran un cambio en el desplazamiento del grupo metileno, ahora unido a la azida, hacia frecuencias más altas (3.32 y 3.62 ppm para ^1H y 58.4 ppm para ^{13}C), así como del C-17 (83.6 ppm) (**Figura 1.11, Espectros 3 y 4**).

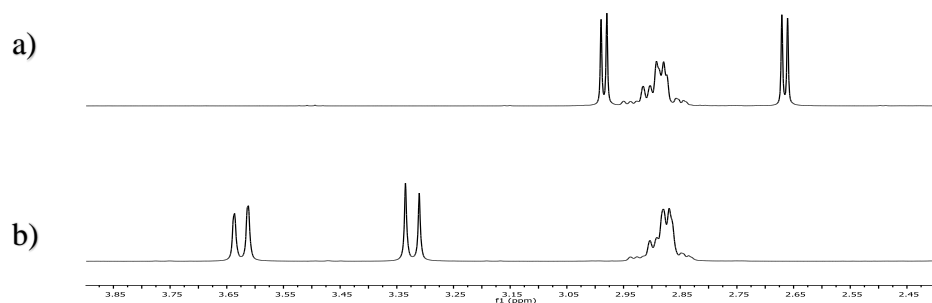


Figura 1.11 Desplazamiento de las señales del CH₂ oxirano (**a**) en el derivado **13** y del CH₂N₃ (**b**) en el compuesto **14**.

La estructura del derivado **14** fue corroborada por difracción de rayos X asignando la configuración del C-17 como *S* (**Figura 1.12**) (Cambridge Crystallographic Data Centre 1561886). Los cristales fueron obtenidos en una mezcla hexano-AcOEt.

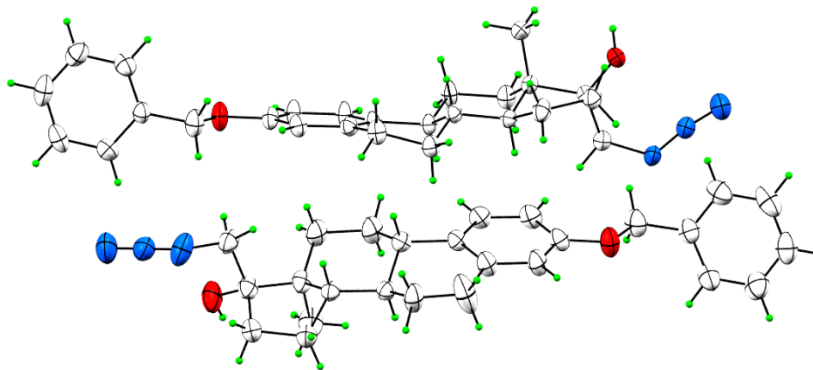


Figura 1.12 Diagrama ORTEP del compuesto **14**, con los elipsoides al 30% de probabilidad.

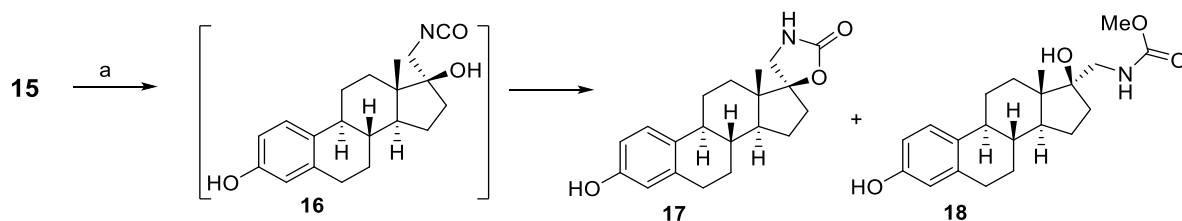
La reducción catalítica del derivado **14** con H₂ y 10% Pd/C a 1 atm, permitió obtener la amina **15** y eliminar el bencilo en la posición C-3. Las reducciones catalíticas generalmente proceden de forma limpia, por lo que la purificación del compuesto consistió en filtrar el crudo de reacción

sobre Celita® para remover el catalizador, precipitar el sólido de la mezcla y posteriormente lavarlo con éter etílico frío para remover las impurezas menos polares.

La RMN de ^1H y ^{13}C muestra algunos cambios en el desplazamiento del grupo metileno con respecto al derivado **14**. A pesar de que los protones del metileno unido a la amina son diastereotópicos podemos observarlos como una señal simple que integra para 2 protones en 3.04 ppm (**Espectro 5**), lo que permite pensar que tienen el mismo ambiente electrónico. El carbono del CH_2NH_2 por su parte se observa a 46.7 ppm (**Espectro 6**), mientras que el C-17 (81.9 ppm) no muestra un cambio significativo en su desplazamiento. Los derivados **12** al **15** han sido previamente descritos en la bibliografía, obtenidos mediante condiciones de reacción diferentes.⁷⁰

1.4.1.1.1 Síntesis del anillo espirooxazolidin-2-ona

Una vez obtenido el aminoalcohol **15** se utilizó en dos rutas sintéticas para obtener los espiroheterociclos. En esta primera ruta el derivado **15** se trató con trifosgeno, como una alternativa segura al fosgeno, en una mezcla MeOH-NaHCO_3 acuoso, lo que permitió obtener el isocianato **16**, no detectado por ccf; tras la ciclación intramolecular espontánea del heterocumuleno con el hidroxilo en C-17 se obtuvo el espirocarbamato **17**. El ataque intermolecular por parte del MeOH hacia el isocianato condujo a la formación del subproducto **18**, el cual se obtuvo en una proporción aproximada de 1:3 con respecto a **17** (**Esquema 1.19**).



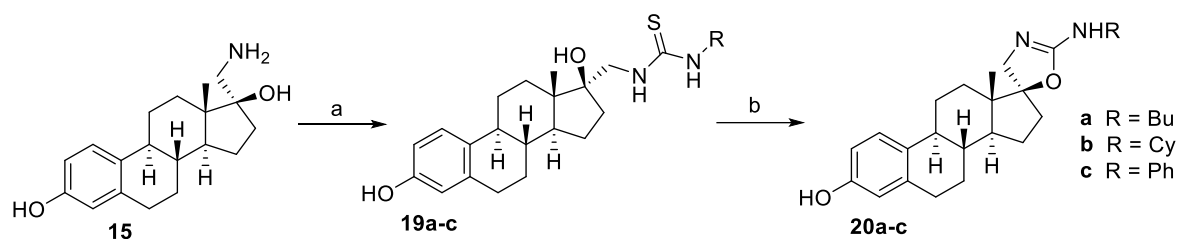
Esquema 1.19 Síntesis del espirocarbamato **17**. Reactivos y condiciones: a) Trifosgeno, MeOH-NaHCO_3 ac., 0°C , 15 min, 57% de **17** y 19% de **18**.

Para evitar la formación del subproducto **18**, se llevó a cabo un ensayo empleando DMF como disolvente, sin embargo, únicamente se observó la formación de una pequeña cantidad del compuesto **17**, ni el cambio de la temperatura o de la base modificaron los resultados. No fue posible ensayar la reacción con otros disolventes debido a la pobre solubilidad de la amina **15**. Tanto el espirocarbamato **17** como el subproducto **18** fueron probados como agentes antiproliferativos.

Los espectros de RMN muestran diferentes señales características de los nuevos derivados. En el espectro de ^1H del espirocarbamato **17** se pueden observar los protones del metileno H-4' como señales dobles en 3.27 y 3.74 ppm (**Espectro 7**). En tanto que el espectro de ^{13}C muestra el carbono C-4' en 49.2 ppm (**Espectro 8**). La señal característica del carbonilo del carbamato (C-2') se observa en 160.4 ppm, mientras que el carbono espiránico C-17 se desplazó a frecuencias más altas con respecto a la amina hacia 92.5 ppm. Por su parte, el derivado **18** presenta las señales de RMN del metileno CH_2NH en 3.18 y 3.36 ppm en el espectro de ^1H (**Espectro 9**) y en 48.2 ppm en el espectro de ^{13}C (**Espectro 10**). La señal del carbonilo del carbamato está presente en 160.3 ppm, mientras que el desplazamiento de C-17 es similar al de los derivados **14** y **15** (84.2 ppm). Finalmente, las señales del OCH_3 se observan en 3.66 y 52.7 ppm en los espectros de ^1H y ^{13}C , respectivamente.

1.4.1.1.2 Síntesis del anillo espiránico 2-aminooxazolina

El aminoalcohol **15** se utilizó también para la formación de las espiroisoureas **20** (**Esquema 1.20**).



Esquema 1.20 Síntesis de las espiroisoureas **20**. Reactivos y condiciones: a) R-NCS, Et_3N , MeOH, t.a. o 45°C , 66-86%; b) HgO, MeOH o THF, t.a., oscuridad, 68-96%.

En primer lugar, el derivado **15** se hizo reaccionar con diferentes isotiocianatos (Bu, Cy, Ph) en presencia de Et₃N para obtener las tioureas **19a-c**.

La tiourea de fenilo (**19c**) se obtuvo de manera rápida, mientras que la de butilo (**19a**) y ciclohexilo (**19b**) necesitaron un aumento en el tiempo o la temperatura de reacción (**Tabla 1.1**). La ccf mostró en todos los casos reacciones muy limpias con las tioureas como producto mayoritario, sin embargo, la purificación de los derivados tuvo que realizarse de manera cuidadosa al existir subproductos con *R_f* muy cercanos. Los derivados **19a** y **19b** mostraron ser inestables en la columna cromatográfica tanto en gel de sílice como en alúmina neutra, por lo que un lavado final del aceite obtenido con CH₂Cl₂ frío permitió obtener las tioureas **19** de manera pura.

Tabla 1.1 Condiciones de reacción de las tioureas **19**.

Compuesto	R	Isotiocianato	Temperatura (°C)	Tiempo	Rendimiento (%)
19a	Bu	1.2 eq	45	4 h	66
19b	Ciclohexilo	1.2 eq	t.a.	22 h	73
19c	Ph	1.2 eq	t.a.	3 h	86

Las señales más importantes de la formación de las tioureas observadas en los espectros de RMN de ¹H y ¹³C son los singuletes anchos pertenecientes a los NH de las tioureas entre 6.72 y 9.11 ppm (**Espectros 11, 13 y 15**), la señal del tiocarbonilo presente entre 181.9 y 184.5 ppm (**Espectros 12, 14 y 16**), así como las señales de los sustituyentes (Bu, Cy, Ph).

La ciclodesulfuración de las tioureas se llevó a cabo mediante el tratamiento con HgO amarillo, bajo Ar y en oscuridad para obtener las espiroisoureas **20a-c** en buenos rendimientos.

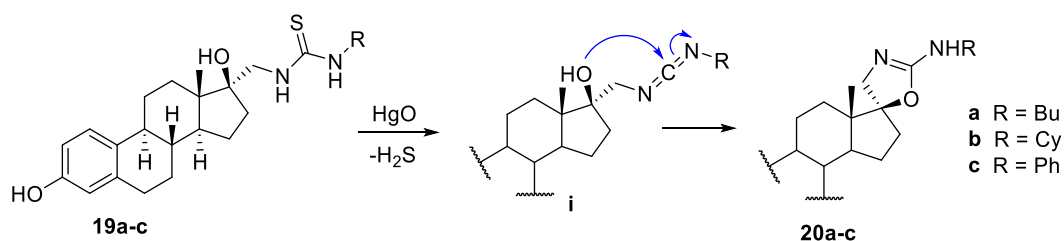
En esta reacción no se detectó algún subproducto que proviniera del uso de MeOH como en el caso del carbamato **18**, por lo que las reacciones se realizaron en MeOH y/o THF de manera indistinta sin afectar los tiempos ni rendimientos de reacción. Al igual que en la reacción de

formación de tioureas, la formación de la espiroisourea de fenilo (**20c**) se llevó a cabo de manera rápida y con menor cantidad de equivalentes de HgO con respecto a las espiroisoureas de butilo (**20a**) y ciclohexilo (**20b**) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Condiciones de reacción de las espiroisoureas **20**.

Compuesto	R	Disolvente	HgO	Temperatura (°C)	Tiempo	Rendimiento (%)
20a	Bu	THF	18 eq	t.a.	96 h	68
20b	Ciclohexilo	MeOH	18 eq	t.a.	168 h	92
20c	Ph	MeOH	9 eq	t.a.	21 h	96
20c	Ph	THF	9 eq	t.a.	16 h	93

La formación de las espiroisoureas transcurre a través de una carbodiimida intermediaria **i** inducida por HgO, el posterior ataque nucleofílico del alcohol en C-17 conduciría a la formación de los derivados **20** (Esquema 1.21). En la bibliografía se ha reportado la presencia de una carbodiimida detectada por cef en la formación de ureas a partir de glicopiranosil tioureas, en donde la reacción de desulfuración con HgO fue el paso clave.⁷¹



Esquema 1.21 Mecanismo de formación de las espiroisoureas **20a-c**.

La purificación de las espiroisoureas se llevó a cabo por cromatografía en columna de manera cuidadosa utilizando mezclas de CH₂Cl₂-MeOH o CH₂Cl₂-Isopropanol. La polaridad de los derivados y la existencia de pequeños subproductos con R_f cercanos dificultó el completo aislamiento, por lo que un lavado final de los aceites obtenidos con éter etílico frío permitió

obtener los espirociclos **20** de manera pura. La dificultad en la purificación se vio reflejada especialmente en el derivado **20a**, pues a pesar de observar la completa desaparición de la materia prima y la formación del nuevo producto como producto casi exclusivo, el rendimiento disminuyó hasta el 68%.

Las evidencias de la formación de estos derivados observadas en el espectro de RMN de ^{13}C son la desaparición de la señal del tiocarbonilo alrededor de 180 ppm, así como la aparición de una señal cercana a 160 ppm correspondiente al carbono vinílico C-2' del heterociclo. Se observa también el desplazamiento del C-4' alrededor de 60 ppm (**Figura 1.13, espectros 18, 20 y 22**).

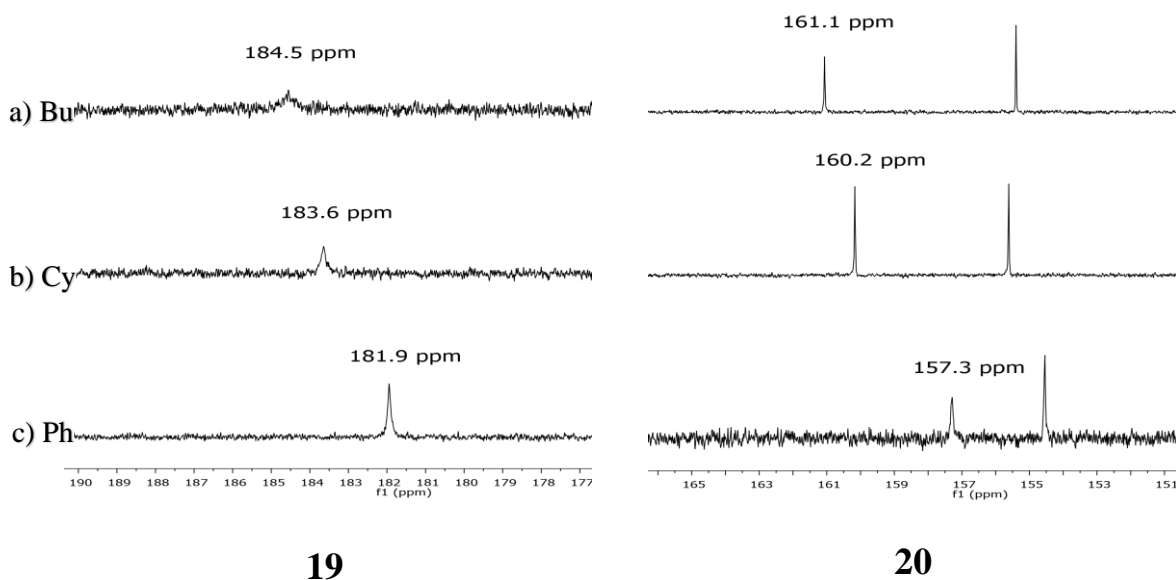
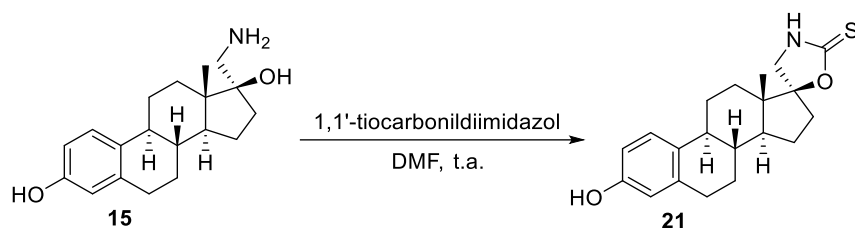


Figura 1.13 Desplazamiento de las señales del C=S en tioureas **19** y del C-2' en las espiroisoureas **20**.

Por su parte, los espectros de ^1H muestran los protones diastereotópicos H-4' entre 3.34 y 3.93 ppm, mientras que el protón del NH se observa entre 5.54 y 6.79 ppm (**Espectros 17, 19 y 21**). La espectrometría de masas confirmó la formación de los derivados **20**.

1.4.1.1.3 Síntesis del anillo espirooxazolidina-2-tiona

El aminoalcohol **15** se usó también para sintetizar un anillo de oxazolidina-2-tiona utilizando 1,1'-tiocarbonildiimidazol (**Esquema 1.22**). El compuesto **21** se obtuvo después de 1.5 h a temperatura ambiente junto con un subproducto más polar. La purificación por cromatografía en columna mostró que el espirotiocarbamato se descompone hacia el derivado más polar que no fue identificado, por lo que **21** no pudo aislarse ni caracterizarse.



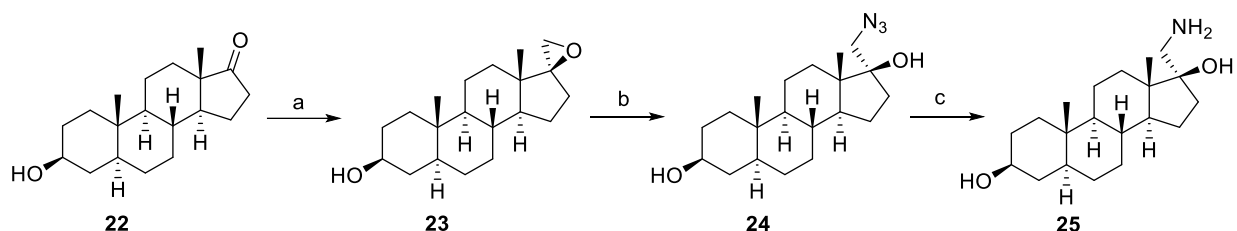
Esquema 1.22 Formación del espirotiocarbamato **21**.

No obstante, el hecho de que el espectro de RMN de ¹³C de **21** muestre una señal en 190.4 ppm característica de un enlace C=S y otra en 100.4 ppm que puede asignarse al C-17, con un desplazamiento químico similar al observado para los carbonos espiránicos de los compuestos sintetizados previamente, permite proponer la estructura de **21**.

1.4.1.2 Síntesis de derivados de *trans*-androsterona

La modificación de la estructura del esteroide, como lo es el cambio en la naturaleza del anillo A, puede tener impacto en los resultados biológicos, lo que proporcionaría información valiosa para la determinación de las relaciones estructura-actividad. De esta manera, al tener las condiciones establecidas para la síntesis de los espiroheterociclos esteroidales, se realizó la síntesis del espirocarbamato y las espiroisoureas sobre el C-17 de *trans*-androsterona (**22**), un esteroide estructuralmente relacionado con estrona (**8**). La ruta sintética utilizada, por lo tanto, es similar a la mostrada en la **Sección 1.4.1.1** para la síntesis de derivados de estrona.

El primer paso en esta síntesis fue la formación del epóxido **23** sobre el C-17 (**Esquema 1.23**). El uso de SMe_3I y $t\text{BuOK}$, tal como se usó en la síntesis del análogo **13**, produjo una reacción lenta que no concluyó después de 7 días de reacción. El cambio de la base por NaH produjo algunos subproductos menos polares derivados probablemente de la reacción del alcoholato formado en C-3, sin embargo, el producto se obtuvo de manera estereoselectiva después de 6 horas de reacción con un rendimiento del 71%. La configuración del nuevo carbono quiral no pudo determinarse en este paso al no obtenerse un cristal del compuesto.



Esquema 1.23 Síntesis del aminoalcohol **25**. Reactivos y condiciones: a) SMe_3I , NaH , DMF , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow$ t. a., 6 h, 71%; b) NaN_3 , H_3BO_3 , DMF , reflujo, 2 h, cuantitativo; c) 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 , 1 atm, $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$, t. a., 3 h, 98%.

La apertura del epóxido, al igual que en el análogo **14**, se realizó mediante el uso de azida de sodio en presencia de ácido bórico para obtener el derivado **24** de manera cuantitativa y en un tiempo de 2 h a reflujo.

Los desplazamientos en RMN de ^1H (**Espectros 23** y **25**) y ^{13}C (**Espectros 24** y **26**) de las señales más representativas de los derivados **23** y **24** (CH_2 -oxirano, CH_2 -azida, C-17) son similares a las reportadas anteriormente para los derivados de estrona. La configuración absoluta del C-17 fue asignada en el derivado **24** como el diastereoisómero (*S*) con ayuda del experimento de RMN 2D-NOESY. La correlación espacial NOESY se observa de manera clara entre los protones CH_2N_3 y los protones H-12 α y H-16 α , sin embargo, la evidencia de la configuración fue dada por la correlación con el protón H-14 (**Figura 1.14**, **Espectros 27a,b**).

La reducción de la azida se llevó a cabo utilizando 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ en una mezcla $\text{MeOH}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$ por 3 h, obteniendo el derivado **25** con excelente rendimiento y en un tiempo de reacción

corto. El aminoalcohol se precipitó de la solución utilizando AcOEt, posteriormente se lavó el sólido en frío con el mismo disolvente para obtener el aminoalcohol **25** de manera pura.

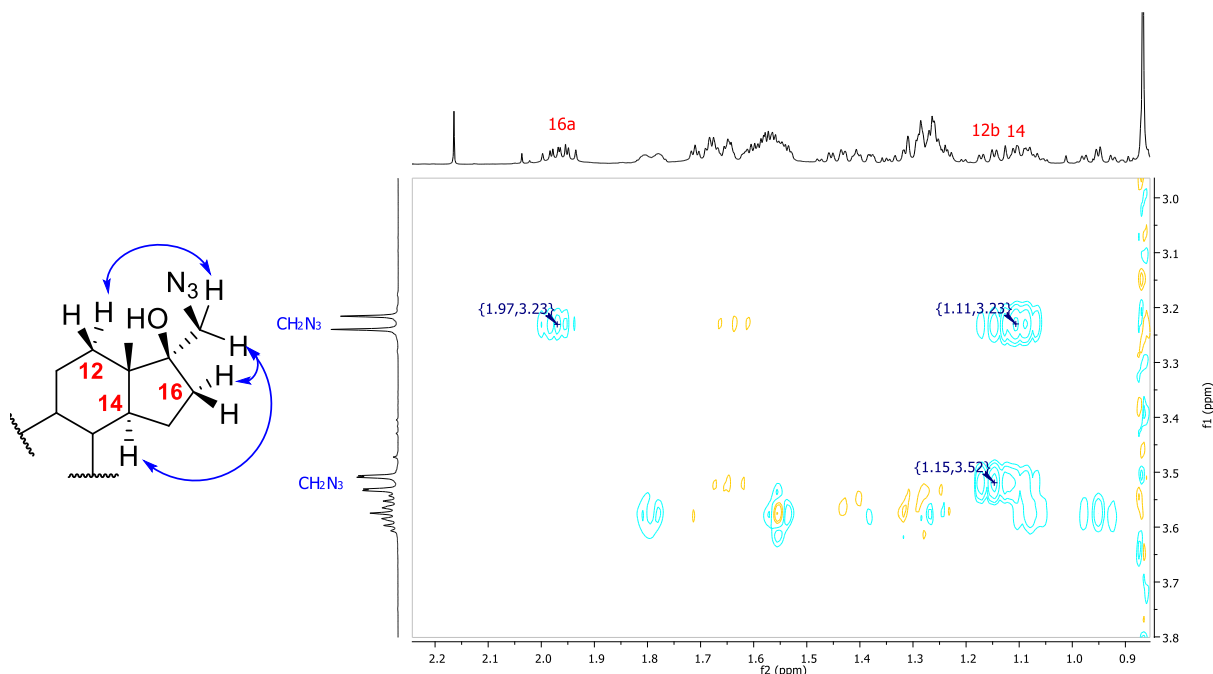
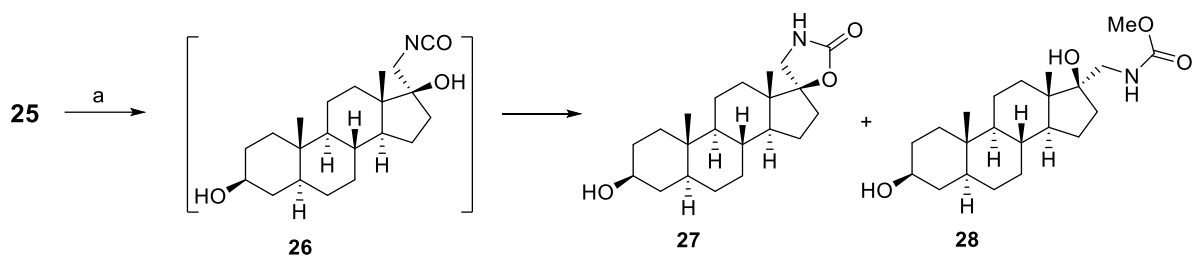


Figura 1.14. Correlaciones NOESY entre los protones CH_2N_3 y los protones H-12ax, H-14 y H-16 α en el derivado **24**.

El espectro de RMN de ^1H (**Espectro 28**) muestra los protones diastereotópicos del $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ como una señal doble y una señal doble de dobles en 2.92 y 2.97 ppm, a diferencia del aminoalcohol de estrona **15**. Los desplazamientos en ^{13}C del mismo grupo y del C-17 tienen desplazamientos similares a los de **15** y aparecen en 46.4 ppm y 81.6 ppm, respectivamente (**Espectro 29**).

1.4.1.2.1 Síntesis del anillo espirooxazolidin-2-ona

El tratamiento del aminoalcohol **25** con trifosgeno se realizó en una mezcla $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2\text{-NaHCO}_3$ acuoso, obteniendo el isocianato **26** no aislado, el cual cicló espontáneamente para dar el espirocarbamato **27** y el subproducto **28** en una relación 2:1 (**Esquema 1.24**).



Esquema 1.24 Síntesis del espirocarbamato de *trans*-androsterona **26**. Reactivos y condiciones: a) Trifosgeno, MeOH-CH₂Cl₂-NaHCO₃ ac., 0°C, 25 min, 52% de **27** y 25% de **28**.

Las señales en los espectros de RMN (**Espectros 30-33**) que muestran la formación de ambos derivados (CH₂NH, C=O, OCH₃) tienen desplazamientos similares a los obtenidos a partir de estrona (**Sección 1.4.1.1**). Por su parte, los espectros de IR de ambos derivados, muestran una señal intensa en 1729 cm⁻¹ o en 1702 cm⁻¹ correspondiente a la vibración de tensión de los grupos carbonilo de los carbamatos **27** y **28** respectivamente (**Figura 1.15**).

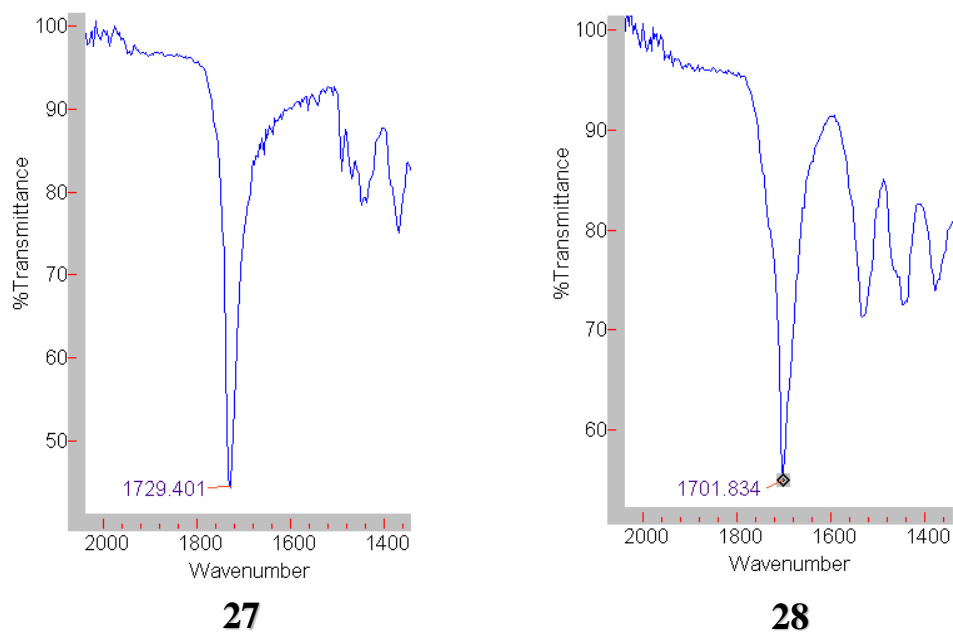
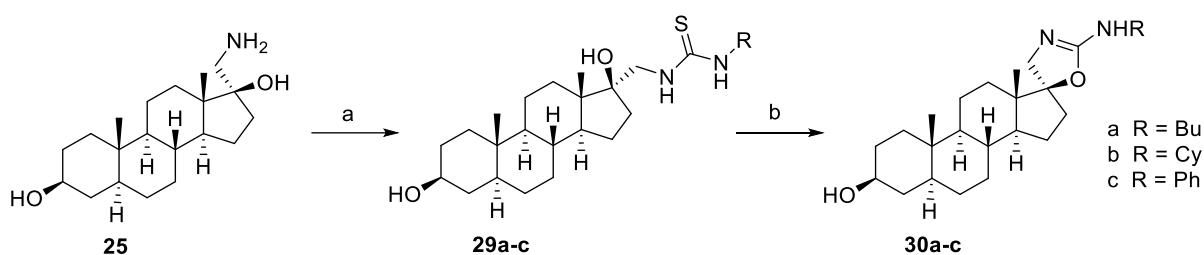


Figura 1.15 Segmentos de los espectros de IR de los derivados **27** y **28**.

1.4.1.2.2 Síntesis del anillo espiránico 2-aminoxazolina

El aminoalcohol **25** fue utilizado también en la formación de las tioureas **29a-c** a partir de su tratamiento con los isotiocianatos de butilo, ciclohexilo y fenilo en presencia de Et₃N (**Esquema 1.25**). A diferencia de las tioureas derivadas de estrona, la purificación de los derivados **29** se realizó de manera sencilla mediante cromatografía en columna obteniendo buenos rendimientos en todos los casos (70-81%). La presencia de la señal correspondiente al tiocarbonilo (cerca a 180 ppm) en RMN de ¹³C confirma los productos deseados (**Espectros 35, 37 y 39**).



Esquema 1.25 Síntesis de las espiroisoureas **30** derivadas de *trans*-androsterona. Reactivos y condiciones: a) R-NCS, Et₃N, MeOH, t.a. o 45 °C, 70-81%; b) HgO, THF, t.a., oscuridad, 93-99%.

La síntesis de las espiroisoureas **30** a partir de las tioureas **29**, se llevó a cabo con tiempos prolongados de reacción utilizando HgO amarillo en oscuridad. La ccf mostró en todos los casos productos muy puros con una pequeña mancha apolar. El derivado **30c** fue purificado fácilmente eluyendo la impureza con CH₂Cl₂ y el producto con una mezcla CH₂Cl₂-Isopropanol obteniendo un excelente rendimiento. Sin embargo, los productos **30a** y **30b** mostraron ser inestables en gel de sílice y alúmina básica, por lo que el sólido obtenido a partir de la filtración del HgO y la evaporación del disolvente, se lavó con hexano varias veces para eliminar el compuesto más apolar. Se obtuvieron los derivados **30a** y **30b** de manera pura y con excelentes rendimientos.

Los espectros de RMN (**Espectros 40-45**) muestran la desaparición de la señal C=S alrededor de 180 ppm y la aparición de la señal C-2' del espiroheterociclo cercana a 160 ppm. Los protones diastereotópicos H-4' se observan entre 3.28 y 3.91 ppm, mientras que el NH se observa entre 4.05 y 4.85 ppm. Los tiempos de reacción y los rendimientos de los derivados **29** y **30** se muestran en la **Tabla 1.3**.

Tabla 1.3 Rendimientos y tiempos de reacción de los derivados **29** y **30**.

Compuesto	R	29		30	
		Tiempo	Rendimiento (%)	Tiempo	Rendimiento (%)
a	Bu	72 h	74	144 h	99
b	Ciclohexilo	56 h	70	72h	93
c	Ph	0.5 h	81	19 h	97

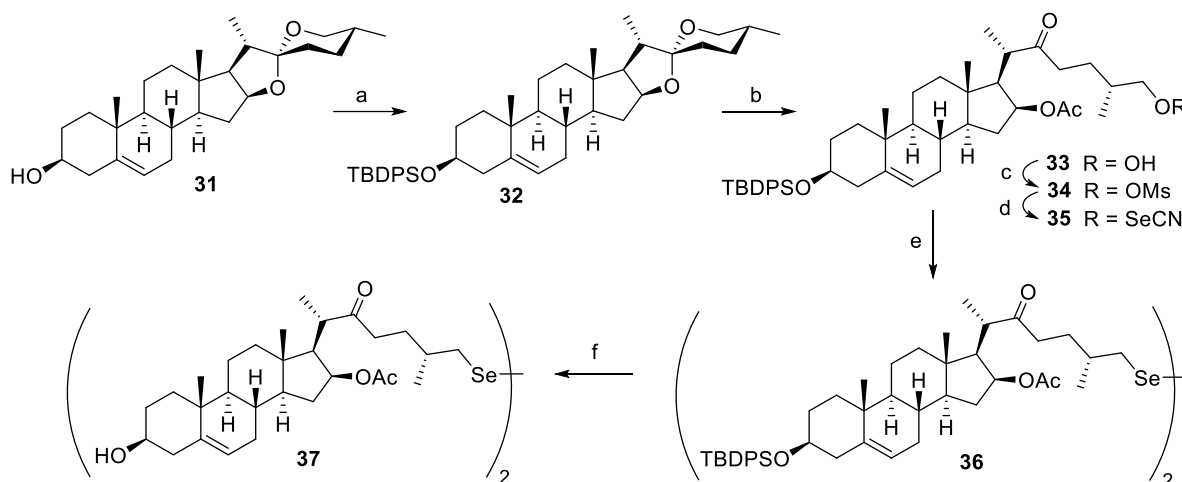
1.4.2 Síntesis de selenoderivados

La síntesis de los derivados de selenio se realizó a partir de diosgenina, un esteroide fácilmente accesible y con propiedades biológicas importantes.⁷²⁻⁷⁴ Se sintetizaron dos selenocianatos y un diselenuro esteroidal, el cual podría tener un efecto interesante debido a la multivalencia (ver **Sección 2.2.2**). Los derivados sintetizados se dividieron en dos grupos, aquellos que poseen una cadena colestánica y los que poseen una cadena 22-oxocolestánica.

1.4.2.1 Síntesis de derivados oxocolestánicos

El primer paso en la síntesis de los derivados oxocolestánicos fue la protección del alcohol secundario en C-3 con un grupo sililado (**Esquema 1.26**). La protección de este alcohol secundario permitió más adelante realizar otras reacciones sin que este alcohol se viera afectado.

El grupo protector que se eligió fue el TBDPS, pues es un grupo que presenta una alta resistencia a diversas condiciones de reacción como las que se realizaron en esta ruta de síntesis (ácidas, básicas y de reducción), mientras que su formación y eliminación se realizan de manera fácil y con buenos rendimientos.⁷⁵ La reacción se llevó a cabo de manera muy limpia y el derivado **32** se obtuvo como único producto y con excelente rendimiento. Los datos físicos y espectroscópicos del derivado obtenido se compararon con los reportados en la bibliografía.⁷⁶



Esquema 1.26 Síntesis del diselenuro **37**. Reactivos y condiciones: a) TBDPSCl, imidazol, DMF, t.a., 20 h, 92%; b) Ac₂O, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, 0 °C, 10 min, 52%; c) MsCl, Et₃N, CH₂Cl₂, 0 °C, 1 h, 90%; d) KSeCN, THF, reflujo, 1 h, oscuridad, 94%; e) NaBH₄, MeOH-THF, t.a., 30 min, 68%; f) TFA-THF-H₂O, t.a., 2 h, 33%.

Como se mencionó anteriormente (**Sección 1.4.1**), la modificación de la cadena lateral sobre el C-17 ha sido importante en nuestro grupo de investigación, pues muchos derivados tanto naturales como sintéticos que poseen esta característica han mostrado actividad biológica interesante. De manera que se decidió sintetizar los primeros selenoderivados con base en esta estructura oxocolestánica.

La transformación de la cadena lateral se realizó a través de una reacción de acetólisis abriendo regioselectivamente los anillos E y F, mediante el uso de anhídrido acético y BF₃·OEt₂, aislando el derivado 26-hidroxilado **33**.

La formación del hidroxilo en C-26 depende fuertemente del tiempo y la temperatura de reacción, un mayor tiempo de reacción produce la acetilación del alcohol, mientras que una mayor temperatura provoca un aumento en la formación de subproductos furostánicos y epoxicolestánicos.⁷⁷

Una metodología descrita recientemente por Sandoval *et al.*⁷⁸, reporta la formación de la cadena 26-hidroxi-22-oxocolestánica a partir de saponinas espirostánicas mediante una metodología de dos pasos y con excelentes rendimientos.

El espectro de RMN de ^1H muestra como señales más representativas de la obtención del derivado **33** un cambio en la señal de los protones H-26. Mientras que en **32** formaban parte del tetrahidropirano F, en el compuesto **33** forman parte de la cadena lateral. En el derivado **32** los H-26 aparecen en 3.46 ppm (H-26ec) y 3.36 ppm (H-26ax) como señales dobles de dobles, mientras que en el derivado **33** aparecen como una señal doble en 3.41 ppm que integra para dos protones (**Figura 1.16**). En el espectro del compuesto **33** se observa además un singulete en 1.95 ppm que integra para 3H y corresponde al metilo del grupo acetato en C-16 (**Espectro 46**).

El espectro de RMN de ^{13}C muestra por su parte, señales en 21.3 y 170.0 ppm que corresponden al metilo y al carbonilo del grupo acetato en C-16, respectivamente (**Espectro 47**).

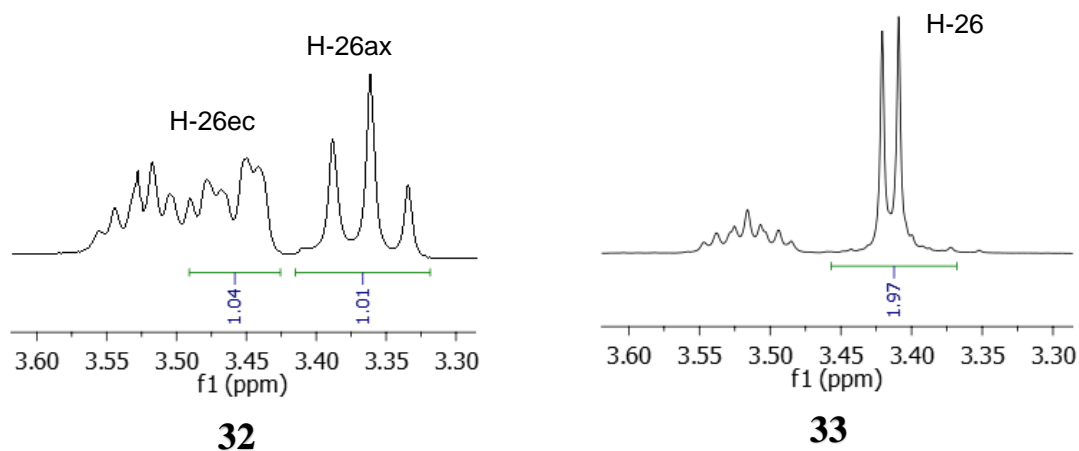
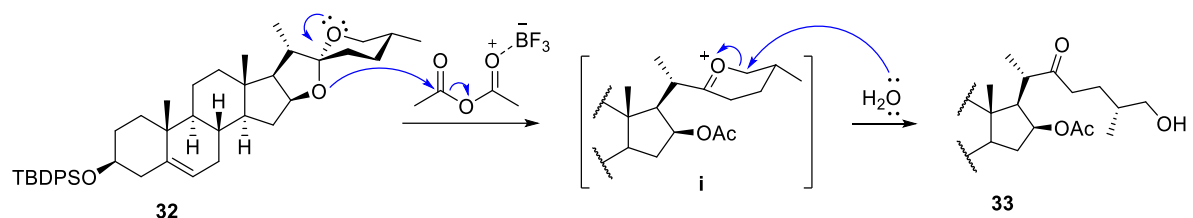


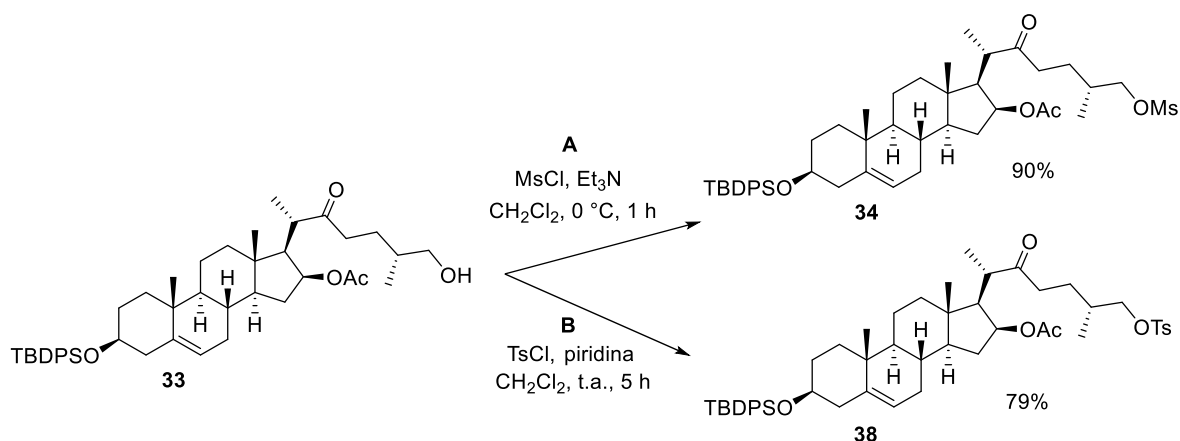
Figura 1.16 Cambio en la forma y desplazamiento de las señales de los protones H-26 en los derivados **32** y **33**.

El mecanismo de formación del derivado **33** había sido controvertido por varios años,^{63,64} creyendo que la apertura del anillo F podía realizarse por dos mecanismos, el ataque del nucleófilo sobre el C-22 en el intermediario **i**, o el ataque nucleofílico sobre el C-26. Sin embargo, de acuerdo a lo reportado recientemente⁷⁸ el mecanismo de formación de la cadena 26-hidroxi-22-oxocolestánica se lleva a cabo por el segundo mecanismo y se presenta en el **Esquema 1.27**.



Esquema 1.27 Mecanismo para la formación del derivado **33**.

El hidroxilo en C-26 del compuesto **33** tuvo que convertirse en un buen grupo saliente para posteriormente poder ser transformado en un grupo derivado de selenio, por lo que el hidroxilo se hizo reaccionar con dos diferentes cloruros de sulfonilo para observar cuál de ellos daba un mejor resultado tanto en su preparación como en el desplazamiento nucleofílico de la siguiente reacción (**Esquema 1.28**).



Esquema 1.28 Formación de los derivados 26-mesilado **34** y 26-tosilado **38** de a partir del compuesto **33**.

En la ruta A, el derivado **33** se trató con MsCl en presencia de Et₃N a 0 °C, lo que condujo a la formación del derivado 26-mesilado **34** de manera rápida y con un rendimiento del 90%. Por otro lado, en la ruta B, el compuesto **33** se trató con TsCl en presencia de piridina a temperatura ambiente por 5 horas, obteniendo el derivado 26-tosilado **38** en 79%.

Ambos compuestos mostraron las señales espectroscópicas representativas del nuevo grupo funcional en el C-26. Los espectros de IR de los derivados, muestran señales que van de 1359-1334 cm⁻¹ y una señal intensa cercana a 1170 cm⁻¹ que corresponden a vibraciones de tensión asimétrica y simétrica del grupo O=S=O, respectivamente (**Figura 1.17**).

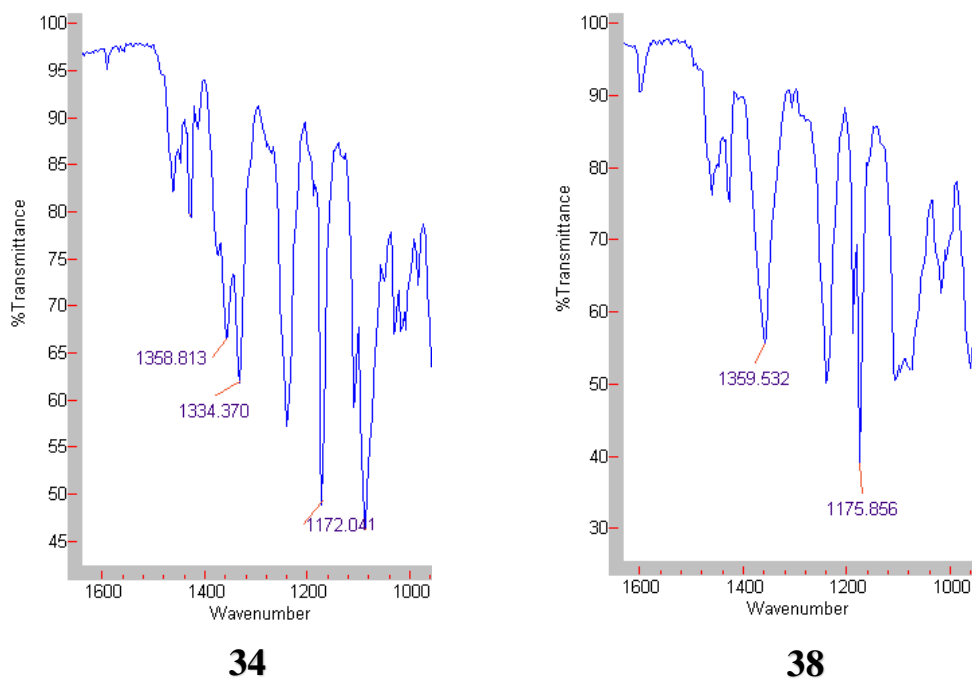
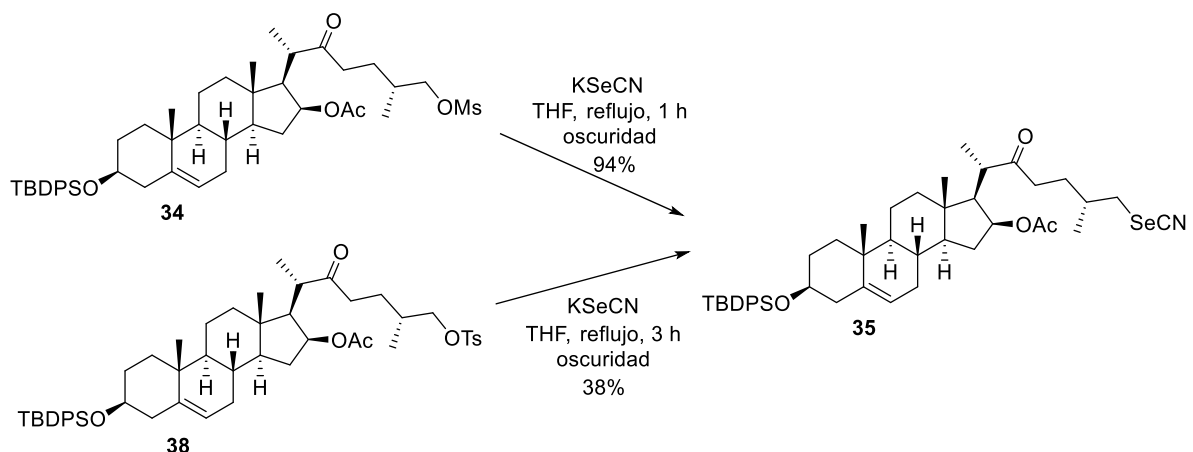


Figura 1.17 Segmentos de los espectros de IR de los derivados **34** y **38**.

Por otro lado, las señales características de la transformación se pueden observar también por RMN. El derivado **34** muestra señales correspondientes al metilo del mesilo en 3.01 ppm y en 37.4 ppm para RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente (**Espectros 48** y **49**). Por su parte, las señales del metilo del tosilo de **38** puede observarse en 2.44 ppm (RMN de ^1H) y 21.8 ppm (RMN de ^{13}C), mientras que las señales correspondientes al anillo aromático están presentes en 7.77 y 7.35 ppm (RMN de ^1H) y en 144.9, 133.0, 130.0 y 128.0 ppm (RMN de ^{13}C) (**Espectros 56** y **57**).

El desplazamiento nucleofílico de los ésteres sulfónicos se realizó utilizando KSeCN en THF a reflujo. Debido a que algunos derivados de selenio son fotosensibles y se descomponen con facilidad formando selenio rojo o negro elemental, las reacciones y el aislamiento de los productos se llevaron a cabo en la oscuridad.

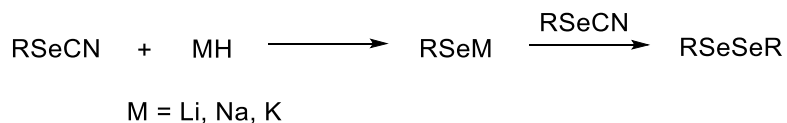
En el **Esquema 1.29** se muestran las condiciones de reacción y los rendimientos para sintetizar el selenocianato **35** a partir de los ésteres sulfónicos.



Esquema 1.29 Síntesis del selenocianato **35** a partir de los derivados **34** y **38**.

Se observa que la reacción a partir del derivado mesilado **34** fue más rápida y se obtuvo en mejor rendimiento que la reacción a partir del tosilo **38**. Ésta última mostró subproductos apolares derivados de la descomposición de la materia prima. Tomando en cuenta los rendimientos de las reacciones previas, el rendimiento del selenocianato **35** desde el derivado **33** fue del 85% y del 30% utilizando como grupos salientes el mesilo y el tosilo, respectivamente. El derivado **35** mostró una señal en el espectro de IR en 2150 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión del grupo $\text{C}\equiv\text{N}$. Por su parte, en el espectro de RMN de ^{13}C se observa una señal en 102.3 ppm correspondiente al carbono del mismo grupo, corroborando de esta manera la obtención del derivado **35** (**Espectro 51**).

La formación del dímero esteroidal se realizó mediante el uso de NaBH_4 en una mezcla MeOH-THF por 30 minutos para obtener el derivado **36** en un 68% de rendimiento. La reducción de selenocianatos con hidruros metálicos produce selenolatos, los cuales reaccionan con otra molécula de selenocianato para formar un diselenuro (**Esquema 1.30**).



Esquema 1.30 Formación de un diselenuro a partir de la reducción de un selenocianato.

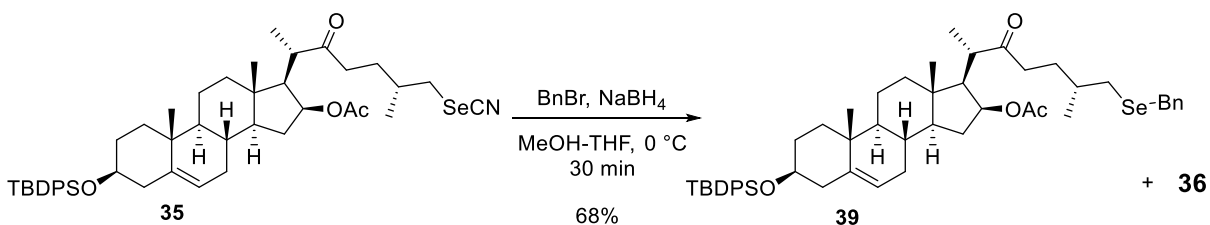
La ausencia de la señal correspondiente al $\text{C}\equiv\text{N}$ tanto en el espectro de IR como en el de RMN

de ^{13}C (**Espectro 53**) confirmó la obtención del diselenuro **36**. Las demás señales de RMN de ^1H y ^{13}C muestran desplazamientos similares a los de la materia prima **35**.

Finalmente, se ensayó la eliminación del grupo protector en la posición C-3 empleando una mezcla TFA-THF- H_2O (3:2:1) a t.a. por 2 horas, obteniendo el diselenuro desprotegido **37**. La formación de diferentes subproductos de reacción que no fueron identificados disminuyó considerablemente el rendimiento de reacción, mientras que pruebas preliminares utilizando otras metodologías tales como TBAF,⁷⁵ HF-py/py, NaOH/EtOH, HCl/MeOH⁷⁹ condujeron a la eliminación del grupo acetato en C-16 o a la formación de otros subproductos.

La ausencia de las señales del grupo protector en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C confirmaron la eliminación del grupo sililado. Se observa la desaparición de las señales pertenecientes a los grupos aromáticos (7.36-7.67 ppm y 127.6-135.9 ppm) y del grupo *tert*-butilo (1.05 ppm, 19.3 ppm y 27.1 ppm) en los **Espectros 54 y 55**.

A partir del selenocianato **35** se formó también el selenuro **39** utilizando BnBr y NaBH_4 a 0°C por 30 minutos. El derivado bencilado se obtuvo en 68% junto con el diselenuro **36** (**Esquema 1.31**). La formación de pequeñas cantidades de subproductos con R_f cercanos al selenuro **39** dificultaron la purificación por cromatografía en columna, mientras que un tiempo prolongado en el gel de sílice descompuso el derivado, de manera que **39** no pudo ser caracterizado completamente ni evaluado en las pruebas biológicas.

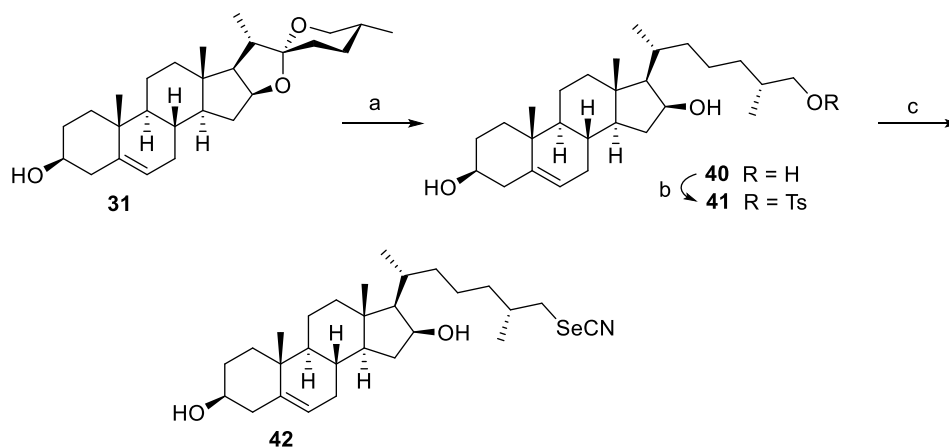


Esquema 1.31 Formación del selenuro **39**.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C muestran una señal en 3.68 y 27.7 ppm correspondiente al CH_2Ph , mientras que los protones aromáticos se observan en 7.11-7.36 y 126.8-139.6 ppm, respectivamente (**Espectros 58 y 59**).

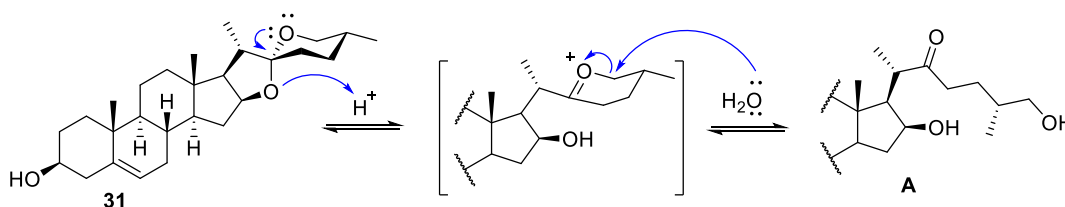
1.4.2.2 Síntesis de derivados colestánicos

Para la síntesis de los derivados colestánicos se realizó una apertura reductiva de los anillos E y F de la diosgenina (**31**) mediante una reducción de Clemmensen, obteniendo el triol **40** (**Esquema 1.32**). El uso de HCl concentrado, tal como se indica en la bibliografía^{80,81} condujo a un bajo rendimiento del triol deseado y a un incremento en la cantidad del subproducto mayoritario de la reacción. Al utilizar HCl a la mitad de su concentración original, como se describe en la metodología descrita por Martin *et al.*⁸² se obtuvo el compuesto **40** en un 70%. El subproducto de reacción fue identificado por este grupo de investigación como un producto de reordenamiento.



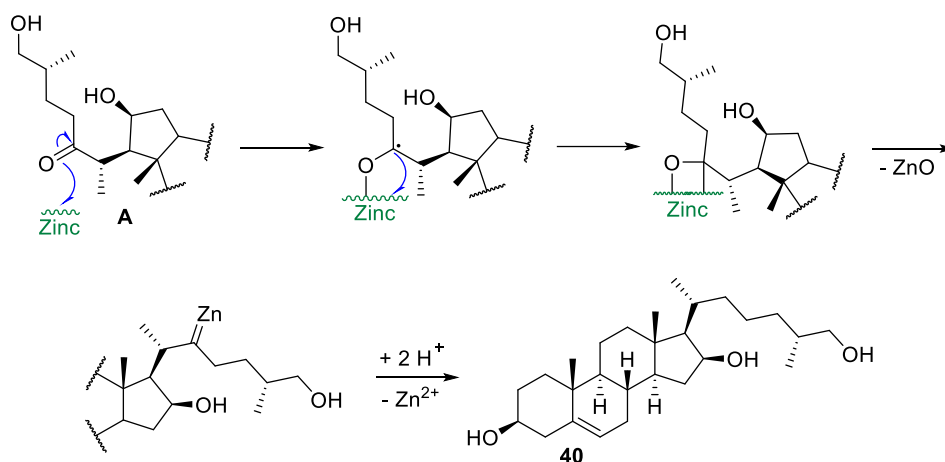
Esquema 1.32 Síntesis del selenocianato **42**. Reactivos y condiciones: a) Zn, HCl, EtOH, reflujo, 0.5 h, 70%; b) TsCl, piridina, t.a., 1 h, 56%; c) KSeCN, THF, reflujo, 9.5 h, 87%.

En un primer paso, la presencia de ácido en el medio de reacción produce la apertura de los anillos E y F dando como resultado el triol **A**, el cual se encuentra en equilibrio con el derivado **31** (**Esquema 1.33**).



Esquema 1.33 Apertura de los anillos E y F en **31**.

Posteriormente, en el segundo paso mediante la reducción de Clemmensen se elimina el carbonilo formado en la posición 22 utilizando zinc como agente reductor. El mecanismo propuesto en la bibliografía para la reducción de Clemmensen se presenta en el **Esquema 1.34** e involucra la formación de intermediarios radicalarios y de especies carbenoides de zinc.⁸³



Esquema 1.34 Mecanismo de la reducción de Clemmensen.

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C mostraron las señales correspondientes a la apertura de los anillos E y F, así como la ausencia de la señal perteneciente al grupo carbonilo y fueron comparados con los reportados en la bibliografía.⁸²

La tosilación del hidroxilo primario se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Poza *et al.*⁸⁴ utilizando TsCl y piridina a temperatura ambiente (**Esquema 1.32**). El tiempo de reacción, sin embargo, se disminuyó a 1 h pues al mantener la reacción por más tiempo se obtenía un porcentaje más alto del producto 3,26-ditosilato. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **41** mostraron las señales características del grupo sulfonilo. Los protones y carbonos aromáticos se observaron en 7.34 y 7.77 ppm como señales dobles que integraron para 2H cada una y en 121.6-144.8 ppm, respectivamente, mientras que los protones y carbono del metilo aromático se observaron en 2.44 y 20.8 ppm, respectivamente. Los espectros fueron comparados con los reportados en la bibliografía.

Finalmente, el derivado **41** se trató con KSeCN en THF anhidro a reflujo, para dar el producto de sustitución **42**. El selenocianato se obtuvo con buen rendimiento después de 9.5 h de agitación

en oscuridad. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C muestran la ausencia de las señales aromáticas descritas previamente, mientras se observa una señal en 102.5 ppm perteneciente al carbono del SeCN (**Espectros 60 y 61**).

1.4.3 Actividad antiproliferativa

Los derivados esteroidales sintetizados fueron evaluados como agentes antiproliferativos siguiendo el protocolo de evaluación del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés).⁸⁵ Los compuestos se evaluaron contra un panel de seis líneas celulares de cáncer humano A549 (pulmón), HBL-100 (mama), HeLa (cervix), SW1573 (pulmón), T-47D (mama) y WiDr (colon). Los resultados se expresan como el 50% de la inhibición del crecimiento (GI_{50}). Los compuestos anticancerígenos: cisplatino (CDDP), etopósido (VP-16) y 5-fluorouracilo (5-FU), así como los esteroides anticancerígenos abiraterona y galaterona se evaluaron también con propósitos de comparación.

1.4.3.1 Actividad en derivados de estrona y *trans*-androsterona

Los resultados de la actividad antiproliferativa de los heterociclos esteroidales obtenidos se presentan en la **Tabla 1.4**. De acuerdo a los valores de GI_{50} obtenidos en la serie de estrona y *trans*-androsterona se pueden deducir algunas relaciones estructura-actividad.

Se observa que todos los derivados evaluados tuvieron actividad contra todas las líneas celulares, excepto el derivado **24**, que resultó inactivo. Los compuestos más potentes en ambas series fueron las 2-aminooxazolininas **20** y **30**, las cuales tuvieron valores de 0.34-4.4 μM , lo cual implica un incremento de actividad de casi 70 veces frente a algunas líneas tumorales con respecto a fármacos de referencia como el CDDP o el VP-16.

Tabla 1.4 Valores de antiproliferación de derivados esteroidales contra líneas celulares de cáncer humano.

Compuesto	GI ₅₀ (μM)						
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr	BJ-hTert
14	13 ± 4.0	22 ± 2.8	2.9 ± 0.4	29 ± 5.3	4.1 ± 0.6	2.4 ± 0.2	
15	39 ± 2.6	34 ± 3.7	27 ± 1.5	43 ± 10	30 ± 0.5	22 ± 2.2	
17	5.4 ± 0.6	6.3 ± 0.5	1.3 ± 0.1	18 ± 4.8	4.4 ± 0.7	9.2 ± 1.7	
18	6.8 ± 0.6	4.0 ± 0.9	3.5 ± 0.2	5.9 ± 0.4	4.3 ± 1.1	4.9 ± 1.0	
19a	4.8 ± 1.8	7.2 ± 2.0	4.2 ± 0.5	15 ± 0.1	3.9 ± 0.5	4.4 ± 0.8	
19b	4.5 ± 1.7	5.1 ± 1.4	3.3 ± 0.6	14 ± 5.7	3.9 ± 0.9	2.8 ± 0.2	
19c	9.8 ± 3.0	15 ± 2.6	6.3 ± 1.8	21 ± 4.8	5.7 ± 2.2	4.5 ± 0.2	
20a	1.4 ± 0.1	2.9 ± 0.4	2.1 ± 0.9	2.2 ± 0.8	0.45 ± 0.1	0.34 ± 0.1	<1
20b	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.2	0.71 ± 0.4	0.34 ± 0.2	<1
20c	2.6 ± 0.2	4.4 ± 0.6	3.3 ± 1.6	3.4 ± 0.7	2.6 ± 0.7	2.6 ± 0.8	1.4 ± 0.6
24	>100	>100	>100	>100	>100	>100	
25	17 ± 2.3	20 ± 1.9	22 ± 4.0	19 ± 4.7	21 ± 0.5	25 ± 3.9	
27	3.7 ± 0.8	10 ± 4.5	4.0 ± 0.6	6.0 ± 3.2	4.5 ± 1.6	3.8 ± 1.9	<1
28	38 ± 8.2	99 ± 1.3	70 ± 27	92 ± 9.5	41 ± 3.8	39 ± 13	
29a	12 ± 1.5	13 ± 2.5	14 ± 2.1	9.4 ± 2.4	5.8 ± 1.0	4.5 ± 0.8	
29b	16 ± 4.7	18 ± 3.4	21 ± 0.3	15 ± 0.3	18 ± 0.03	18 ± 1.8	
29c	29 ± 3.7	27 ± 5.9	27 ± 7.6	27 ± 6.7	34 ± 5.1	17 ± 6.5	
30a	1.4 ± 0.4	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.87 ± 0.2	<1
30b	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.96 ± 0.2	1.2 ± 0.3
30c	[a]						
CDDP	4.9 ± 0.2	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.5	2.7 ± 0.4	17 ± 3.3	23 ± 4.3	
VP-16	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.3	2.4 ± 0.9	15 ± 1.5	18 ± 4.4	24 ± 2.6	
Abiraterona	95 ± 8.0	>100	7.9 ± 0.5	85 ± 8.9	24 ± 4.5	42 ± 7.7	4.5 ± 1.0
Galaterona	3.9 ± 1.3	10 ± 0.9	5.3 ± 0.4	3.9 ± 0.5	2.1 ± 0.1	2.7 ± 0.2	5.0 ± 1.3

[a] Insoluble bajo las condiciones del ensayo. Los números en negritas indican valores ≤10 μM.

Con respecto al núcleo esteroidal, se puede observar que los derivados de estrona (**14-20**) resultaron ser más potentes que los de *trans*-androsterona (**25-30**). Además, se observa que los rangos de GI₅₀ de los derivados de estrona son más grandes, lo que indica diferente selectividad de las líneas celulares hacia los compuestos. Los derivados de *trans*-androsterona por su parte, muestran rangos pequeños de GI₅₀, lo que indica que las líneas celulares tienen una sensibilidad similar hacia los derivados.

Al tomar en cuenta el sustituyente en la posición C-17, se observa que en ambas series el orden de actividad es: 2-aminoxazolina (**20**, **30**) > espirocarbamato (**17**, **27**) > tiourea (**19**, **29**). Finalmente, al considerar la cadena de las 2-aminoxazolinas, se observa que los sustituyentes butilo (**20a**, **30a**) y ciclohexilo (**20b**, **30b**) son mejores que los que poseen fenilo (**20c**, **30c**). El mismo patrón de actividad se observó en las tioureas **19** y **29** (Figura 1.18).

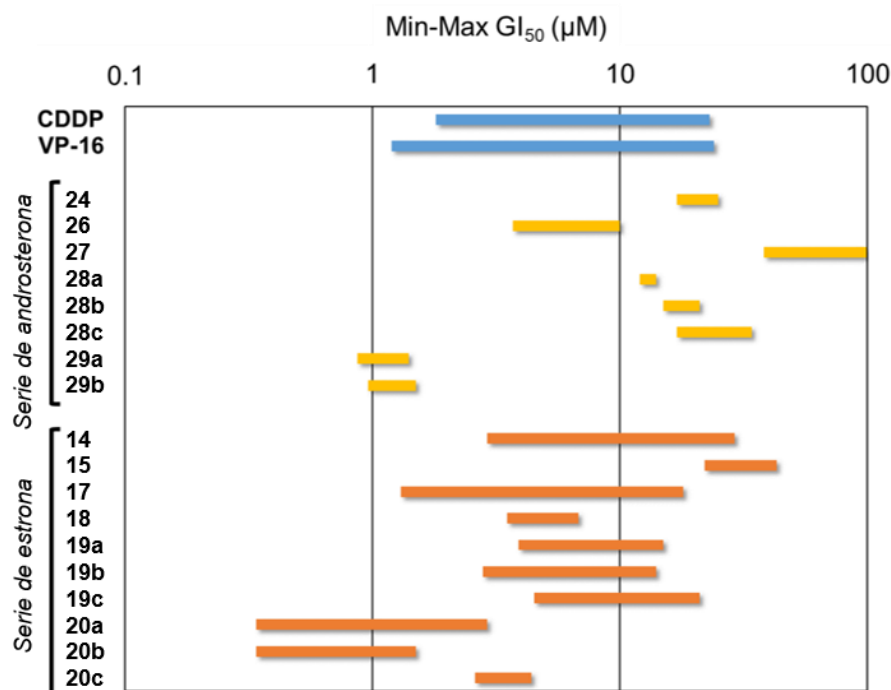


Figura 1.18 Gráfica de rango de GI₅₀ de compuestos evaluados.

Cabe destacar que los compuestos líder (**20a,b**) mostraron ser más potentes contra las líneas celulares resistentes a multifármaco T-47D y WiDr, mostrando valores de 0.34-0.71 µM. Estos resultados se entienden mejor cuando se comparan los valores obtenidos con los valores de los compuestos anticancerígenos de referencia. Los derivados más potentes (**20a-c**, **27**, **30a,b**) también fueron probados en la línea celular no tumoral de fibroblastos humanos BJ-hTert en busca de selectividad. Desafortunadamente la línea celular fue sensible a los compuestos. Este efecto pudo observarse también para los anticancerígenos de referencia, mostrando un resultado más pronunciado en la abiraterona.

1.4.3.2 Actividad en selenoderivados

Los resultados de la evaluación de los selenoderivados, así como de los intermediarios colestánicos como agentes antiproliferativos se presentan en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5 Valores de antiproliferación de selenoderivados esteroidales contra líneas celulares de cáncer humano.

Compuesto	GI ₅₀ (μM)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
33	>100	>100	>100	>100	>100	>100
34	[a]					
35	[a]					
37	>100	>100	53 ± 13	>100	>100	>100
38	79 ± 5.7	99 ± 0.9	41 ± 14	>100	37 ± 13	27 ± 9.4
40	12 ± 0.9	>100	6.3 ± 3.7	25 ± 5.9	1.9 ± 0.8	1.9 ± 1.1
42	1.7 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.5	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.8	5.5 ± 1.4
CDDP	4.9 ± 0.2	1.9 ± 0.2	3.4 ± 0.7	2.0 ± 0.3	15 ± 2.3	26 ± 5.6
5-FU	[b]	5.5 ± 2.3	4.3 ± 1.6	15 ± 4.7	47 ± 18	49 ± 6.7

[a] Insoluble bajo las condiciones del ensayo. [b] No evaluado. Los números en negritas indican valores <10 μM.

De manera general, se observa que los derivados colestánicos **40** y **42** mostraron mejor actividad que los derivados 22-oxocolestánicos (**33**, **37** y **38**), además estos últimos mostraron baja solubilidad en la DMF utilizada en los ensayos. El diselenuro **37** presentó actividad moderada contra la línea celular HeLa (53 μM), mientras que fue inactivo contra las demás líneas celulares.

Por su parte el derivado 26-hidroxilado **33** mostró ser inactivo contra todas las células de cáncer. Al cambiar el grupo hidroxilo por el grupo tosilo se observó que hubo una mejoría en la actividad biológica, pues el derivado **38** mostró actividad moderada contra HeLa, T-47D y WiDr. Por su parte, el triol **40** mostró actividad moderada contra las células de pulmón A549 y SW1573, y buena actividad contra las células HeLa. Además, mostró tener gran selectividad por las células resistentes a multifármaco T-47D y WiDr, mostrando ser 8 y 14 veces más potente que el anticancerígeno CDDP y 25 veces más potente que el 5-FU. Finalmente, el selenocianato **42**, mostró buenos valores de antiproliferación en todas las líneas celulares de

cáncer, con valores de GI_{50} entre 1.7-5.5 μM . De manera interesante, se observa que el derivado **42** tuvo mejores valores de antiproliferación que el 5-FU en todas las líneas celulares, mientras que los valores son similares a los obtenidos para el CDDP.

1.5 Conclusiones

Se sintetizaron 8 nuevos espiroheterociclos (espirocarbamatos y espiroisoureas) esteroidales derivados de estrona y *trans*-androsterona con rendimientos moderados después de 4, 5 o 6 pasos de síntesis.

El espirocarbamato **17** se obtuvo con un rendimiento global del 44%, mientras que las espiroisoureas **20** se obtuvieron con rendimientos del 34% (R = Bu), 52% (R = Cy) y 63% (R = Ph) a partir de estrona (**8**). El espirocarbamato **27** se obtuvo con un rendimiento global del 36% a partir de **22**, mientras que las espiroisoureas **30** se obtuvieron con rendimientos del 51% (R = Bu), 45% (R = Cy) y 55% (R = Ph) a partir de *trans*-androsterona **22**.

Se desarrolló una ruta sintética eficiente para la preparación de espirocarbamatos y espiroisoureas sobre la posición C-17 del esqueleto esteroide, utilizando como intermediario clave un aminoalcohol que puede utilizarse en la síntesis de otros heterociclos.

Se sintetizaron 3 nuevos selenoderivados esteroidales (selenocianatos y diselenuro) con rendimientos del 9-40% a partir de diosgenina (**31**) en 3, 4 o 6 pasos.

Los derivados finales, así como derivados intermedios en las síntesis fueron evaluados como agentes antiproliferativos en contra de 6 líneas celulares tumorales. Los heterociclos más potentes fueron evaluados además en una línea celular no tumoral de fibroblastos humanos, donde no mostraron selectividad.

Todos los heterociclos esteroidales, así como el selenocianato **42** mostraron actividad importante contra todas las líneas celulares. Los derivados más potentes fueron las espiroisoureas de estrona y *trans*-androsterona con valores de 0.34-4.4 μ M.

El análisis de la relación estructura-actividad en los heterociclos esteroidales mostró que los derivados de estrona fueron más potentes que los de *trans*-androsterona, además el orden de actividad de acuerdo al sustituyente en C-17 fue aminooxazolina > espirocarbamato > tiourea.

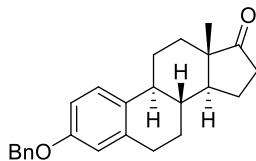
Finalmente, los sustituyentes alquílicos en la cadena de las 2-aminooxazolinas, así como en las tioureas mostraron ser mejores que el sustituyente aromático.

1.6 Desarrollo experimental

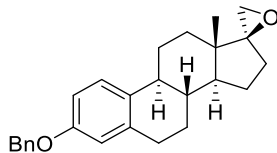
1.6.1. Métodos generales

Los puntos de fusión se determinaron por la técnica de capilar abierto en un aparato de punto de fusión Melt-temp y no fueron corregidos. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Jasco P-2000. Los espectros de IR fueron adquiridos en un espectrofotómetro Nicolet FT-IR 380 ($\bar{\nu}_{\max}$, cm^{-1}). Los espectros de RMN fueron obtenidos en un instrumento Bruker Ascend 500 MHz. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm (δ) y los espectros fueron referenciados de acuerdo al valor de los picos residuales de cada disolvente: CDCl_3 (7.26 y 77.16 ppm), CD_3OD (3.31 y 49.0 ppm) y acetona- d_6 (2.05 y 29.84 ppm) para RMN de ^1H y ^{13}C respectivamente. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). Las señales de RMN de ^1H y ^{13}C fueron asignadas con ayuda de los experimentos de RMN de 1D y 2D (DEPT, COSY, HSQC, HMBC y NOESY). Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron obtenidos por EI, ESI y FAB utilizando un espectrómetro Hewlett Packard 5989 A acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5990 II, y los espectrómetros de masas Micromass AutoSpec-Q y JEOL JMS-700 MStation. La cromatografía en columna se realizó utilizando gel de sílice 60 (malla 230-400) o alúmina neutra grado Brockmann I (malla 150). La ccf se realizó utilizando placas comerciales de gel de sílice 60 F₂₅₄. Para el revelado de las placas se utilizó la radiación con luz ultravioleta de onda corta de 254 nm utilizando una lámpara modelo UVG-54, H_2SO_4 (ac) al 5%, vainillina al 10% en EtOH en presencia de 1% de H_2SO_4 o ninhidrina al 0.1% en EtOH.

1.6.2 Métodos de síntesis, datos físicos y espectroscópicos de los compuestos obtenidos

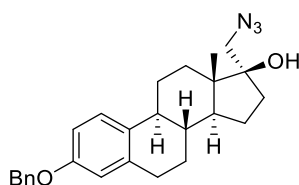


3-O-Bencilestra (12). A una solución de estrona (**8**) (2.00 g, 7.40 mmol) en CH₃CN anhidro (65 mL) se añadió K₂CO₃ (1.57 g, 11.30 mmol) bajo Ar. La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. por 1 h, posteriormente se añadió BnBr (1.1 mL, 9.30 mmol) y se colocó a reflujo por 11.5 h. La reacción se dejó enfriar a t.a., el K₂CO₃ se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se disolvió con AcOEt, se lavó con salmuera (2×20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (8:1 hexano-AcOEt) para obtener el compuesto **12** como un sólido blanco (2.64 g, 99%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.⁶⁹



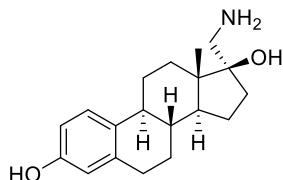
(17S)-Espirop[3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17,2'-oxirano] (13). A una solución del compuesto **12** (0.69 g, 1.92 mmol) en DMF anhidra (16 mL) bajo Ar, se añadieron SMe₃I (0.63 g, 3.10 mmol) y *t*BuOK (0.47 g, 4.24 mmol). La reacción se agitó a 0 °C por 10 min y posteriormente a t.a. por 45 min. Después de este tiempo se añadió agua fría y el producto se extrajo con Et₂O (3×15 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera (3×20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna (19:1 hexano-AcOEt) para obtener el compuesto **13** como cristales blancos (0.68 g, 95%); p.f. 154-156 °C (lit. 155-157 °C)⁷⁰. $[\alpha]_D^{25} +45$ (*c* 0.4, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3027 (C-H aromático), 2919-2862 (C-H alifático), 1602-1495 (C=C), 1233-1016 (C-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (m, 2H, Ar-*Ho*), 7.40 (m, 2H, Ar-*Hm*), 7.34 (m, 1H, Ar-*Hp*), 7.21 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.5 Hz, H-1), 6.80 (dd, 1H, *J*_{2,1} = 8.5 Hz, *J*_{2,4} = 2.7 Hz, H-2), 6.75 (d, 1H, *J*_{4,2} = 2.7 Hz, H-4), 5.05 (s, 2H, CH₂-Ph), 2.98 (d, 1H, *J*_{gem} = 5.1 Hz, CH_{2a} oxirano), 2.90 (m, 2H, H-6), 2.66 (d, 1H, *J*_{gem} = 5.1 Hz, CH_{2b} oxirano), 2.32 (m, 1H, H-11a), 2.24 (m, 1H, H-

9), 2.06 (m, 1H, H-16a), 1.96 (m, 1H, H-7a), 1.87 (m, 1H, H-16b), 1.86 (m, 1H, H-15a), 1.55 (m, 1H, H-12a), 1.53 (m, 1H, H-8), 1.53 (m, 1H, H-15b), 1.52 (m, 1H, H-14), 1.50 (m, 1H, H-11b), 1.40 (m, 1H, H-7b), 1.28 (m, 1H, H-12b), 0.94 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 156.9 (C-3), 138.1 (C-5), 137.4 (Ar-C $_{ipso}$), 132.8 (C-10), 128.7 (x2) (Ar-C $_{m}$), 128.0 (Ar-C $_{p}$), 127.6 (x2) (Ar-C $_{o}$), 126.4 (C-1), 114.9 (C-4), 112.4 (C-2), 70.7 (C-17), 70.0 (CH_2 -Ph), 53.8 (CH_2 oxirano), 51.9 (C-14), 44.0 (C-9), 40.5 (C-13), 39.0 (C-8), 34.0 (C-12), 29.9 (C-6), 29.2 (C-16), 27.3 (C-7), 26.1 (C-11), 23.4 (C-15), 14.4 (C-18). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_2$ ($[\text{M}+1]^+$): 375.2319, observado: 375.2311.

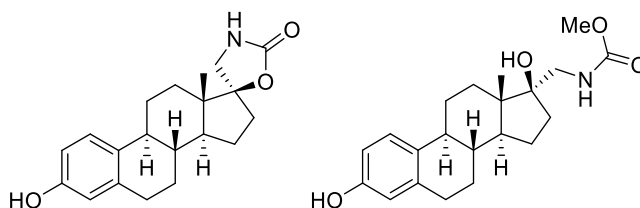


17 α -Azidometil-3-benciloxiestra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (14). A una solución del derivado **13** (1.84 g, 4.90 mmol) en DMF anhidra (50 mL), se añadieron NaN_3 (3.19 g, 49.07 mmol) y H_3BO_3 (1.28 g, 20.70 mmol) bajo Ar. La reacción se colocó a reflujo por 4 h, posteriormente se dejó enfriar y se diluyó con Et_2O (30 mL). La mezcla se lavó con salmuera (4 \times 25 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (19:1 hexano-AcOEt) para dar el compuesto **14** como cristales blancos (1.95 g, 95%); p.f. 92-93 $^\circ\text{C}$ (lit. 96-98 $^\circ\text{C}$)⁷⁰. $[\alpha]_D^{25} +26$ (c 1.0, CHCl_3). IR (cm^{-1}): 3434 (OH), 3020 (C-H aromático), 2928-2865 (C-H alifático), 2093 (N=N=N), 1609-1450 (C=C), 1237-1018 (C-O, C-N). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (m, 2H, Ar-H $_{o}$), 7.41 (m, 2H, Ar-H $_{m}$), 7.35 (m, 1H, Ar-H $_{p}$), 7.22 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.6$ Hz, H-1), 6.82 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.6$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.75 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 5.06 (s, 2H, CH_2 -Ph), 3.62 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, CH_{2a}N_3), 3.32 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, CH_{2b}N_3), 2.89 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.35 (m, 1H, H-11a), 2.19 (m, 1H, H-9), 2.08 (ddd, 1H, $J_{\text{H,H}} = 15.8$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 9.2$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 5.8$ Hz, H-16a), 1.91 (m, 1H, H-7a), 1.78 (dt, 1H, $J_{\text{H,H}} = 12.5$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 3.1$ Hz, H-12a), 1.74 (m, 1H, H-16b), 1.72 (m, 1H, H-15a), 1.55 (m, 1H, H-11b), 1.53 (m, 1H, H-8), 1.45 (m, 1H, H-15b), 1.42 (m, 1H, H-12b), 1.38 (m, 1H, H-14), 1.35 (m, 1H, H-7b), 0.95 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 156.8 (C-3), 138.0 (C-5), 137.3 (Ar-C $_{ipso}$), 132.6 (C-10), 128.6 (x2) (Ar-C $_{m}$), 128.0 (Ar-C $_{p}$), 127.5 (x2) (Ar-C $_{o}$), 126.4 (C-1), 114.8 (C-4), 112.3 (C-2), 83.6 (C-17), 70.0 (CH_2 Ph), 58.4 (CH_2N_3), 50.3 (C-14),

46.2 (C-13), 43.8 (C-9), 39.4 (C-8), 34.8 (C-16), 32.0 (C-12), 29.8 (C-6), 27.5 (C-7), 26.2 (C-11), 23.3 (C-15), 14.2 (C-18). HRESI-MS calculado para $C_{26}H_{31}N_3NaO_2$ ($[M+Na]^+$): 440.2308, observado: 440.2298.



17 α -Aminometilestra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol (15). Una solución del compuesto **14** (0.50 g, 1.21 mmol) en una mezcla 7:3 MeOH-CH₂Cl₂ (30 mL) fue hidrogenada sobre 10% Pd/C (0.25 g) a 1 atm y a t.a. por 25 h. Después de este tiempo el catalizador se filtró sobre Celita® y el filtrado se concentró a sequedad, se disolvió con MeOH y se precipitó con CH₂Cl₂. El compuesto se filtró y se lavó con Et₂O frío para dar el compuesto **15** como un sólido blanco (0.31 g, 86%); p.f. 254 °C (desc) (lit. 242-243 °C)⁷⁰. $[\alpha]_D^{25} +48$ (c 0.3, MeOH). IR (cm⁻¹): 3471 (NH), 3200 (OH), 3060 (C-H aromático), 2920-2860 (C-H alifático), 1614 (NH), 1600-1494 (C=C), 1241-1018 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.07 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H-1), 6.54 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.4$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.48 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 3.04 (s, 2H, CH₂-NH₂), 2.78 (m, 2H, H-6), 2.33 (m, 1H, H-11a), 2.12 (m, 1H, H-9), 1.98 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 14.3$ Hz, $J_{H,H} = 9.2$ Hz, $J_{H,H} = 5.3$ Hz, H-16a), 1.88 (m, 1H, H-7a), 1.78 (m, 1H, H-15a), 1.76 (m, 1H, H-16b), 1.74 (m, 1H, H-12a), 1.49 (m, 1H, H-11b), 1.46 (m, 1H, H-15b), 1.45 (m, 1H, H-8), 1.44 (m, 1H, H-14), 1.40 (m, 1H, H-12b), 1.30 (m, 1H, H-7b), 0.95 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ 156.0 (C-3), 138.7 (C-5), 132.2 (C-10), 127.2 (C-1), 116.1 (C-4), 113.8 (C-2), 81.9 (C-17), 51.1 (C-14), 47.5 (C-13), 46.7 (CH₂-NH₂), 44.9 (C-9), 41.1 (C-8), 33.6 (C-16), 32.6 (C-12), 30.6 (C-6), 28.6 (C-7), 27.4 (C-11), 24.2 (C-15), 14.6 (C-18). HRESI-MS calculado para C₁₉H₂₈NO₂ ($[M+1]^+$): 302.2115, observado: 302.2110.

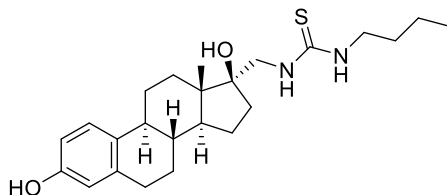


(17S)-2'-Oxo-espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17,5'-oxazolidina] (17) y **metil N-[(3,17β-dihidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17α-il)metil]carbamato (18)**. A una solución del compuesto **15** (0.15 g, 0.51 mmol) en MeOH (20 mL), se añadieron una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (5 mL) y trifosgeno (53 mg, 0.18 mmol) a 0 °C. La suspensión se agitó vigorosamente por 15 min a 0 °C y posteriormente se filtró. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 hexano-AcOEt) para dar los compuestos **17** (96 mg, 57%) y **18** (35 mg, 19%) como sólidos blancos. Compuesto **17**: p.f. 270 °C (desc). $[\alpha]_D^{22} - 2$ ($c = 0.6$, MeOH). IR (cm⁻¹): 3371 (NH), 3259 (OH), 2922-2862 (C-H alifático), 1730 (C=O), 1618-1492 (C=C), 1285-1063 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃) δ 7.07 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H-1), 6.58 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.4$ Hz, $J_{2,4} = 2.1$ Hz, H-2), 6.52 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.1$ Hz, H-4), 3.74 (d, 1H, $J_{4'a,4'b} = 9.3$ Hz, H-4'a), 3.27 (d, 1H, $J_{4'b,4'a} = 9.3$ Hz, H-4'b), 2.78 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.31 (m, 1H, H-11a), 2.27 (m, 1H, H-16a), 2.11 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.2$ Hz, $J_{H,H} = 4.0$ Hz, H-9), 1.90 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 14.8$ Hz, $J_{H,H} = 9.4$ Hz, $J_{H,H} = 5.6$ Hz, H-16b), 1.85 (m, 1H, H-7a), 1.73 (m, 1H, H-15a), 1.69 (m, 1H, H-12a), 1.51 (m, 1H, H-12b), 1.47 (m, 1H, H-11b), 1.43 (m, 1H, H-15b), 1.42 (m, 1H, H-8), 1.28 (m, 1H, H-7b), 1.18 (m, 1H, H-14), 0.94 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD-CDCl₃) δ 160.4 (C-2'), 154.2 (C-3), 137.4 (C-5), 130.5 (C-10), 126.0 (C-1), 114.8 (C-4), 112.4 (C-2), 92.5 (C-17), 49.2 (C-4'), 47.9 (C-14), 45.3 (C-13), 43.1 (C-9), 38.8 (C-8), 34.9 (C-16), 30.7 (C-12), 29.1 (C-6), 26.8 (C-7), 25.6 (C-11), 21.8 (C-15), 13.7 (C-18). HRESI-MS calculado para C₂₀H₂₅NNaO₃ ([M+Na]⁺): 350.1726, observado: 350.1724. Compuesto **18**: p.f. 164-166 °C. $[\alpha]_D^{23} + 49$ ($c 0.5$, MeOH). IR (cm⁻¹): 3292 (OH), 2920-2870 (C-H alifático), 1700 (C=O), 1602-1523 (C=C), 1212-1058 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.07 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H-1), 6.54 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.4$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.48 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.36 (d, 1H, $J_{gem} = 13.6$ Hz, CH_{2a}NH), 3.18 (dd, 1H, $J_{gem} = 13.6$ Hz, $J_{H,H} = 1.1$ Hz, CH_{2b}NH), 2.77 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.29 (m, 1H, H-11a), 2.12 (m, 1H, H-9), 1.91 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 16.1$ Hz, $J_{H,H} = 9.6$ Hz, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, H-16a), 1.87 (m, 1H, H-7a), 1.70 (m, 1H, H-12a), 1.69 (m, 1H, H-15a), 1.59 (m, 1H, H-16b), 1.49 (m,

1H, H-14), 1.48 (m, 1H, H-12b), 1.46 (m, 1H, H-11b), 1.45 (m, 1H, H-8), 1.39 (m, 1H, H-15b), 1.30 (m, 1H, H-7b), 0.91 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) δ 160.3 (C=O), 155.9 (C-3), 138.8 (C-5), 132.5 (C-10), 127.2 (C-1), 116.1 (C-4), 113.7 (C-2), 84.2 (C-17), 52.7 (OCH₃), 51.2 (C-14), 48.2 (CH₂NH), 47.3 (C-13), 45.1 (C-9), 41.2 (C-8), 33.5 (C-16), 32.6 (C-12), 30.7 (C-6), 28.7 (C-7), 27.5 (C-11), 24.2 (C-15), 14.8 (C-18). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NNaO}_4$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 382.1989, observado: 382.1987.

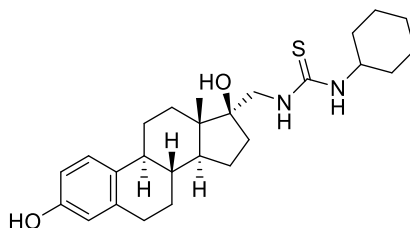
Procedimiento general para la síntesis de tioureas esteroidales **19**

A una solución del compuesto **15** (0.25 g, 0.83 mmol) en MeOH (15 mL) se añadieron el isotiocianato correspondiente (1.0 mmol) y Et_3N (50 μL , 0.36 mmol). La mezcla se agitó durante el tiempo y a la temperatura indicados en cada caso, posteriormente el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna para dar los compuestos **19a-c** como aceites incoloros.



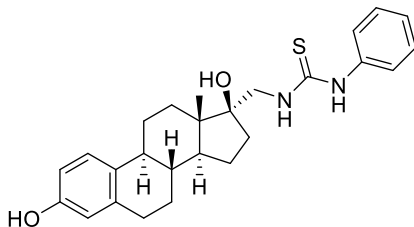
17 α -[(3'-Butiltioureido)methyl]estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol (19a**).** Se utilizó isotiocianato de butilo (0.12 mL) y la reacción se llevó a cabo por 4 h a 45 °C. La cromatografía en columna (hexano \rightarrow 7:3 hexano-AcOEt) permitió obtener el derivado **19a** (0.23 g, 66%). $[\alpha]_D^{20} +34$ (c 0.4, acetona). IR (cm^{-1}): 3286 (OH), 2928-2872 (C-H alifático), 1551-1498 (C-NH), 1250 (C=S), 1215-1024 (C-O, C-N). RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6) δ 7.20 (sa, 1H, NH), 7.04 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H-1), 6.77 (sa, 1H, NH), 6.56 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.4$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.49 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 3.88 (sa, 1H, CH_{2a}NH), 3.49 (sa, 1H, CH_{2b}NH), 3.48 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2.72 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.24 (m, 1H, H-11a), 2.05 (m, 1H, H-9), 1.95 (m, 1H, H-16a), 1.82 (m, 1H, H-7a), 1.65 (m, 1H, H-12a), 1.62 (m, 1H, H-15a), 1.59 (m, 1H, H-16b), 1.51 (m, 2H, NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1.47 (m, 1H, H-14), 1.46 (m, 1H, H-12b), 1.39 (m, 1H, H-8), 1.37 (m,

1H, H-11b), 1.32 (m, 2H, CH₂-CH₃), 1.31 (m, 1H, H-15b), 1.24 (m, 1H, H-7b), 0.88 (s, 3H, H-18), 0.88 (t, 3H, J_{H,H} = 7.4 Hz, CH₂-CH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, acetona-*d*₆) δ 184.5 (C=S), 155.9 (C-3), 138.3 (C-5), 131.9 (C-10), 127.0 (C-1), 115.9 (C-4), 113.5 (C-2), 83.9 (C-17), 51.4 (CH₂NH), 50.5 (C-14), 46.9 (C-13), 44.8 (NH-CH₂-CH₂), 44.5 (C-9), 40.7 (C-8), 34.3 (C-16), 32.3 (C-12), 32.1 (NH-CH₂-CH₂), 30.3 (C-6), 28.3 (C-7), 27.1 (C-11), 24.0 (C-15), 20.7 (CH₂-CH₃), 14.7 (C-18), 14.1 CH₂-CH₃). FAB-MS *m/z* 417 ([M+H]⁺, 36%); HRFAB-MS calculado para C₂₄H₃₇N₂O₂S ([M+H]⁺): 417.2570, observado: 417.2574.



17α-[(3'-Ciclohexiltioureido)methyl]estra-1,3,5(10)-trieno-3,17β-diol (19b). Se utilizó isotiocianato de ciclohexilo (0.14 mL) y la reacción se llevó a cabo por 22 h a t.a. La cromatografía en columna (alúmina, hexano → 4:1 hexano-AcOEt) permitió obtener el derivado **19b** (0.27 g, 73%). [α]_D²⁰ +28 (c 0.1, acetona). IR (cm⁻¹): 3293 (OH), 2930-2855 (C-H alifático), 1609-1449 (C=C), 1546-1498 (C-NH), 1252 (C=S), 1225-1020 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, acetona-*d*₆) δ 7.96 (sa, 1H, NH), 7.05 (d, 1H, J_{1,2} = 8.5 Hz, H-1), 6.72 (sa, 1H, NH), 6.55 (dd, 1H, J_{2,1} = 8.5 Hz, J_{2,4} = 2.6 Hz, H-2), 6.49 (d, 1H, J_{4,2} = 2.6 Hz, H-4), 4.10 (sa, 1H, H-1''), 3.92 (sa, 1H, CH_{2a}NH), 3.47 (d, 1H, J_{gem} = 11.4 Hz, CH_{2b}NH), 2.73 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.25 (m, 1H, H-11a), 2.08 (m, 1H, H-9), 1.96 (m, 2H, H-2''a, H-6''a), 1.95 (m, 1H, H-16a), 1.82 (m, 1H, H-7a), 1.67 (m, 2H, H-3''a, H-5''a), 1.65 (m, 1H, H-12a), 1.63 (m, 1H, H-15a), 1.58 (m, 1H, H-16b), 1.55 (m, 1H, H-4''a), 1.49 (m, 1H, H-12b), 1.49 (m, 1H, H-14), 1.40 (m, 1H, H-8), 1.39 (m, 1H, H-11b), 1.32 (m, 1H, H-15b), 1.31 (m, 2H, H-3''b, H-5''b), 1.26 (m, 1H, H-7b), 1.19 (m, 2H, H-2''b, H-6''b), 1.15 (m, 1H, H-4''b), 0.88 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125.7 MHz, acetona-*d*₆) δ 183.6 (C=S), 155.9 (C-3), 138.4 (C-5), 132.0 (C-10), 127.0 (C-1), 115.9 (C-4), 113.6 (C-2), 84.0 (C-17), 53.3 (C-1''), 51.3 (CH₂NH), 50.6 (C-14), 46.9 (C-13), 44.5 (C-9), 40.7 (C-8), 34.3 (C-16), 33.5 (C-2'' o C-6''), 33.5 (C-2'' o C-6''), 32.3 (C-12), 30.3 (C-6), 28.3 (C-7), 27.1 (C-11), 26.3 (C-4''), 25.6 (x2) (C-3'', C-5''), 24.0 (C-15), 14.7 (C-18). FAB-MS

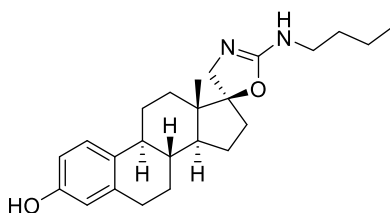
m/z 443 ($[M+H]^+$, 15%); HRFAB-MS calculado para $C_{26}H_{39}N_2O_2S$ ($[M+H]^+$: 443.2727, observado: 443.2709).



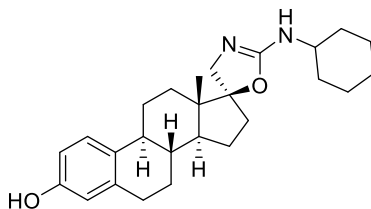
17 α -[(3'-Feniltioureido)metil]estra-1,3,5(10)-trieno-3,17 β -diol (19c). Se utilizó isotiocianato de fenilo (0.12 mL) y la reacción se llevó a cabo por 3 h a t.a. La cromatografía en columna (hexano \rightarrow 7:3 hexano-AcOEt) permitió obtener el derivado **19c** (0.31 g, 86%). $[\alpha]_D^{20} +32$ (c 0.9, acetona). IR (cm^{-1}): 3304 (OH), 2921-2873 (C-H alifático), 1596-1449 (C=C), 1541-1496 (C-NH), 1246 (C=S), 1227-1022 (C-O, C-N). RMN 1H (500 MHz, acetona- d_6) δ 9.11 (sa, 1H, NH), 7.43 (d, 2H, $J_{o,m} = 7.4$ Hz, Ar-Ho), 7.34 (t, 2H, $J_{H,H} = 7.4$ Hz, Ar-Hm), 7.14 (m, 1H, Ar-Hp), 7.11 (sa, 1H, NH), 7.05 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.4$ Hz, H-1), 6.57 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.4$ Hz, $J_{2,4} = 2.6$ Hz, H-2), 6.50 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.6$ Hz, H-4), 4.01 (sa, 1H, $CH_{2a}NH$), 3.58 (dd, 1H, $J_{gem} = 13.3$ Hz, $J_{H,H} = 2.5$ Hz, $CH_{2b}NH$), 2.72 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.25 (m, 1H, H-11a), 2.07 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.4$ Hz, $J_{H,H} = 4.4$ Hz, H-9), 1.96 (m, 1H, H-16a), 1.82 (m, 1H, H-7a), 1.66 (m, 1H, H-15a), 1.65 (m, 1H, H-12a), 1.64 (m, 1H, H-16b), 1.50 (m, 1H, H-14), 1.49 (m, 1H, H-12b), 1.39 (m, 1H, H-8), 1.38 (m, 1H, H-11b), 1.34 (m, 1H, H-15b), 1.26 (m, 1H, H-7b), 0.88 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, acetona- d_6) δ 181.9 (C=S), 155.8 (C-3), 139.3 (Ar-Cipso), 138.3 (C-5), 131.9 (C-10), 130.0 (x2) (Ar-Cm), 127.0 (C-1), 126.0 (Ar-Cp), 124.5 (x2) (Ar-Co), 115.9 (C-4), 113.5 (C-2), 83.7 (C-17), 51.9 (CH_2NH), 50.5 (C-14), 46.9 (C-13), 44.4 (C-9), 40.6 (C-8), 34.5 (C-16), 32.4 (C-12), 30.3 (C-6), 28.2 (C-7), 27.0 (C-11), 23.9 (C-15), 14.6 (C-18). FAB-MS m/z 437 ($[M+H]^+$, 23%); HRFAB-MS calculado para $C_{26}H_{33}N_2O_2S$ ($[M+H]^+$): 437.2257, observado: 437.2241.

Procedimiento general para la síntesis de isoureas espiránicas esteroidales **20**

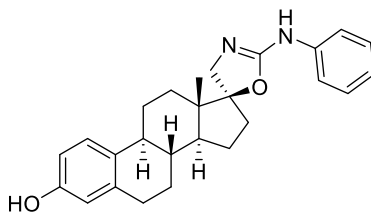
A una solución de la correspondiente tiourea **19** (0.25 mmol) en MeOH o THF anhidros (10 mL) se añadió HgO amarillo (4.50 mmol para los compuestos **19a,b** y 2.25 mmol para el compuesto **19c**) bajo Ar. La mezcla se agitó a t.a. y en oscuridad durante el tiempo indicado en cada caso, se filtró sobre Celita® y se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna y posteriormente se lavó con Et₂O frío para dar los compuestos **20a-c** como aceites incoloros.



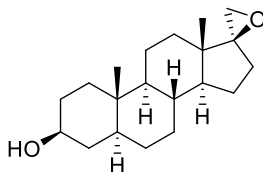
(17S)-2'-n-Butilamino-espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17,5'-oxazolina] (20a). Se utilizó la tiourea **19a** (0.10 g) y la reacción se llevó a cabo por 4 días. La cromatografía en columna (CH₂Cl₂ → 5:1 CH₂Cl₂-MeOH) permitió obtener el derivado **20a** (64 mg, 68%). $[\alpha]_D^{20}$ -10 (*c* 0.4, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3231 (OH), 2928-2867 (C-H alifático), 1654 (C=N), 1600-1449 (C=C), 1242-1060 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.08 (d, 1H, *J*_{1,2} = 8.4 Hz, H-1), 6.79 (sa, 1H, NH), 6.70 (dd, 1H, *J*_{2,1} = 8.4 Hz, *J*_{2,4} = 2.2 Hz, H-2), 6.62 (d, 1H, *J*_{4,2} = 2.2 Hz, H-4), 3.91 (d, 1H, *J*_{4'a,4'b} = 11.7 Hz, H-4'a), 3.42 (d, 1H, *J*_{4'b,4'a} = 11.7 Hz, H-4'b), 3.21 (m, 2H, H-1''), 2.79 (m, 2H, H-6), 2.30 (m, 1H, H-16a), 2.27 (m, 1H, H-11a), 2.04 (m, 1H, H-9), 1.89 (ddd, 1H, *J*_{H,H} = 14.7 Hz, *J*_{H,H} = 9.4 Hz, *J*_{H,H} = 5.6 Hz, H-16b), 1.84 (m, 1H, H-7a), 1.71 (m, 1H, H-15a), 1.58 (m, 1H, H-12a), 1.53 (m, 2H, H-2''), 1.47 (m, 1H, H-12b), 1.46 (m, 1H, H-11b), 1.42 (m, 1H, H-15b), 1.41 (m, 1H, H-8), 1.34 (m, 2H, H-3''), 1.27 (m, 1H, H-7b), 1.09 (m, 1H, H-14), 0.91 (s, 3H, H-18), 0.89 (t, 3H, *J*_{4'',3''} = 7.4 Hz, H-4''). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 161.1 (C-2'), 155.4 (C-3), 137.8 (C-5), 130.5 (C-10), 126.3 (C-1), 115.8 (C-4), 113.3 (C-2), 97.6 (C-17), 57.5 (C-4'), 48.4 (C-14), 45.6 (C-13), 43.5 (C-9), 42.5 (C-1''), 39.2 (C-8), 35.1 (C-16), 31.9 (C-2''), 31.1 (C-12), 29.7 (C-6), 27.3 (C-7), 26.0 (C-11), 22.3 (C-15), 19.9 (C-3''), 14.5 (C-18), 13.8 (C-4''). FAB-MS *m/z* 383 ([M+H]⁺, 80%); HRFAB-MS calculado para C₂₄H₃₅N₂O₂ ([M+1]⁺): 383.2693, observado: 383.2700.



(17S)-2'-Ciclohexilamino-espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17,5'-oxazolina] (20b). Se utilizó la tiourea **19b** (0.11 g) y la reacción se llevó a cabo por 7 días. La cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 20:1 \text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Isopropanol}$) permitió obtener el derivado **20b** (95 mg, 92%). $[\alpha]_D^{20} -19$ (c 0.7, CHCl_3). IR (cm^{-1}): 3284 (OH), 2924-2854 (C-H alifático), 1653 (C=N), 1600-1448 (C=C), 1240-1016 (C-O, C-N). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.10 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1), 6.68 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, $J_{2,4} = 2.2$ Hz, H-2), 6.61 (d, 1H, $J_{4,2} = 2.2$ Hz, H-4), 3.93 (d, 1H, $J_{4'a,4'b} = 12.2$ Hz, H-4'a), 3.41 (d, 1H, $J_{4'b,4'a} = 12.2$ Hz, H-4'b), 3.41 (m, 1H, H-1''), 2.80 (m, 2H, H-6), 2.29 (m, 1H, H-11a), 2.28 (m, 1H, H-16a), 2.10 (td, 1H, $J_{\text{H,H}} = 10.7$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 3.0$ Hz, H-9), 1.97 (m, 2H, H-2''a, H-6''a), 1.86 (m, 1H, H-16b), 1.85 (m, 1H, H-7a), 1.70 (m, 1H, H-15a), 1.67 (m, 2H, H-3''a, H-5''a), 1.59 (m, 1H, H-12a), 1.57 (m, 1H, H-4''a), 1.54 (m, 1H, H-12b), 1.46 (m, 1H, H-11b), 1.42 (m, 1H, H-8), 1.40 (m, 1H, H-15b), 1.29 (m, 3H, H-7b, H-3''b, H-5''b), 1.15 (m, 1H, H-14), 1.13 (m, 3H, H-4''b, H-2''b, H-6''b), 0.92 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 160.2 (C-2'), 155.6 (C-3), 137.8 (C-5), 130.6 (C-10), 126.4 (C-1), 115.9 (C-4), 113.4 (C-2), 96.2 (C-17), 59.7 (C-4'), 51.5 (C-1''), 48.4 (C-14), 45.5 (C-13), 43.6 (C-9), 39.3 (C-8), 35.2 (C-16), 33.7 (C-2'' o C-6''), 33.6 (C-2'' o C-6''), 31.2 (C-12), 29.8 (C-6), 27.3 (C-7), 26.2 (C-11), 25.6 (C-4''), 24.8 (x2) (C-3'', C-5''), 22.3 (C-15), 14.6 (C-18). FAB-MS m/z 409 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 100%); HRFAB-MS calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 409.2850, observado: 409.2813.

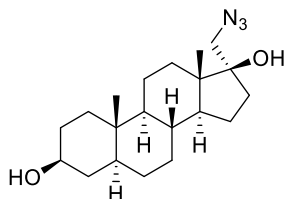


(17S)-2'-Fenilamino-espiro[3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17,5'-oxazolona] (20c). Se utilizó la tiourea **19c** (0.11 g) y la reacción se llevó a cabo por 21 h. La cromatografía en columna ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 20:1 \text{ CH}_2\text{Cl}_2\text{-Isopropanol}$) permitió obtener el derivado **20c** (96 mg, 96%). $[\alpha]_D^{20} +22$ (c 0.2, CHCl_3). IR (cm^{-1}): 3280 (OH), 2923-2871 (C-H alifático), 1656 (C=N), 1592-1447 (C=C), 1224-1062 (C-O, C-N). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.20 (m, 4H, Ar-Ho, Ar-Hm), 7.02 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.5$ Hz, H-1), 6.93 (m, 1H, Ar-Hp), 6.59 (dd, 1H, $J_{2,1} = 8.5$ Hz, $J_{2,4} = 1.9$ Hz, H-2), 6.51 (d, 1H, $J_{4,2} = 1.9$ Hz, H-4), 5.54 (sa, 1H, NH), 3.83 (d, 1H, $J_{4'a,4'b} = 11.0$ Hz, H-4'a), 3.34 (dd, 1H, $J_{4'b,4'a} = 11.0$ Hz, H-4'b), 2.72 (m, 2H, H-6a, H-6b), 2.28 (ddd, 1H, $J_{16a,16b} = 14.8$ Hz, $J_{16a,H} = 12.6$ Hz, $J_{16a,H} = 3.5$, H-16a), 2.21 (m, 1H, H-11a), 2.04 (m, 1H, H-9), 1.84 (ddd, 1H, $J_{16b,16a} = 14.8$ Hz, $J_{16b,H} = 9.4$ Hz, $J_{16b,H} = 5.8$ Hz, H-16b), 1.79 (m, 1H, H-7a), 1.66 (m, 1H, H-15a), 1.62 (m, 1H, H-12a), 1.45 (m, 1H, H-12b), 1.41 (m, 1H, H-11b), 1.37 (m, 2H, H-15b, H-8), 1.23 (m, 2H, H-7b, OH), 1.11 (m, 1H, H-14), 0.90 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 157.3 (C-2'), 154.5 (C-3), 138.0 (C-5), 131.3 (C-10), 129.1 (x3) (Ar-C), 126.5 (C-1), 122.8 (Ar-Cp), 120.5 (x2) (Ar-C), 115.7 (C-4), 113.2 (C-2), 96.4 (C-17), 56.3 (C-4'), 48.7 (C-14), 45.7 (C-13), 43.6 (C-9), 39.2 (C-8), 35.2 (C-16), 31.4 (C-12), 29.7 (C-6), 27.3 (C-7), 26.1 (C-11), 22.4 (C-15), 14.7 (C-18). FAB-MS m/z 403 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 28%); HRFAB-MS calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 403.2380, observado: 403.2376.



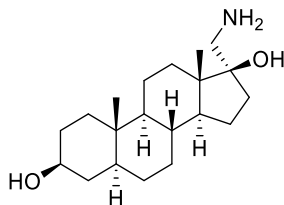
(17S)-Espiros[5 α -androstan-17,2'-oxiran]-3 β -ol (23). A una solución de SMe_3I (2.30 g, 11.27 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se añadió NaH (1.0 g, 25 mmol, 60% en aceite mineral) bajo Ar. La mezcla se agitó por 20 min a t.a., posteriormente se enfrió a 0 °C y se añadió una solución de *trans*-androsterona (**22**) (1.0 g, 3.44 mmol) en DMF anhidra (10 mL). La mezcla se agitó a 0

°C por 15 min y a t.a. por 6 h. Pasado este tiempo, se enfrió a 0 °C y se añadió cuidadosamente MeOH y H₂O, la mezcla se diluyó con AcOEt y se separó la fase orgánica, se lavó con salmuera (4×10 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (9:1 hexano-AcOEt) para dar el derivado **23** como un sólido blanco (0.74 g, 71%); p.f. 165-167 °C. IR (cm⁻¹): 3452 (OH), 2917-2850 (C-H alifático), 1033 (C-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 3.54 (m, 1H, H-3), 2.86 (d, 1H, *J*_{gem} = 5.1 Hz, CH_{2a} oxirano), 2.56 (d, 1H, *J*_{gem} = 5.1 Hz, CH_{2b} oxirano), 1.94 (ddd, 1H, *J*_{H,H} = 14.2 Hz, *J*_{H,H} = 11.7 Hz, *J*_{H,H} = 2.0 Hz, H-16a), 1.76 (m, 1H, H-2a), 1.75 (m, 1H, H-16b), 1.69 (m, 1H, H-7a), 1.67 (m, 1H, H-15a), 1.66 (m, 1H, H-1a), 1.53 (m, 1H, H-4a), 1.52 (m, 1H, H-11a), 1.42 (m, 1H, H-8), 1.36 (m, 1H, H-2b), 1.35 (m, 1H, H-15b), 1.33 (m, 1H, H-12a), 1.25 (m, 3H, H-4b, H-6a, H-6b), 1.23 (m, 1H, H-11b), 1.20 (m, 1H, H-14), 1.07 (m, 1H, H-5), 0.98 (m, 1H, H-12b), 0.92 (m, 1H, H-1b), 0.87 (m, 1H, H-7b), 0.83 (s, 3H, H-18), 0.78 (s, 3H, H-19), 0.62 (ddd, 1H, *J*_{H,H} = 12.3 Hz, *J*_{H,H} = 10.7 Hz, *J*_{H,H} = 4.1 Hz, H-9). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 71.4 (C-3), 70.7 (C-17), 54.5 (C-9), 53.8 (CH₂ oxirano), 53.0 (C-14), 45.0 (C-5), 40.3 (C-13), 38.3 (C-4), 37.1 (C-1), 35.8 (C-8), 35.7 (C-10), 34.1 (C-12), 31.6 (x2) (C-2, C-7), 29.2 (C-16), 28.7 (C-6), 23.7 (C-15), 20.7 (C-11), 14.5 (C-18), 12.4 (C-19). EI-MS *m/z* 304 ([M]⁺, 14%); HREI-MS calculado para C₂₀H₃₂O₂ ([M]⁺): 304.2397, observado: 304.2406.



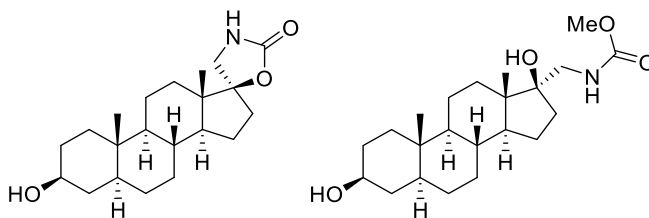
17α-Azidometil-5α-androstano-3β,17β-diol (24). A una solución de **23** (0.94 g, 3.09 mmol) en DMF anhidra (28 mL), se añadieron NaN₃ (1.99 g, 30.61 mmol) y H₃BO₃ (0.80 g, 12.94 mmol) bajo Ar. La reacción se colocó a reflujo por 2 h, posteriormente se dejó enfriar y se diluyó con AcOEt (15 mL). La mezcla se lavó con salmuera (4×20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (4:1 hexano-AcOEt) para dar el derivado **24** como un sólido blanco (1.07 g, cuant.); p.f. 175-177 °C. [α]_D²⁵ -13 (*c* 0.2, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3411, 3327 (OH), 2940-2847 (C-H alifático), 2107 (N=N=N), 1318, 1036 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 3.57 (m, 1H, H-3), 3.52 (dd, 1H, *J*_{gem} = 12.1 Hz, *J*_{H,H} = 1.3 Hz, CH_{2a}N₃), 3.23 (d, 1H, *J*_{gem} = 12.1 Hz, CH_{2b}N₃), 1.97 (ddd,

1H, $J_{H,H} = 14.7$ Hz, $J_{H,H} = 9.7$ Hz, $J_{H,H} = 7.0$ Hz, H-16a), 1.79 (m, 1H, H-2a), 1.70 (m, 1H, H-1a), 1.66 (m, 1H, H-7a), 1.65 (m, 1H, H-16b), 1.59 (m, 1H, H-12a), 1.58 (m, 1H, H-11a), 1.56 (m, 2H, H-15a, H-4a), 1.45 (m, 1H, H-8), 1.39 (m, 1H, H-2b), 1.30 (m, 1H, H-11b), 1.29 (m, 1H, H-15b), 1.28 (m, 1H, H-4b), 1.27 (m, 2H, H-6), 1.15 (m, 1H, H-12b), 1.10 (m, 1H, H-14), 1.08 (m, 1H, H-5), 0.95 (td, 1H, $J_{H,H} = 13.5$ Hz, $J_{H,H} = 3.8$ Hz, H-1b), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.83 (m, 1H, H-7b), 0.81 (s, 3H, H-19), 0.59 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 12.3$ Hz, $J_{H,H} = 10.8$ Hz, $J_{H,H} = 4.0$ Hz, H-9). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 83.6 (C-17), 71.3 (C-3), 58.5 (CH_2N_3), 54.3 (C-9), 51.4 (C-14), 46.1 (C-13), 45.0 (C-5), 38.2 (C-4), 37.1 (C-1), 36.3 (C-8), 35.7 (C-10), 34.8 (C-16), 32.1 (C-12), 31.9 (C-7), 31.6 (C-2), 28.6 (C-6), 23.7 (C-15), 20.9 (C-11), 14.3 (C-18), 12.4 (C-19). HRFAB-MS calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_2$ ($[\text{M}-\text{H}]^+$): 346.2489, observado: 346.2491.



17 α -Aminometil-5 α -androstano-3 β ,17 β -diol (25). Una solución del compuesto **24** (1.07 g, 3.08 mmol) en una mezcla 7:3 MeOH- CH_2Cl_2 (60 mL), se hidrogenó sobre 20% Pd(OH) $_2$ /C (0.64 g) a 1 atm y a t.a. por 3 h. La mezcla se filtró sobre Celita® y el filtrado se concentró a sequedad. El residuo se lavó con AcOEt frío para dar el producto **25** como un sólido blanco (0.97 g, 98%); p.f. 260 °C (desc). $[\alpha]_D^{25} +11$ (c 0.2, MeOH). IR (cm^{-1}): 3288 (OH), 2921-2862 (C-H alifático), 1612 (NH), 1037 (C-O, C-N). RMN ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$) δ 3.51 (m, 1H, H-3), 2.97 (dd, 1H, $J_{\text{gem}} = 12.6$ Hz, $J_{H,H} = 1.2$ Hz, $\text{CH}_{2a}\text{NH}_2$), 2.92 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 12.6$ Hz, $\text{CH}_{2b}\text{NH}_2$), 1.90 (ddd, 1H, $J_{H,H} = 16.1$ Hz, $J_{H,H} = 9.5$ Hz, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, H-16a), 1.76 (m, 1H, H-2a), 1.71 (m, 1H, H-1a), 1.70 (m, 1H, H-7a), 1.69 (m, 1H, H-16b), 1.66 (m, 1H, H-15a), 1.62 (m, 1H, H-11a), 1.61 (m, 1H, H-12a), 1.52 (m, 1H, H-4a), 1.49 (m, 1H, H-8), 1.39 (m, 1H, H-2b), 1.37 (m, 1H, H-15b), 1.35 (m, 1H, H-11b), 1.28 (m, 2H, H-6), 1.27 (m, 1H, H-4b), 1.14 (m, 1H, H-12b), 1.10 (m, 1H, H-5), 0.97 (td, 1H, $J_{H,H} = 14.0$ Hz, $J_{H,H} = 4.1$ Hz, H-1b), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.65 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.7$ Hz, $J_{H,H} = 3.9$ Hz, H-9). RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$) δ 81.6 (C-17), 71.5 (C-3), 55.2 (C-9), 52.0 (C-14), 47.0 (C-13), 46.4 (CH_2NH_2), 45.9 (C-5), 38.5 (C-4), 37.9 (C-1), 37.3 (C-8), 36.4 (C-10), 33.3 (C-16), 32.6 (C-7), 32.4 (C-12), 31.7 (C-2), 29.5 (C-6), 24.3 (C-15), 21.7 (C-11), 14.5 (C-18), 12.7 (C-19). FAB-

MS m/z 322 ($[M+H]^+$, 32%); HRFAB-MS calculado para $C_{20}H_{36}NO_2$ ($[M+H]^+$): 322.2741, observado: 322.2749.

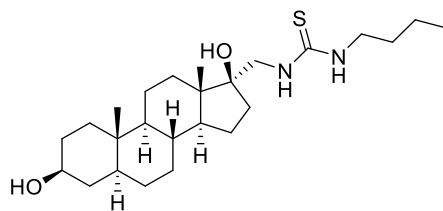


(17S)-2'-Oxo-espiro[3β-hidroxi-5α-androstan-17,5'-oxazolidina] (27) y **metil N-[(3β,17β-dihidroxi-5α-androstan-17α-il)metil]carbamato (28)**. A una solución del compuesto **25** (0.10 g, 0.31 mmol) en una mezcla MeOH-CH₂Cl₂ (2:1, 15 mL) se añadieron una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (5 mL) y trifosgeno (37 mg, 0.12 mmol) a 0 °C. La suspensión se agitó vigorosamente por 25 min a 0 °C, posteriormente se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna (1:1 hexano-AcOEt) para dar los derivados **27** (56 mg, 52%) y **28** (29 mg, 25%) como sólidos blancos. Compuesto **27**: p.f. 220 °C (desc). $[\alpha]_D^{22}$ -28 (*c* 0.4, MeOH). IR (cm⁻¹): 3427 (NH), 3200 (OH), 2925-2854 (C-H alifático), 1729 (C=O), 1284-1045 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD-CDCl₃) δ 3.57 (d, 1H, $J_{4'a,4'b}$ = 9.1 Hz, H-4'a), 3.42 (m, 1H, H-3), 3.11 (d, 1H, $J_{4'b,4'a}$ = 9.1 Hz, H-4'b), 2.14 (ddd, 1H, $J_{16a,16b}$ = 14.9 Hz, $J_{16a,H}$ = 12.8 Hz, $J_{16a,H}$ = 3.7 Hz, H-16a), 1.73 (ddd, 1H, $J_{16b,16a}$ = 14.9 Hz, $J_{16b,H}$ = 9.3 Hz, $J_{16b,H}$ = 5.8 Hz, H-16b), 1.65 (m, 1H, H-2a), 1.59 (m, 1H, H-1a), 1.57 (m, 1H, H-7a), 1.52 (m, 1H, H-15a), 1.49 (m, 1H, H-11a), 1.47 (m, 1H, H-12a), 1.42 (m, 1H, H-4a), 1.32 (m, 1H, H-8), 1.27 (m, 1H, H-2b), 1.23 (m, 1H, H-15b), 1.18 (m, 1H, H-11b), 1.18 (m, 1H, H-12b), 1.16 (m, 2H, H-6a, H-6b), 1.15 (m, 1H, H-4b), 0.97 (m, 1H, H-5), 0.84 (m, 1H, H-14), 0.83 (m, 1H, H-1b), 0.80 (s, 3H, H-18), 0.74 (m, 1H, H-7b), 0.69 (s, 3H, H-19), 0.49 (m, 1H, H-9). RMN ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD-CDCl₃) δ 160.4 (C-2'), 92.8 (C-17), 70.6 (C-3), 53.9 (C-9), 49.4 (C-4'), 49.3 (C-14), 45.3 (C-13), 44.7 (C-5), 37.5 (C-4), 36.9 (C-1), 35.7 (C-8), 35.4 (C-10), 35.3 (C-16), 31.4 (C-7), 31.0 (C-12), 30.8 (C-2), 28.3 (C-6), 22.4 (C-15), 20.4 (C-11), 14.2 (C-18), 12.1 (C-19). FAB-MS m/z 348 ($[M+H]^+$, 17%); HRFAB-MS calculado para $C_{21}H_{34}NO_3$ ($[M+H]^+$): 348.2533, observado: 348.2541. Compuesto **28**: p.f. 75-77 °C. $[\alpha]_D^{20}$ -3 (*c* 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3404 (OH), 2920-2851 (C-H alifático), 1702 (C=O), 1038 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5.19 (m, 1H, NH), 3.66 (s, 3H, OCH₃), 3.58 (m, 1H, H-3), 3.31 (dd, 1H, J_{gem} = 13.4 Hz, J = 8.1 Hz, CH_{2a}NH), 3.18 (d, 1H, J_{gem} = 13.4 Hz, CH_{2b}NH₂), 1.90 (ddd, 1H, $J_{H,H}$ = 14.1

Hz, $J_{H,H} = 9.9$ Hz, $J_{H,H} = 6.8$ Hz, H-16a), 1.79 (m, 1H, H-2a), 1.68 (td, 1H, $J_{H,H} = 13.2$ Hz, $J_{H,H} = 3.4$ Hz, H-1a), 1.64 (m, 1H, 7a), 1.56 (m, 1H, H-15a), 1.56 (m, 1H, H-11a), 1.54 (m, 1H, H-4a), 1.52 (m, 1H, H-12a), 1.48 (m, 1H, H-16b), 1.42 (m, 1H, H-8), 1.38 (m, 1H, H-2b), 1.28 (m, 1H, H-11b), 1.27 (m, 1H, H-4b), 1.25 (m, 2H, H-6a, H-6b), 1.23 (m, 1H, H-15b), 1.22 (m, 1H, H-12b), 1.21 (m, 1H, H-14), 1.08 (m, 1H, H-5), 0.95 (td, 1H, $J_{H,H} = 13.2$ Hz, $J_{H,H} = 3.6$ Hz, H-1b), 0.84 (m, 1H, H-7b), 0.84 (s, 3H, H-18), 0.80 (s, 3H, H-19), 0.61 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.2$ Hz, $J_{H,H} = 4.1$ Hz, H-9). RMN ^{13}C (125.7 MHz, $CDCl_3$) δ 158.1 (C=O), 83.6 (C-17), 71.3 (C-3), 54.2 (C-9), 52.4 (OCH₃), 50.8 (C-14), 47.1 (CH₂NH), 45.8 (C-13), 44.9 (C-5), 38.2 (C-4), 37.1 (C-1), 36.4 (C-8), 35.6 (C-10), 34.2 (C-16), 31.8 (C-7), 31.7 (C-12), 31.5 (C-2), 28.7 (C-6), 23.6 (C-15), 20.9 (C-11), 14.2 (C-18), 12.4 (C-19). FAB-MS m/z 380 ($[M+H]^+$, 13%); HRFAB-MS calculado para C₂₂H₃₈NO₄ ($[M+H]^+$): 380.2796, observado: 380.2795.

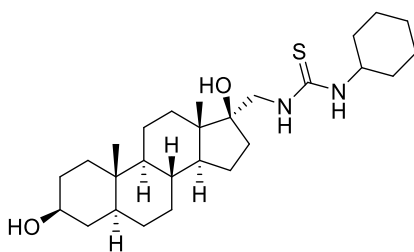
Procedimiento general para la síntesis de tioureas esteroidales 29

A una solución del derivado **25** (0.20 g, 0.62 mmol) en MeOH (10 mL) fueron añadidos el correspondiente isotiocianato (0.75 mmol) y Et₃N (50 μ L, 0.36 mmol). La mezcla se agitó durante el tiempo y a la temperatura indicados en cada caso, posteriormente el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna para dar los compuestos **29a-c** como sólidos blancos.



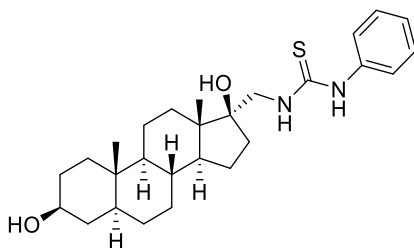
17 α -[(3'-Butiltioureido)metil]-5 α -androstano-3 β ,17 β -diol (29a). Se utilizó isotiocianato de butilo (90 μ L) y la reacción se llevó a cabo por 3 días a 45 °C. La cromatografía en columna (3:2 hexano-AcOEt) permitió obtener el derivado **29a** (0.20 g, 74%); p.f. 134-136 °C. $[\alpha]_D^{20} -7$ (c 1.0, MeOH). IR (cm⁻¹): 3279 (OH), 2929-2857 (C-H alifático), 1551 (C-NH), 1522, 1348, 1037 (C-O, C-N). RMN 1H (500 MHz, CD₃OD) δ 3.96 (sa, 1H, CH_{2a}NH), 3.52 (m, 1H, H-3),

3.48 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂), 3.34 (sa, 1H, CH_{2b}NH), 1.89 (m, 1H, H-16a), 1.76 (m, 1H, H-2a), 1.74 (m, 1H, H-1a), 1.71 (m, 1H, H-7a), 1.61 (m, 1H, H-11a), 1.60 (m, 1H, H-15a), 1.59 (m, 1H, H-12a), 1.56 (m, 3H, NH-CH₂-CH₂, H-16b), 1.53 (m, 1H, H-4a), 1.49 (m, 1H, H-8), 1.40 (m, 1H, H-2b), 1.38 (m, 3H, CH₂-CH₃, H-11b), 1.32 (m, 1H, H-14), 1.30 (m, 3H, H-6, H-12b), 1.29 (m, 2H, H-4b, H-15b), 1.14 (m, 1H, H-5), 1.02 (m, 1H, H-1b), 0.95 (t, 3H, *J*_{H,H} = 7.4 Hz, CH₂-CH₃), 0.94 (m, 1H, H-7b), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.86 (s, 3H, H-19), 0.70 (td, 1H, *J*_{H,H} = 11.7 Hz, *J*_{H,H} = 3.5 Hz, H-9). RMN ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD) δ 184.3 (C=S), 84.4 (C-17), 71.8 (C-3), 55.7 (C-9), 52.2 (C-14), 51.6 (CH₂NH), 47.2 (C-13), 46.2 (C-5), 45.1 (NH-CH₂-CH₂), 38.9 (C-4), 38.3 (C-1), 37.7 (C-8), 36.7 (C-10), 33.9 (C-16), 33.0 (C-7), 32.7 (C-12), 32.4 (NH-CH₂-CH₂), 32.1 (C-2), 29.9 (C-6), 24.6 (C-15), 22.0 (C-11), 21.1 (CH₂-CH₃), 14.9 (C-18), 14.2 (CH₂-CH₃), 12.8 (C-19). FAB-MS *m/z* 437 ([M+H]⁺, 75%); HRFAB-MS calculado para C₂₅H₄₅N₂O₂S ([M+H]⁺): 437.3196, observado: 437.3210.



17α-[(3'-Ciclohexiltioureido)metil]-5α-androstano-3β,17β-diol (29b). Se utilizó isotiocianato de ciclohexilo (0.11 mL) y la reacción se llevó a cabo por 56 h a 45 °C. La cromatografía en columna (3:2 hexano-AcOEt) permitió obtener el derivado **29b** (0.20 g, 70%); p.f. 165-167 °C. [α]_D²⁰ -7 (c 0.9, MeOH). IR (cm⁻¹): 3253 (OH), 2923-2854 (C-H alifático), 1554 (C-NH), 1523, 1348, 1024 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 4.06 (sa, 1H, H-1''), 3.98 (sa, 1H, CH_{2a}NH), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.33 (m, 1H, CH_{2b}NH), 1.97 (m, 2H, H-2''a, H-6''a), 1.89 (m, 1H, H-16a), 1.76 (m, 1H, H-2a), 1.73 (m, 2H, H-3''a, H-5''a), 1.72 (m, 1H, H-1a), 1.70 (m, 1H, H-7a), 1.62 (m, 1H, H-4''a), 1.60 (m, 1H, H-11a), 1.59 (m, 1H, H-15a), 1.57 (m, 1H, H-12a), 1.53 (m, 1H, H-16b), 1.52 (m, 1H, H-4a), 1.47 (m, 1H, H-8), 1.39 (m, 1H, H-2b), 1.37 (m, 2H, H-3''b, H-5''b), 1.33 (m, 1H, H-11b), 1.30 (m, 1H, H-14), 1.29 (m, 1H, H-12b), 1.28 (m, 3H, H-6, H-15b), 1.27 (m, 1H, H-4b), 1.20 (m, 3H, H-2''b, H-6''b, H-4''b), 1.12 (m, 1H, H-5), 0.99 (m, 1H, H-1b), 0.92 (m, 1H, H-7b), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.85 (s, 3H, H-19),

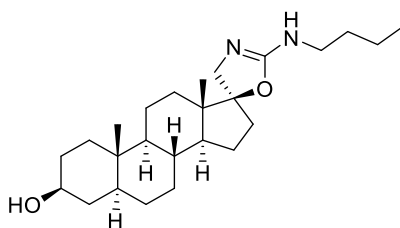
0.69 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.6$ Hz, $J_{H,H} = 3.5$ Hz, H-9). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) δ 183.1 (C=S), 84.3 (C-17), 71.6 (C-3), 55.4 (C-9), 53.7 (C-1''), 51.9 (C-14), 51.4 (CH_2NH), 47.0 (C-13), 46.0 (C-5), 38.7 (C-4), 38.1 (C-1), 37.5 (C-8), 36.5 (C-10), 33.7 (x2) (C-2'', C-6''), 33.7 (C-16), 32.8 (C-7), 32.5 (C-12), 31.9 (C-2), 29.7 (C-6), 26.5 (C-4''), 25.9 (x2) (C-3'', C-5''), 24.5 (C-15), 21.8 (C-11), 14.7 (C-18), 12.7 (C-19). HRFAB-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 463.3353, observado: 463.3386.



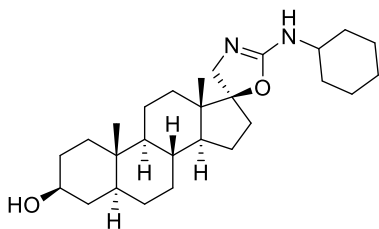
17 α -[(3'-Feniltioureido)metil]-5 α -androstano-3 β ,17 β -diol (29c). Se utilizó isotiocianato de fenilo (90 μL) y la reacción se llevó a cabo por 30 min a t.a.. La cromatografía en columna (7:3 hexano-AcOEt) permitió obtener el derivado **29c** (0.23 g, 81%); p.f. 280 $^\circ\text{C}$ (desc). $[\alpha]_D^{20} -11$ (c 0.5, MeOH). IR (cm^{-1}): 3204 (OH), 2920-2840 (C-H alifático), 1598 (C=C), 1528 (C-NH), 1523, 1026 (C-O, C-N). RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7.36 (m, 4H, Ar-Ho, Ar-Hm), 7.22 (m, 1H, Ar-Hp), 4.04 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 13.2$ Hz, CH_{2a}NH), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.40 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 13.2$ Hz, CH_{2b}NH), 1.90 (m, 1H, H-16a), 1.77 (m, 1H, H-2a), 1.73 (m, 1H, H-1a), 1.72 (m, 1H, H-7a), 1.63 (m, 1H, H-15a), 1.62 (m, 1H, H-11a), 1.58 (m, 1H, H-16b), 1.56 (m, 1H, H-12a), 1.53 (m, 1H, H-4a), 1.50 (m, 1H, H-8), 1.40 (m, 1H, H-2b), 1.35 (m, 1H, H-11b), 1.33 (m, 1H, H-14), 1.30 (m, 4H, H-6a, H-6b, H-15b, H-12b), 1.28 (m, 1H, H-4b), 1.15 (m, 1H, H-5), 1.01 (m, 1H, H-1b), 0.95 (m, 1H, H-7b), 0.85 (s, 6H, H-18, H-19), 0.70 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.3$ Hz, $J_{H,H} = 3.2$ Hz, H-9). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) δ 182.2 (C=S), 139.3 (Ar-Cipso), 130.5 (x2) (Ar-C), 127.0 (Ar-Cp), 125.5 (x2) (Ar-C), 84.3 (C-17), 71.8 (C-3), 55.7 (C-9), 52.2 (CH_2NH), 52.2 (C-14), 47.1 (C-13), 46.2 (C-5), 38.9 (C-4), 38.2 (C-1), 37.7 (C-8), 36.7 (C-10), 34.1 (C-16), 33.0 (C-7), 32.9 (C-12), 32.1 (C-2), 29.9 (C-6), 24.6 (C-15), 22.0 (C-11), 14.8 (C-18), 12.7 (C-19). HRFAB-MS calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 457.2883, observado: 457.2892.

Procedimiento general para la síntesis de isoureas espiránicas esteroidales **30**

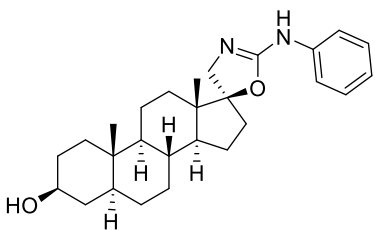
A una solución de la correspondiente tiourea **29** (0.25 mmol) en THF anhidro (10 mL) se añadió HgO amarillo (4.50 mmol para los compuestos **29a,b** y 2.29 mmol para el compuesto **29c**) bajo Ar. La mezcla se agitó a t.a. y en oscuridad durante el tiempo indicado en cada caso, posteriormente se filtró sobre Celita® y se evaporó a sequedad. El residuo se lavó con hexano o se purificó por cromatografía en columna, como se indica en cada caso, para dar los productos **30a-c** como espumas blancas.



(17S)-2'-*n*-Butilamino-espino[3β-hidroxi-5α-androstan-17,5'-oxazolina] (30a). Se utilizó la tiourea **29a** (0.11 g) y la reacción se llevó a cabo por 6 días para dar el derivado **30a** (0.10 g, 99%). IR (cm⁻¹): 3226 (OH), 2928-2856 (C-H alifático), 1650 (C=N), 1046 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4.05 (sa, 1H, NH), 3.81 (d, 1H, *J*_{4'a,4'b} = 12.2 Hz, H-4'a), 3.51 (m, 1H, H-3), 3.28 (d, 1H, *J*_{4'b,4'a} = 12.2 Hz, H-4'b), 3.10 (m, 2H, H-1''), 2.14 (ddd, 1H, *J*_{H,H} = 14.4 Hz, *J*_{H,H} = 12.5 Hz, *J*_{H,H} = 3.6 Hz, H-16a), 1.74 (m, 2H, H-16b, H-2a), 1.65 (m, 1H, H-1a), 1.63 (m, 1H, H-7a), 1.55 (m, 1H, H-15a), 1.53 (m, 1H, H-11a), 1.50 (m, 1H, H-4a), 1.45 (m, 2H, H-2''), 1.39 (m, 1H, H-12a), 1.34 (m, 1H, H-2b), 1.33 (m, 1H, H-8), 1.29 (m, 2H, H-3''), 1.28 (m, 1H, H-12b), 1.23 (m, 2H, H-15b, H-4b), 1.22 (m, 3H, H-11b, H-6), 1.04 (m, 1H, H-5), 0.91 (m, 1H, H-1b), 0.90 (m, 1H, H-14), 0.86 (t, 3H, *J*_{4'',3''} = 7.4 Hz, H-4''), 0.82 (s, 3H, H-18), 0.81 (m, 1H, H-7b), 0.76 (s, 3H, H-19), 0.56 (td, 1H, *J*_{H,H} = 11.9 Hz, *J*_{H,H} = 4.0 Hz, H-9). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 160.8 (C-2'), 96.0 (C-17), 70.8 (C-3), 60.5 (C-4'), 54.2 (C-9), 49.6 (C-14), 45.0 (C-13), 45.0 (C-5), 42.4 (C-1''), 38.1 (C-4), 37.2 (C-1), 35.9 (C-8), 35.6 (C-10), 35.2 (C-16), 32.0 (C-2''), 31.6 (C-7), 31.5 (C-2), 31.2 (C-12), 28.5 (C-6), 22.6 (C-15), 20.6 (C-11), 20.0 (C-3''), 14.6 (C-18), 13.8 (C-4''), 12.4 (C-19). HRFAB-MS calculado para C₂₅H₄₃N₂O₂ ([M+H]⁺): 403.3319, observado: 403.3313.

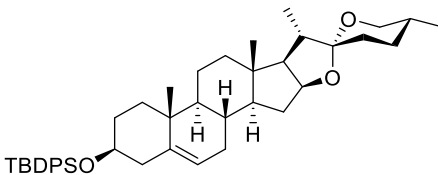


(17S)-2'-Ciclohexilamino-espiro[3β-hidroxi-5α-androstan-17,5'-oxazolina] (30b). Se utilizó la tiourea **29b** (0.12 g) y la reacción se llevó a cabo por 3 días para dar el producto **30b** (0.10 g, 93%). $[\alpha]_D^{20}$ -21 (*c* 1.0, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3286 (OH), 2924-2853 (C-H alifático), 1654 (C=N), 1044 (C-O, C-N). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 3.84 (d, 1H, $J_{4'a,4'b}$ = 12.4 Hz, H-4'a), 3.56 (m, 1H, H-3), 3.35 (m, 1H, H-1''), 3.32 (d, 1H, $J_{4'b,4'a}$ = 12.4 Hz, H-4'b), 2.17 (ddd, 1H, $J_{H,H}$ = 14.0 Hz, $J_{H,H}$ = 12.4 Hz, $J_{H,H}$ = 3.8 Hz, H-16a), 1.96 (m, 2H, H-2''a, H-6''a), 1.78 (m, 2H, H-2a, H-16b), 1.69 (m, 1H, H-1a), 1.68 (m, 2H, H-3''a, H-5''a), 1.67 (m, 1H, H-7a), 1.58 (m, 1H, H-15a), 1.57 (m, 1H, H-4''a), 1.56 (m, 1H, H-11a), 1.55 (m, 1H, H-4a), 1.43 (m, 1H, H-12a), 1.38 (m, 1H, H-2b), 1.36 (m, 1H, H-8), 1.34 (m, 1H, H-12b), 1.31 (m, 2H, H-3''b, H-5''b), 1.27 (m, 2H, H-15b, H-4b), 1.25 (m, 3H, H-6a, H-6b, H-11b), 1.13 (m, 1H, H-4''b), 1.10 (m, 2H, H-2''b, H-6''b), 1.08 (m, 1H, H-5), 0.95 (m, 1H, H-1b), 0.94 (m, 1H, H-14), 0.85 (s, 3H, H-18), 0.84 (m, 1H, H-7b), 0.79 (s, 3H, H-19), 0.60 (td, 1H, $J_{H,H}$ = 11.8 Hz, $J_{H,H}$ = 4.1 Hz, H-9). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 159.8 (C-2'), 95.8 (C-17), 71.2 (C-3), 60.9 (C-4'), 54.2 (C-9), 51.5 (C-1''), 49.6 (C-14), 45.1 (C-13), 45.0 (C-5), 38.2 (C-4), 37.2 (C-1), 36.0 (C-8), 35.6 (C-10), 35.3 (C-16), 33.8 (C-2'' o C-6''), 33.7 (C-2'' o C-6''), 31.6 (C-7), 31.6 (C-2), 31.2 (C-12), 28.6 (C-6), 25.7 (C-4''), 25.0 (x2) (C-3'', C-5''), 22.7 (C-15), 20.7 (C-11), 14.7 (C-18), 12.5 (C-19). FAB-MS *m/z* 429 ([M+H]⁺, 100%); HRFAB-MS calculado para C₂₇H₄₅N₂O₂ ([M+H]⁺): 429.3476, observado: 429.3508.

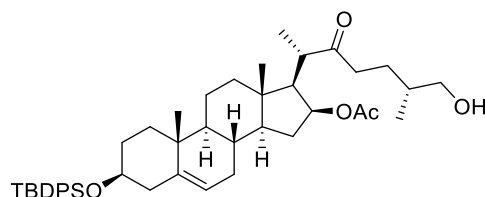


(17S)-2'-Fenilamino-espiro[3β-hidroxi-5α-androstan-17,5'-oxazolina] (30c). Se utilizó la tiourea **29c** (0.12 g) y la reacción se llevó a cabo por 19 h. La cromatografía en columna (CH₂Cl₂

→ 20:1 CH₂Cl₂-Isopropanol) permitió obtener el derivado **30c** (0.10 g, 97%). $[\alpha]_D^{20} +2$ (c 1.0, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3282 (OH), 2920-2853 (C-H alifático), 1658 (C=N), 1594-1447 (C=C), 1040 (C-O, C-N), 748-691 (=C-H). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.27 (m, 4H, Ar-H_o, Ar-H_m), 7.0 (m, 1H, Ar-H_p), 4.85 (sa, 1H, NH), 3.91 (d, 1H, $J_{4'a,4'b} = 11.1$ Hz, H-4'a), 3.59 (m, 1H, H-3), 3.40 (d, 1H, $J_{4'b,4'a} = 11.1$ Hz, H-4'b), 2.29 (ddd, 1H, $J_{16a,16b} = 14.6$ Hz, $J_{16a,H} = 12.4$ Hz, $J_{16a,H} = 3.7$ Hz, H-16a), 1.88 (ddd, 1H, $J_{16b,16a} = 14.6$ Hz, $J_{16b,H} = 9.5$ Hz, $J_{16b,H} = 5.8$ Hz, H-16b), 1.80 (m, 1H, H-2a), 1.72 (m, 1H, H-1a), 1.71 (m, 1H, H-7a), 1.65 (m, 1H, H-15a), 1.60 (m, 1H, H-11a), 1.57 (m, 2H, H-12a, H-4a), 1.43 (m, 1H, H-8), 1.41 (m, 1H, H-2b), 1.36 (m, 1H, H-12b), 1.35 (m, 1H, H-15b), 1.31 (m, 1H, H-11b), 1.30 (m, 1H, H-4b), 1.28 (m, 2H, H-6), 1.10 (m, 1H, H-5), 0.99 (m, 1H, H-14), 0.97 (m, 1H, H-1b), 0.96 (s, 3H, H-18), 0.87 (qd, 1H, $J_{H,H} = 12.1$ Hz, $J_{H,H} = 5.3$ Hz, H-7b), 0.82 (s, 3H, H-19), 0.63 (td, 1H, $J_{H,H} = 11.6$ Hz, $J_{H,H} = 3.9$ Hz, H-9). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 157.1 (C-2'), 129.1 (x3) (Ar-C), 122.7 (x2) (Ar-C), 120.0 (Ar-C), 96.5 (C-17), 71.2 (C-3), 56.4 (C-4'), 54.1 (C-9), 49.9 (C-14), 45.4 (C-13), 44.9 (C-5), 38.2 (C-4), 37.1 (C-1), 36.0 (C-8), 35.6 (C-10), 35.4 (C-16), 31.6 (C-7), 31.5 (C-2), 31.4 (C-12), 28.5 (C-6), 22.8 (C-15), 20.6 (C-11), 14.8 (C-18), 12.5 (C-19). HRFAB-MS calculado para C₂₇H₃₉N₂O₂ ([M+H]⁺): 423.3006, observado: 423.3004.

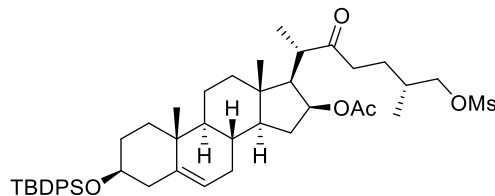


(25R)-terc-Butildifenilsiloxidiosgenina (32). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Cheng *et al.*⁷⁵ A una solución de imidazol (0.72 g, 10.58 mmol) en DMF anhidra (25 mL) se añadieron TBDPSCl (2.5 mL, 9.65 mmol) y diosgenina **31** (2.0 g, 4.82 mmol). La mezcla se agitó a t.a. por 20 h, posteriormente se diluyó con AcOEt y se lavó con salmuera (4×25 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se secó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (99:1 hexane-EtOAc) para dar el compuesto **31** como un sólido blanco (2.90 g, 92%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



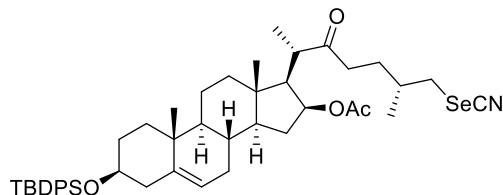
Acetato de (25*R*)-3β-*terc*-butildifenilsiloxi-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo (33). A una solución de **32** (2.80 g, 4.29 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (30 mL) se añadió Ac₂O (7 mL, 74.0 mmol) a 0 °C y posteriormente BF₃·OEt₂ (5.6 mL, 45.37 mmol) gota a gota bajo Ar. La mezcla se agitó a 0 °C por 10 min, posteriormente se vació en agua con hielo y se agitó toda la noche. La fase orgánica se separó y se lavó con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ hasta neutralizar la reacción, posteriormente se lavó con salmuera (2×20 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (4:1 hexano-AcOEt) para dar el compuesto **33** como una espuma blanca (1.59 g, 52%). $[\alpha]_D^{20} = 5$ (*c* 0.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3395 (OH), 2932-2858 (C-H alifático), 1739 (C=O acetato), 1714 (C=O cetona), 1240 (C-O), 1108 (Si-O), 1079 (C-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (m, 4H, Ar-H*m*), 7.41 (m, 2H, Ar-H*p*), 7.35 (m, 4H, Ar-H*o*), 5.10 (m, 1H, H-6), 4.95 (td, 1H, *J*_{16,H} = 7.9 Hz, *J*_{16,15ax} = 4.8 Hz, H-16), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.41 (d, 2H, *J*_{26,25} = 5.9 Hz, H-26), 2.94 (dq, 1H, *J*_{20,17} = 11.0 Hz, *J*_{20,21} = 7.1 Hz, H-20), 2.62 (ddd, 1H, *J*_{23a,23b} = 18.1 Hz, *J*_{23a,24a} = 8.5 Hz, *J*_{23a,24b} = 6.6 Hz, H-23a), 2.38 (ddd, 1H, *J*_{23b,23a} = 18.1 Hz, *J*_{23b,24b} = 8.6 Hz, *J*_{23b,24a} = 5.8 Hz, H-23b), 2.36 (m, 1H, H-15a), 2.31 (m, 1H, H-4a), 2.12 (ddd, 1H, *J*_{4b,4a} = 13.4 Hz, *J*_{4b,3} = 5.0 Hz, *J*_{4b,H} = 1.9 Hz, H-4b), 1.95 (s, 3H, OCOCH₃), 1.89 (m, 1H, H-12ec), 1.87 (m, 1H, H-17), 1.86 (m, 1H, H-7a), 1.68 (m, 2H, H-1a, H-24a), 1.67 (m, 1H, H-2a), 1.59 (m, 1H, H-2b), 1.56 (m 1H, H-25), 1.45 (m, 2H, H-8, H-11a), 1.42 (m, 2H, H-11b, H-7b), 1.33 (m, 1H, H-24b), 1.20 (td, 1H, *J*_{12ax,H} = 12.5 Hz, *J*_{12ax,11ec} = 4.8 Hz, H-12ax), 1.12 (d, 3H, *J*_{21,20} = 7.1 Hz, H-21), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.99 (m, 1H, H-15b), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.94 (m, 1H, H-14), 0.90 (d, 3H, *J*_{27,25} = 6.8 Hz, H-27), 0.84 (m, 2H, H-9, H-1b), 0.84 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 213.9 (C-22), 170.0 (OCOCH₃), 141.3 (C-5), 135.9 (x2), 135.8 (x2) (Ar-C*m*), 134.8, 134.8 (Ar-C*pso*), 129.6, 129.5 (Ar-C*p*), 127.6 (x2), 127.6 (x2) (Ar-C*o*), 120.9 (C-6), 75.8 (C-16), 73.2 (C-3), 67.5 (C-26), 55.1 (C-17), 54.1 (C-14), 49.9 (C-9), 43.6 (C-20), 42.5 (C-4), 42.0 (C-13), 39.7 (C-12), 38.6 (C-23), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 35.5 (C-25), 34.9 (C-15), 31.9 (C-2), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 27.1 (C(CH₃)₃), 26.3 (C-24), 21.3 (OCOCH₃), 20.8 (C-11), 19.5 (C-19), 19.2

(C(CH₃)₃), 17.0 (C-21), 16.7 (C-27), 13.3 (C-18). HRESI-MS calculado para C₄₅H₆₄NaO₅Si ([M+Na]⁺): 735.4415, observado: 735.4402.



Acetato de (25R)-3β-*terc*-butildifenilsiloxi-26-mesiloxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo (34). A una solución enfriada de **33** (0.20 g, 0.28 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (2 mL) se añadieron MsCl (0.09 mL, 1.12 mmol) y Et₃N (0.35 mL, 2.52 mmol) gota a gota y bajo Ar. La mezcla se agitó a 0 °C por 1 h, posteriormente se diluyó con CH₂Cl₂ (10 mL), se lavó con 5% HCl acuoso (2×5 mL), con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (2×5 mL) y salmuera (2×5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (17:3 hexano-AcOEt) para dar el derivado **34** como una espuma blanca (0.20 g, 90%). [α]_D²⁰ -22 (c 0.3, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 2934-2853 (C-H alifático), 1735 (C=O acetato), 1710 (C=O cetona), 1359-1334 y 1172 (O=S=O), 1241 (C-O), 1088 (C-O, Si-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.66 (m, 4H, Ar-*Hm*), 7.41 (m, 2H, Ar-*Hp*), 7.36 (m, 4H, Ar-*Ho*), 5.10 (m, 1H, H-6), 4.95 (td, 1H, *J*_{16,H} = 7.8 Hz, *J*_{16,15ax} = 4.8 Hz, H-16), 4.05 (dd, 1H, *J*_{26a,26b} = 9.7 Hz, *J*_{26a,25} = 6.0 Hz, H-26a), 4.03 (dd, 1H, *J*_{26b,26a} = 9.7 Hz, *J*_{26b,25} = 6.2 Hz, H-26b), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.01 (s, 3H, CH₃ Ms), 2.92 (dq, 1H, *J*_{20,17} = 11.2 Hz, *J*_{20,21} = 7.1 Hz, H-20), 2.64 (ddd, 1H, *J*_{23a,23b} = 17.9 Hz, *J*_{23a,24a} = 9.4 Hz, *J*_{23a,24b} = 6.3 Hz, H-23a), 2.35 (m, 1H, H-15a), 2.34 (m, 1H, H-23b), 2.30 (m, 1H, H-4a), 2.12 (ddd, 1H, *J*_{4b,4a} = 13.3 Hz, *J*_{4b,3} = 4.7 Hz, *J*_{4b,H} = 1.6 Hz, H-4b), 1.95 (s, 3H, OCOCH₃), 1.88 (m, 1H, H-12ec), 1.87 (m, 1H, H-17), 1.85 (m, 2H, H-25, H-7a), 1.70 (m, 1H, H-24a), 1.68 (m, 1H, H-1a), 1.67 (m, 1H, H-2a), 1.58 (m, 1H, H-2b), 1.45 (m, 2H, H-11a, H-8), 1.42 (m, 1H, H-7b), 1.41 (m, 1H, H-11b), 1.38 (m, 1H, H-24b), 1.20 (td, 1H, *J*_{12ax,H} = 12.4 Hz, *J*_{12ax,11ec} = 4.7 Hz, H-12ax), 1.11 (d, 3H, *J*_{21,20} = 7.1 Hz, H-21), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.98 (m, 1H, H-15b), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.97 (d, 3H, *J*_{27,25} = 7.0 Hz, H-27), 0.94 (m, 1H, H-14), 0.84 (m, 2H, H-1b, H-9), 0.84 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 212.6 (C-22), 169.9 (OCOCH₃), 141.3 (C-5), 135.9 (x2), 135.8 (x2) (Ar-*Cm*), 134.8, 134.8 (Ar-*Cipso*), 129.6, 129.5 (Ar-*Cp*), 127.6 (x2), 127.6 (x2) (Ar-*Co*), 120.9 (C-6), 75.8 (C-16),

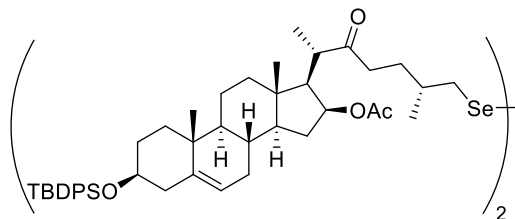
74.2 (C-26), 73.2 (C-3), 55.1 (C-17), 54.1 (C-14), 49.9 (C-9), 43.7 (C-20), 42.5 (C-4), 42.0 (C-13), 39.7 (C-12), 38.1 (C-23), 37.4 (CH₃ Ms), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-15), 32.7 (C-25), 31.9 (C-2), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 27.1 (C(CH₃)₃), 26.4 (C-24), 21.3 (OCOCH₃), 20.8 (C-11), 19.5 (C-19), 19.2 (C(CH₃)₃), 16.8 (C-21), 16.4 (C-27), 13.3 (C-18). HRESI-MS calculado para C₄₆H₆₆NaO₇SSi ([M+Na]⁺): 813.4191, observado: 813.4163.



Acetato de (25R)-3β-terc-butildifenilsiloxi-22-oxo-26-selenocianatocolest-5-en-16β-ilo

(35). A una solución de **34** (0.88 g, 1.11 mmol) en THF anhidro (40 mL) se añadió KSeCN (0.80 g, 5.55 mmol) bajo Ar. La mezcla se mantuvo a reflujo y en oscuridad por 10 h. Posteriormente se evaporó el disolvente y el residuo se purificó por cromatografía en columna (17:3 hexano-AcOEt) para dar el compuesto **35** como una espuma blanca (0.84 g, 94%). $[\alpha]_D^{20} +1$ (c 1.1, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3058 (=C-H), 2968-2859 (C-H alifático), 2150 (C≡N), 1732 (C=O acetato), 1714 (C=O cetona), 1266 (C-O), 1107 (C-O, Si-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (m, 4H, Ar-H_m), 7.41 (m, 2H, Ar-H_p), 7.36 (m, 4H, Ar-H_o), 5.10 (m, 1H, H-6), 4.96 (td, 1H, $J_{16,H} = 7.9$ Hz, $J_{16,15ax} = 4.8$ Hz, H-16), 3.52 (m, 1H, H-3), 3.09 (dd, 1H, $J_{26a,26b} = 12.1$ Hz, $J_{26a,25} = 5.4$ Hz, H-26a), 2.93 (dq, 1H, $J_{20,17} = 11.1$ Hz, $J_{20,21} = 7.1$ Hz, H-20), 2.91 (dd, 1H, $J_{26b,26a} = 12.1$ Hz, $J_{26b,25} = 7.1$ Hz, H-26b), 2.65 (ddd, 1H, $J_{23a,23b} = 18.1$ Hz, $J_{23a,24a} = 9.0$ Hz, $J_{23a,24b} = 6.4$ Hz, H-23a), 2.36 (m, 1H, H-15a), 2.36 (m, 1H, H-23b), 2.32 (m, 1H, H-4a), 2.12 (ddd, 1H, $J_{4b,4a} = 13.4$ Hz, $J_{4b,3} = 4.9$ Hz, $J_{4b,H} = 1.8$ Hz, H-4b), 1.96 (s, 3H, OCOCH₃), 1.89 (m, 1H, H-12ec), 1.88 (m, 1H, H-17), 1.87 (m, 1H, H-25), 1.86 (m, 1H, H-7a), 1.75 (m, 1H, H-24a), 1.69 (m, 1H, H-1a), 1.68 (m, 1H, H-2a), 1.59 (m, 1H, H-2b), 1.47 (m, 1H, H-8), 1.46 (m, 1H, H-11a), 1.43 (m, 1H, H-24b), 1.42 (m, 2H, H-11b, H-7b), 1.21 (td, 1H, $J_{12ax,H} = 11.8$ Hz, $J_{12ax,11ec} = 4.2$ Hz, H-12ax), 1.12 (d, 3H, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, H-21), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.05 (d, 3H, H-27), 1.0 (m, 1H, H-15b), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.96 (m, 1H, H-14), 0.85 (m, 2H, H-1b, H-9), 0.84 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 212.5 (C-22), 169.8 (OCOCH₃), 141.3 (C-5), 135.8 (x2), 135.8 (x2) (Ar-C_m), 134.8, 134.8 (Ar-C_{ipso}), 129.6, 129.5 (Ar-C_p), 127.6 (x2), 127.5 (x2) (Ar-C_o), 120.8

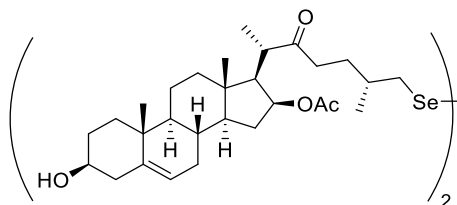
(C-6), 102.3 (SeCN), 75.8 (C-16), 73.2 (C-3), 55.1 (C-17), 54.0 (C-14), 49.8 (C-9), 43.6 (C-20), 42.5 (C-4), 41.9 (C-13), 39.7 (C-12), 38.4 (C-23), 37.6 (C-26), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-15), 34.0 (C-25), 31.9 (C-2), 31.6 (C-7), 31.3 (C-8), 29.2 (C-24), 27.1 (C(CH₃)₃), 21.3 (OCOCH₃), 20.8 (C-11), 19.5 (C-19), 19.3 (C-27), 19.2 (C(CH₃)₃), 16.9 (C-21), 13.3 (C-18). HRESI-MS calculado para C₄₆H₆₃NNaO₄SeSi ([M+Na]⁺): 824.3584, observado: 824.3557.



Diselenuro de bis[(25*R*)-16β-acetoxi-3β-*terc*-butildifenilsililoxi-22-oxocolest-5-en-26-ilo]

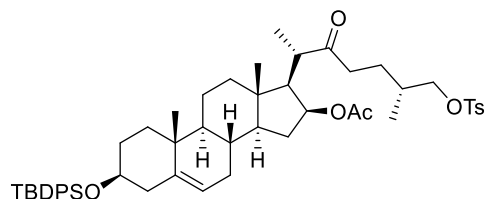
(36). A una solución del compuesto **35** (0.25 g, 0.31 mmol) en una mezcla anhidra de MeOH-THF (5:3, 8 mL) se añadió NaBH₄ (6.0 mg, 0.16 mmol) bajo argón. La mezcla se agitó a t.a. por 30 min, posteriormente se evaporó el disolvente y el residuo se trató con H₂O, se añadió CH₂Cl₂ y se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (19:1 hexano-AcOEt) para obtener el compuesto **36** como una espuma amarilla (0.16 g, 68%). $[\alpha]_D^{22} +11$ (c 0.2, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 3055 (=C-H), 2962-2859 (C-H alifático), 1731 (C=O acetato), 1716 (C=O cetona), 1266 (C-O), 1109 (C-O, Si-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (m, 4H, Ar-H_m), 7.41 (m, 2H, Ar-H_p), 7.36 (m, 4H, Ar-H_o), 5.10 (m, 1H, H-6), 4.93 (td, 1H, $J_{16,H} = 7.9$ Hz, $J_{16,15ax} = 4.8$ Hz, H-16), 3.51 (m, 1H, H-3), 2.96 (dd, 1H, $J_{26a,26b} = 12.0$ Hz, $J_{26a,25} = 5.3$ Hz, H-26a), 2.93 (dq, 1H, $J_{20,17} = 11.0$ Hz, $J_{20,21} = 7.1$ Hz, H-20), 2.80 (dd, 1H, $J_{26b,26a} = 12.0$ Hz, $J_{26b,25} = 7.3$ Hz, H-26b), 2.61 (ddd, 1H, $J_{23a,23b} = 17.8$ Hz, $J_{23a,24a} = 10.4$ Hz, $J_{23a,24b} = 5.4$ Hz, H-23a), 2.36 (m, 1H, H-15a), 2.34 (m, 1H, H-23b), 2.31 (m, 1H, H-4a), 2.11 (ddd, 1H, $J_{4b,4a} = 13.4$ Hz, $J_{4b,3} = 4.8$ Hz, $J_{4b,H} = 1.8$ Hz, H-4b), 1.95 (s, 3H, OCOCH₃), 1.89 (m, 1H, H-12ec), 1.87 (m, 1H, H-17), 1.85 (m, 1H, H-7a), 1.71 (m, 2H, H-24a, H-25), 1.68 (m, 1H, H-1a), 1.67 (m, 1H, H-2a), 1.59 (m, 1H, H-2b), 1.45 (m, 1H, H-11a), 1.44 (m, 1H, H-8), 1.41 (m, 2H, H-7b, H-11b), 1.37 (m, 1H, H-24b), 1.19 (td, 1H, $J_{12ax,H} = 12.5$ Hz, $J_{12ax,11ec} = 4.8$ Hz, H-12ax), 1.11 (d, 3H, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, H-21), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.98 (m, 1H, H-15b), 0.97 (d, 3H, $J_{27,25} = 5.6$ Hz, H-27), 0.94 (m, 1H, H-14), 0.84 (m, 1H, H-9), 0.83 (m, 1H, H-1b), 0.83 (s, 3H, H-18). RMN

^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 213.0 (C-22), 169.9 (OCOCH_3), 141.3 (C-5), 135.9 (x2), 135.9 (x2) (Ar-Cm), 134.8, 134.8 (Ar-Cipso), 129.6, 129.6 (Ar-Cp), 127.6 (x2), 127.6 (x2) (Ar-Co), 120.9 (C-6), 75.9 (C-16), 73.2 (C-3), 55.0 (C-17), 54.0 (C-14), 49.8 (C-9), 43.6 (C-20), 42.5 (C-4), 41.9 (C-13), 39.7 (C-12), 38.9 (C-26), 38.8 (C-23), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-15), 34.0 (C-25), 31.9 (C-2), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 29.9 (C-24), 27.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 21.4 (OCOCH_3), 20.8 (C-11), 19.6 (C-19), 19.5 (C-27), 19.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 16.9 (C-21), 13.3 (C-18). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{90}\text{H}_{126}\text{NaO}_8\text{Se}_2\text{Si}_2$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 1573.7214, observado: 1573.7217.



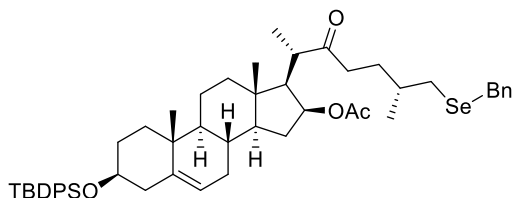
Diselenuro de bis[(25R)-16β-acetoxi-3β-hidroxi-22-oxocolest-5-en-26-ilo] (37). El compuesto **36** (0.13 g, 0.09 mmol) se disolvió en una mezcla TFA-THF- H_2O (3:2:1, 8 mL) y se agitó a t.a. por 2 h, posteriormente se lavó con una mezcla saturada acuosa de NaHCO_3 hasta neutralizar y se diluyó con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con salmuera (2×5 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (3:2 hexano-AcOEt) para obtener el compuesto **37** como un aceite amarillo (0.03 g, 33%). $[\alpha]_D^{25} +17$ (c 0.2, CHCl_3). IR (cm^{-1}): 3057 (=C-H), 2982-2926 (C-H alifático), 1734 (C=O acetato), 1710 (C=O cetona), 1266 (C-O). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 5.32 (m, 1H, H-6), 4.95 (td, 1H, $J_{16,\text{H}} = 8.1$ Hz, $J_{16,15\text{ax}} = 4.9$ Hz, H-16), 3.51 (m, 1H, H-3), 2.96 (dd, 1H, $J_{26\text{a},26\text{b}} = 12.0$ Hz, $J_{26\text{a},25} = 5.6$ Hz, H-26a), 2.94 (m, 1H, H-20), 2.80 (dd, 1H, $J_{26\text{b},26\text{a}} = 12.0$ Hz, $J_{26\text{b},25} = 7.3$ Hz, H-26b), 2.62 (ddd, 1H, $J_{23\text{a},23\text{b}} = 17.8$ Hz, $J_{23\text{a},\text{H}} = 10.4$ Hz, $J_{23\text{a},\text{H}} = 5.4$ Hz, H-23a), 2.39 (m, 1H, H-15a), 2.34 (ddd, 1H, $J_{23\text{b},23\text{a}} = 17.8$ Hz, $J_{23\text{b},\text{H}} = 10.1$ Hz, $J_{23\text{b},\text{H}} = 5.0$ Hz, H-23b), 2.28 (m, 1H, H-4a), 2.22 (m, 1H, H-4b), 1.95 (s, 3H, OCOCH_3), 1.92 (m, 2H, H-2a, H-12ec), 1.89 (m, 1H, H-17), 1.82 (m, 2H, H-7a, H-1a), 1.72 (m, 1H, H-24a), 1.71 (m, 1H, H-25), 1.53 (m, 1H, H-11a), 1.52 (m, 1H, H-2b), 1.51 (m, 1H, H-8), 1.46 (m, 2H, H-7b, H-11b), 1.37 (m, 1H, H-24b), 1.26 (td, 1H, $J_{12\text{ax},\text{H}} = 12.6$ Hz, $J_{12\text{ax},11\text{ec}} = 4.0$ Hz, H-12ax), 1.12 (d, 3H, $J_{21,20} = 7.1$ Hz, H-21), 1.08 (m, 1H, H-1b), 1.01 (m, 1H, H-15b), 1.0 (m, 1H, H-14), 0.99 (s, 3H, H-19), 0.97 (d, 3H, $J_{27,25} = 6.5$ Hz, H-27), 0.95 (m, 1H, H-9), 0.85 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C

(125.7 MHz, CDCl₃) δ 213.0 (C-22), 170.0 (OCOCH₃), 140.8 (C-5), 121.4 (C-6), 75.9 (C-16), 71.7 (C-3), 55.1 (C-17), 54.0 (C-14), 49.9 (C-9), 43.6 (C-20), 42.3 (C-4), 41.9 (C-13), 39.7 (C-12), 38.9 (C-26), 38.8 (C-23), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-15), 34.0 (C-25), 31.7 (C-2), 31.6 (C-7), 31.3 (C-8), 29.9 (C-24), 21.4 (OCOCH₃), 20.8 (C-11), 19.6 (C-19), 19.5 (C-27), 16.9 (C-21), 13.4 (C-18). HRESI-MS calculado para C₅₈H₉₀O₈NaSe₂ ([M+Na]⁺): 1097.4858, observado: 1097.4862.



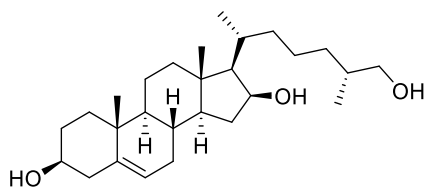
Acetato de (25R)-3β-*terc*-butildifenilsiloxi-26-tosiloxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo (38). A una solución de **33** (0.20 g, 0.28 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (7 mL) se añadieron TsCl (1.40 g, 7.40 mmol) y piridina (0.22 mL, 2.70 mmol) bajo Ar. La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. por 23 h, posteriormente se lavó con una solución de HCl al 5% (4×5 mL), con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (2×5 mL) y salmuera (2×5 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se secó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (9:1 hexano-AcOEt) para obtener el derivado **38** como una espuma blanca (0.19 g, 79%). [α]_D¹⁸ -39 (*c* 0.3, CHCl₃). IR (cm⁻¹): 2933-2856 (C-H alifático), 1736 (C=O acetato), 1712 (C=O cetona), 1598-1460 (C=C), 1359 y 1176 (O=S=O), 1240 (C-O), 1105-1077 (C-O, Si-O). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.77 (m, 2H, H-2 Ts), 7.67 (m, 4H, Ar-H_m), 7.41 (m, 2H, Ar-H_p), 7.36 (m, 4H, Ar-H_o), 7.35 (m, 2H, H-3 Ts), 5.10 (m, 1H, H-6), 4.92 (td, 1H, *J*_{16,H} = 7.8 Hz, *J*_{16,15ax} = 4.7 Hz, H-16), 3.84 (dd, 1H, *J*_{26a,26b} = 9.5 Hz, *J*_{26a,25} = 5.8 Hz, H-26a), 3.80 (dd, 1H, *J*_{26b,26a} = 9.5 Hz, *J*_{26b,25} = 6.2 Hz, H-26b), 3.52 (m, 1H, H-3), 2.90 (dq, *J*_{20,17} = 11.0 Hz, *J*_{20,21} = 7.1 Hz, 1H, H-20), 2.57 (ddd, 1H, *J*_{23a,23b} = 17.8 Hz, *J*_{23a,24a} = 9.7 Hz, *J*_{23a,24b} = 6.0 Hz, H-23a), 2.44 (s, 3H, CH₃ Ts), 2.35 (m, 1H, H-15a), 2.31 (m, 1H, H-4a), 2.28 (m, 1H, H-23b), 2.12 (ddd, 1H, *J*_{4b,4a} = 13.4 Hz, *J*_{4b,3} = 5.0 Hz, *J*_{4b,H} = 1.9 Hz, H-4b), 1.92 (s, 3H, OCOCH₃), 1.88 (m, 1H, H-12ec), 1.85 (m, 2H, H-7a, H-17), 1.76 (m, 1H, H-25), 1.68 (m, 1H, H-1a), 1.67 (m, 1H, H-2a), 1.58 (m, 2H, H-2b, 24a), 1.45 (m, 2H, H-11a, H-8), 1.41 (m, 2H, H-7b, H-11b), 1.31 (m, 1H, H-24b), 1.19 (m, 1H, H-12ax), 1.08 (d, 3H, *J*_{21,20} = 7.2 Hz, H-21), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃).

0.98 (m, 1H, H-15b), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.94 (m, 1H, H-14), 0.88 (d, 3H, $J_{27,25} = 7.0$ Hz, H-27), 0.84 (m, 2H, H-1b, H-9), 0.83 (s, 3H, H-18). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 212.6 (C-22), 169.9 (OCOCH₃), 144.9 (C-1 Ts), 141.3 (C-5), 135.9 (x2), 135.9 (x2) (Ar-Cm), 134.9, 134.8 (Ar-Cipso), 133.0 (C-4 Ts), 130.0 (C-3 Ts), 129.6, 129.6 (Ar-Cp), 128.0 (C-2 Ts), 127.6 (x2), 127.6 (x2) (Ar-Co), 120.9 (C-6), 75.8 (C-16), 74.8 (C-26), 73.2 (C-3), 55.1 (C-17), 54.1 (C-14), 49.9 (C-9), 43.6 (C-20), 42.5 (C-4), 41.9 (C-13), 39.7 (C-12), 38.2 (C-23), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-15), 32.6 (C-25), 31.9 (C-2), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 27.1 (C(CH₃)₃), 26.5 (C-24), 21.8 (CH₃ Ts), 21.3 (OCOCH₃), 20.8 (C-11), 19.5 (C-19), 19.2 (C(CH₃)₃), 16.8 (C-21), 16.4 (C-27), 13.3 (C-18). HRESI-MS calculado para C₅₂H₇₀NaO₇SSi ([M+Na]⁺): 889.4504, observado: 889.4491.

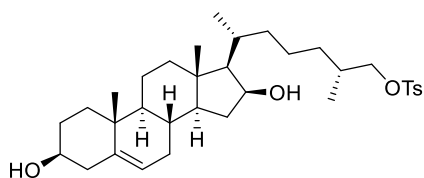


Acetato de (25R)-26-(bencilselanil)-3 β -terc-butildifenilsililoxi-22-oxocolest-5-en-16 β -ilo (39). A una solución del derivado **35** (0.17 g, 0.21 mmol) en una mezcla anhidra 5:3 MeOH-THF (6 mL) se añadió BnBr (0.1 mL, 0.84 mmol) y NaBH₄ (9.0 mg, 0.24 mmol) a 0 °C y bajo Ar. La mezcla se mantuvo en agitación a 0 °C por 30 min. Posteriormente el disolvente se evaporó, el residuo se diluyó con AcOEt y se lavó con una solución saturada de NH₄Cl (2 \times 5 mL). El producto se purificó por cromatografía en columna (19:1 hexano-AcOEt) para dar el compuesto **39** como un aceite incoloro (0.12 g, 68%). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (m, 4H, Ar-Hm), 7.41 (m, 2H, Ar-Hp), 7.36 (m, 4H, Ar-Ho), 7.27 (m, 4H, Ar-H), 7.20 (m, 1H, Ar-Hp), 5.10 (m, 1H, H-6), 4.93 (td, 1H, $J_{16,\text{H}} = 7.8$ Hz, $J_{16,15\text{ax}} = 4.8$ Hz, H-16), 3.74 (s, 2H, CH₂Ph), 3.51 (m, 1H, H-3), 2.90 (dq, 1H, $J_{20,17} = 11.1$ Hz, $J_{20,21} = 7.1$ Hz, H-20), 2.50 (ddd, 1H, $J_{23\text{a},23\text{b}} = 17.6$ Hz, $J_{23\text{a},\text{H}} = 10.1$ Hz, $J_{23\text{a},\text{H}} = 5.7$ Hz, H-23a), 2.48 (dd, 1H, $J_{26\text{a},26\text{b}} = 12.1$ Hz, $J_{26\text{a},25} = 5.5$ Hz, H-26a), 2.36 (m, 1H, H-15a), 2.36 (dd, 1H, $J_{26\text{b},26\text{a}} = 12.1$ Hz, $J_{26\text{b},25} = 7.4$ Hz, H-26b), 2.31 (m, 1H, H-4a), 2.25 (ddd, 1H, $J_{23\text{b},23\text{a}} = 17.6$ Hz, $J_{23\text{b},\text{H}} = 10.3$ Hz, $J_{23\text{b},\text{H}} = 5.1$ Hz, H-23b), 2.12 (ddd, 1H, $J_{4\text{b},4\text{a}} = 13.4$ Hz, $J_{4\text{b},3} = 4.8$ Hz, $J_{4\text{b},\text{H}} = 1.8$ Hz, H-4b), 1.93 (s, 3H, OCOCH₃), 1.88 (m, 1H, H-12a), 1.86 (m, 1H, H-17), 1.85 (m, 1H, H-7a), 1.68 (m, 1H, H-1a), 1.67 (m, 1H, H-2a),

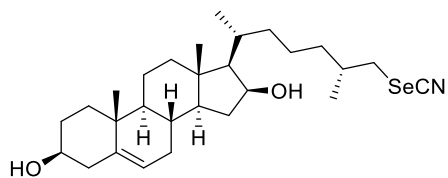
1.66 (m, 1H, H-24a), 1.58 (m, 1H, H-2b), 1.57 (m, 1H, H-25), 1.45 (m, 1H, H-8), 1.45 (m, 2H, H-11), 1.41 (m, 1H, H-7b), 1.32 (m, 1H, H-24b), 1.19 (m, 1H, H-12b), 1.09 (d, $J_{21,20} = 7.2$ Hz, 3H, H-21), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.98 (m, 1H, H-15b), 0.95 (m, 1H, H-14), 0.92 (d, $J_{27,25} = 6.7$ Hz, 3H, H-27), 0.84 (m, 1H, H-1b), 0.84 (m, 1H, H-9), 0.83 (s, 3H, H-18). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 213.1 (C-22), 169.9 (OCOCH₃), 141.3 (C-5), 139.6 (Ar-Cipso), 135.9 (x2), 135.9 (x2) (Ar-Cm), 134.9, 134.8 (Ar-Cipso), 129.6, 129.6 (Ar-Cp), 129.0 (x2) (Ar-C), 128.6 (x2) (Ar-C), 127.6 (x2), 127.6 (x2) (Ar-Co), 126.8 (Ar-Cp), 120.9 (C-6), 75.9 (C-16), 73.2 (C-3), 55.1 (C-17), 54.1 (C-14), 49.9 (C-9), 43.6 (C-20), 42.5 (C-4), 41.9 (C-13), 39.7 (C-12), 38.7 (C-23), 37.2 (C-1), 36.5 (C-10), 34.9 (C-15), 33.5 (C-25), 32.1 (C-26), 31.9 (C-2), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 30.3 (C-24), 27.7 (CH₂Ph), 27.1 (C(CH₃)₃), 21.3 (OCOCH₃), 20.8 (C-11), 19.9 (C-27), 19.5 (C-19), 19.3 (C(CH₃)₃), 16.9 (C-21), 13.3 (C-18).



(25R)-Colest-5-eno-3β,16β,26-triol (40). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Martin *et al.*⁸² A una solución de diosgenina (**31**) (1.0 g, 2.41 mmol) en EtOH (227 mL) se añadió Zn en polvo (20.40 g, 0.31 mol). La mezcla se colocó a reflujo y durante 1 h se añadió HCl al 18.5% (182 mL). La reacción se mantuvo a reflujo por 0.5 h, posteriormente el Zn se filtró de la solución caliente, el filtrado se dejó enfriar a t.a. y se añadió H₂O y Et₂O hasta que se formaron dos fases. La fase orgánica se lavó con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (3×150 mL) y salmuera (2×150 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 hexano-AcOEt) para obtener el derivado **40** como un sólido blanco (0.70 g, 70%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



Tosilato de (25R)-3β,16β-dihidroxicolest-5-en-26-ilo (41). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Poza *et al.*⁸⁴ A una solución del derivado **40** (0.70 g, 1.67 mmol) en piridina anhidra (7 mL) se añadió TsCl (1.96 g, 16.5 mmol) disuelto en piridina anhidra (7 mL) a 0 °C y bajo Ar. La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. por 1 h. Después de este tiempo, se añadió H₂O fría (10 mL) y el producto se extrajo con Et₂O (3×15 mL). La fase orgánica se lavó con una solución de HCl al 5% (4×20 mL) y salmuera (2×20 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (4:1 hexano-AcOEt) para obtener el derivado **41** como una espuma blanca (0.54 g, 56%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



Selenocianato de (25R)-3β,16β-dihidroxicolest-5-en-26-ilo (42). A una solución del compuesto **41** (0.12 g, 0.20 mmol) en THF anhidro (7 mL) se añadió KSeCN (0.15 g, 1.01 mmol) bajo Ar. La mezcla se mantuvo a reflujo por 9.5 h en la oscuridad, después de este tiempo el disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (4:1 hexano-AcOEt) para obtener el compuesto **42** como un aceite incoloro (89 mg, 87%). $[\alpha]_D^{21}$ -14 (*c* 1.12, CH₂Cl₂). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 5.33 (m, 1H, H-6), 4.33 (td, 1H, $J_{16,H} = 7.8$ Hz, $J_{16,15ax} = 4.6$ Hz, H-16), 3.5 (m, 1H, H-3), 3.14 (dd, 1H, $J_{26a,26b} = 12.0$ Hz, $J_{26a,25} = 5.6$ Hz, H-26a), 2.90 (dd, 1H, $J_{26b,26a} = 12.0$ Hz, $J_{26b,25} = 7.4$ Hz, H-26b), 2.28 (m, 1H, H-4a), 2.23 (m, 1H, H-15ec), 2.22 (m, 1H, H-4b), 1.99 (dt, 1H, $J_{12ec,12ax} = 12.6$ Hz, $J_{12ec,H} = 3.6$ Hz, H-12ec), 1.96 (m, 1H, H-2a), 1.93 (m, 1H, H-25), 1.84 (m, 1H, H-20), 1.82 (m, 2H, H-1a, H-7a), 1.55 (m, 1H, H-22a), 1.52 (m, 1H, H-8), 1.50 (m, 1H, H-2b), 1.47 (m, 2H, H-11), 1.46 (m, 1H, H-7b), 1.41 (m, 1H, H-23a), 1.40 (m, 1H, H-24a), 1.30 (m, 2H, H-24b, H-23b), 1.15 (dt, 1H, $J_{15ax,H} = 13.4$ Hz, $J_{15ax,16} = 4.6$ Hz, H-15ax), 1.10 (m, 1H, H-12ax), 1.06 (m, 1H, H-22b), 1.05 (m, 1H, H-1b), 1.04 (d,

3H, $J_{27,25} = 6.7$ Hz, H-27), 1.0 (s, 3H, H-19), 0.97 (m, 1H, H-17), 0.96 (d, 3H, $J_{21,20} = 6.7$ Hz, H-21), 0.91 (m, 1H, H-9), 0.87 (s, 3H, H-18), 0.85 (m, 1H, H-14). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 140.9 (C-5), 121.5 (C-6), 102.5 (SeCN), 72.4 (C-16), 71.8 (C-3), 61.4 (C-17), 54.5 (C-14), 50.1 (C-9), 42.3 (C-4), 42.3 (C-13), 39.9 (C-12), 37.9 (C-26), 37.2 (C-1), 37.0 (C-15), 36.6 (C-10), 36.1 (C-24), 35.8 (C-22), 34.2 (C-25), 31.9 (C-2), 31.6 (C-7), 31.5 (C-8), 29.8 (C-20), 23.6 (C-23), 20.8 (C-11), 19.5 (C-19), 19.5 (C-27), 18.2 (C-21), 13.2 (C-18). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NNaO}_2^{80}\text{Se}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 530.2508, observado: 530.2501.

1.6.3 Pruebas de antiproliferación

La actividad antiproliferativa de los derivados sintetizados se evaluó en el BioLab, Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” (IUBO-AG) de la Universidad de la Laguna (La Laguna, España) por el Dr. José M. Padrón.

Los derivados esteroidales se evaluaron en diferentes concentraciones en 6 líneas celulares de cáncer humano: A549 y SW1573 para cáncer de pulmón, HBL-100 y T-47D para cáncer de mama, HeLa para cáncer cervicouterino y WiDr para cáncer de colon.

La actividad antiproliferativa *in vitro* se evaluó usando el ensayo de sulforhodamina B (SRB) con pequeñas modificaciones.⁸⁶ Los derivados sintetizados se disolvieron en DMSO a una concentración inicial de 40.0 mM. Las células fueron inoculadas en una microplaca de 96 pocillos en un volumen de 100 μL por pocillo a densidades de 2500 (A549, HBL-100, HeLa y SW1573), 5000 (T-47D y WiDr) o 10000 (BJ-hTert) células por pocillo, de acuerdo a sus tiempos de duplicación. Las células control se expusieron a una concentración equivalente de DMSO (0.25% v/v, control negativo). Cada agente fue evaluado por triplicado a diferentes diluciones en el rango de 1–100 μM . El tratamiento con el compuesto se comenzó en el día 1 después de sembrar. El tiempo de incubación con el compuesto fue de 48 horas, después de este tiempo las células fueron precipitadas con 25 μL de ácido tricloroacético enfriado al 50% (m/v) y fijadas por 60 min a 4 °C. Posteriormente se realizó el ensayo SRB. La densidad óptica (DO) de cada pocillo fue medida a 530 nm, usando un lector de microplacas BioTek PowerWave XS.

Los valores se corrigieron para el fondo de DO a partir de pocillos que contenían solo medio. El porcentaje de crecimiento (PC) se calculó en relación a las células control sin tratar (C) en cada nivel de concentración de compuesto, basado en la diferencia en DO al inicio (T_0) y al final (T) de la exposición al compuesto, de acuerdo a las fórmulas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, si T es mayor que o igual a T_0 , el cálculo es $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$. Si T es menor a T_0 , indicando muerte celular, el cálculo es $100 \times [(T-T_0)/(T_0)]$. El efecto es definido como porcentaje de crecimiento, donde el 50% de inhibición del crecimiento (GI_{50}) representa la concentración a la cual el PC es +50. Con estos cálculos, un valor de PC de 0 no representa ninguna diferencia desde el inicio de la exposición al compuesto, mientras que un valor negativo de PC denota muerte celular.⁸⁷

1.7 Bibliografía

1. Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274.
2. Kethireddy, S.; Eppakayala, L.; Maringanti, T. C. *Chem. Cent. J.* **2015**, *9*, 51.
3. Wagh, S. P. *Am. J. PharmTech. Res.* **2015**, *5*, 153–159.
4. Xie, M.; Lapidus, R. G.; Sadowska, M.; Edelman, M. J.; Hosmane, R. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 2595–2602.
5. Martins, P.; Jesus, J.; Santos, S.; Raposo, L. R.; Roma-Rodrigues, C.; Baptista, P. V.; Fernandes, A. *R. Molecules* **2015**, *20*, 16852–16891.
6. Kouadri, Y.; Ouahrani, M. R.; Missaoui, B. E.; Chebrouk, F.; Gherraf, N. *Asian J. Chem.* **2015**, *27*, 3675–3680.
7. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry. 4a ed.* Cap. 19, p. 681, John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, **2011**.
8. Abdelhalim, M. M.; El-Saidi, M. M. T.; Rabie, S. T.; Elmegeed, G. A. *Steroids* **2007**, *72*, 459–465.
9. Lange, C.; Holzhey, N.; Schönecker, B.; Beckert, R.; Möllmann, U.; Dahse, H. -M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3357–3362.
10. Krstić, N. M.; Bjelaković, M. S.; Pavlović, V. D.; Robeyns, K.; Juranić, Z. D.; Matić, I.; Novaković, I.; Sladic, D. M. *Steroids* **2012**, *77*, 558–565.
11. Rapi, G.; Ginanneschi, M.; Chelli, M.; Chimichi, S. *Steroids* **1985**, *46*, 665–676.
12. Merlani, M. I.; Kemertelidze, E. P.; Papadopoulos, K.; Men'shova, N. I. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2004**, *30*, 497–501.
13. El-Far, M.; Elmegeed, G. A.; Eskander, E. F.; Rady, H. M.; Tantawy, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3936–3946.
14. Frank, É.; Mucsi, Z.; Zupkó, I.; Réthy, B.; Falkay, G.; Schneider, G.; Wölfling, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3894–3904.
15. Bahashwan, S. A. E.-R.; Al-Omar, M. A. E.-R.; Ezzeldin, E.; Abdalla, M. M.; Fayed, A. A. E.-H.; Amr, A.-G. E.-S. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1363–1368.
16. Abdelhalim, M. M.; Kamel, E. M.; Rabie, S. T.; Mohamed, N. R. *Steroids* **2011**, *76*, 78–84.
17. Abdalla, M. M.; Al-Omar, M. A.; Bhat, M. A.; Amr, A.-G. E.; Al-Mohizea, A. M. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 1127–1132.
18. Al-Mohizea, A. M.; Al-Omar, M. A.; Abdalla, M. M.; Amr, A.-G. E. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *50*, 171–179.
19. Burger, M. T.; Bartlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12697–12698.
20. Fang, Z.; Song, Y.; Zhan, P.; Zhang, Q.; Liu, X. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 885–901.

21. Kim, Y.-K.; Arai, M. A.; Arai, T.; Lamenzo, J. O.; Dean, E. F. III; Patterson, N.; Clemons, P. A.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14740–14745.
22. Merino-Montiel, P.; Maza, S.; Martos, S.; López, Ó.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 582–592.
23. Plano, D.; Sanmartín, C.; Moreno, E.; Prior, C.; Calvo, A.; Palop, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6853–6859.
24. Rooprai, H. K.; Kyriazis, I.; Nuttall, R. K.; Edwards, D. R.; Zicha, D.; Aubyn, D.; Davies, D.; Gullan, R.; Pilkington, G. J. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 1263–1271.
25. a) Segaloff, A.; Gabbard, R. B. *Steroids* **1965**, *5*, 219–240, b) Rodrigues, O. E. D.; de Souza, D.; Soares, L. C.; Dornelles, L.; Burrow, R. A.; Appelt, H. R.; Alves, C. F.; Alves, D.; Braga, A. L. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2237–2240, c) Sadek, S. A.; Shaw, S. M.; Kessler, W. V.; Wolf, G. C. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3259–3262.
26. a) Viñas-Bravo, O.; Martínez-Pascual, R.; Vega-Baez, J. L.; Gómez-Calvario, V.; Sandoval-Ramírez, J.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; López-De Rosas, A.; Martínez-Montiel, M.; Reyes, M.; Ruiz, J. A. *Steroids* **2012**, *77*, 59–66, b) Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Sánchez-Sánchez, L.; López-Muñoz, H.; Escobar Sánchez, M. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 451–460.
27. Romero-Hernández, L. L.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; Abasolo, I.; Schwartz Jr., S.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *99*, 67–81.
28. Fuentes-Aguilar, A.; Romero-Hernández, L. L.; Arenas-González, A.; Merino-Montiel, P.; Montiel-Smith, S.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; Plata, G. B.; Padrón, J. M.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. *Org. Biom. Chem.* **2017**, *15*, 5041–5054.
29. McNaught, A. D.; Wilkinson, A. (Compilado por). *Compendium of Chemical Terminology*, 2a ed. (the "Gold Book"). IUPAC. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML versión corregida on-line: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) creada por M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; actualizaciones compliadas por A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
30. Eicher, T.; Hauptmann, S. *The Chemistry of Heterocycles*. 2a ed. 2003, p. 1. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA.
31. Kakeya, H.; Morishita, M.; Koshino, H.; Morita, T.; Kobayashi, K.; Osada, H. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1052–1053.

32. Mullen, G.; Napier, J.; Balestra, M.; DeCory, T.; Hale, G.; Macor, J.; Mack, R.; Loch III, J.; Wu, E.; Kover, A.; Verhoest, P.; Sampognaro, A.; Phillips, E.; Zhu, Y.; Murray, R.; Griffith, R.; Blosser, J.; Gurley, D.; Machulskis, A.; Zongrone, J.; Rosen, A.; Gordon, J. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4045–4050.
33. Kearney, J. A.; Barbadora, K.; Mason, E. O.; Wald, E. R.; Green, M. *Int. J. Antimicrob. Agents* **1999**, *12*, 141–144.
34. Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Aldrichimica Acta* **1997**, *30*, 3–12.
35. Baltzly, R.; Buck, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 164–167.
36. Newman, M. S.; Kutner, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 4199–4204.
37. Falb, E.; Nudelman, A.; Hassner, A. *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 2839–2844.
38. Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835–875.
39. Espino, C. G.; Du Bois, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 598–600.
40. Levites-Agababa, E.; Menhaji, E.; Perlson, L. N.; Rojas, C. M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 863–865.
41. Padwa, A.; Stengel, T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2137–2139.
42. Schindler, C. S.; Stephenson, C. R. J.; Carreira, E. M.; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 8984–8987.
43. Sadeghzadeh, S. M. *Appl. Organometal. Chem.* **2016**, *30*, 835–842.
44. Song, Q.-W.; Zhou, Z.-H.; Wang, M.-Y.; Zhang, K.; Liu, P.; Xun, J.-Y.; He, L.-N. *ChemSusChem.* **2016**, *9*, 1–6.
45. Ando, O.; Satake, H.; Itoi, K.; Sato, A.; Nakajima, M.; Takahashi, S.; Haruyama, H.; Ohkuma, Y.; Kinoshita, T.; Enokita, R. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1165–1168.
46. Sakuda, S.; Isogai, A.; Matsumoto, S.; Suzuki, A. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 296–300.
47. Bosc, J. J.; Jarry, C.; Carpy, A.; Panconi, E.; Descas, P. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 437–442.
48. Chen, J. J.; Liu, Q.; Yuan, C.; Gore, V.; Lopez, P.; Ma, V.; Amegadzie, A.; Qian, W.; Judd, T. C.; Minatti, A. E.; Brown, J.; Cheng, Y.; Xue, M.; Zhong, W.; Dineen, T. A.; Epstein, O.; Human, J.; Kreiman, C.; Marx, I.; Weiss, M. M.; Hitchcock, S. A.; Powers, T. S.; Chen, K.; Wen, P. H.; Whittington, D. A.; Cheng, A. C.; Bartberger, M. D.; Hickman, D.; Werner, J. A.; Vargas, H. M.; Everds, N. E.; Vonderfecht, S. L.; Dunn II, R. T.; Wood, S.; Fremeau Jr., R. T.; White, R. D.; Patel, V. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 767–774.
49. Wittekind, R. R.; Rosenau, J. D.; Poos, G. I. *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 444–446.
50. Poos, G. I.; Carson, J. R.; Rosenau, J. D.; Roszkowski, A. P.; Kelley, N. M.; McGowin, J. *J. Med. Chem.* **1963**, *6*, 266–272.
51. López, Ó.; Maya, I.; Ulgar, V.; Robina, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4313–4316.
52. Merino-Montiel, P.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. *RSC Advances* **2012**, *2*, 11326–11335.

53. Aguilar-Moncayo, M.; Díaz-Pérez, P.; García Fernández, J. M.; Ortiz Mellet, C.; García-Moreno, M. I. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 681–689.
54. Strambeanu, I. I.; White, M. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12032–12037.
55. Schwarz, K.; Bieri, J. G.; Briggs, G. M.; Scott, M. L. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1957**, *95*, 621–625.
56. Gladyshev, V. N. Selenoproteins and Selenoproteomes. En: Hatfield, D. L.; Berry, M. J.; Gladyshev, V. N. (eds.), *Selenium: It's molecular biology and role in human health. 3a ed.* Cap. 9, pp. 109–123, Springer, New York, **2012**.
57. Shamberger, R. J.; Frost, D. V. *Can. Med. Assoc. J.* **1969**, *100*, 682.
58. Shamberger, R. J.; Willis, C. E. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1971**, *2*, 211–221.
59. Combs, G. F., Jr.; Combs, S. Selenium and cancer. En: Combs, G. F., Jr.; Combs, S. B. (eds.), *The Role of Selenium in Nutrition*, Cap. 10, pp. 413–462, Academic Press, San Diego, **1986**.
60. Jackson, M. I.; Combs, G. F., Jr. Selenium as cancer preventive agent. En: Hatfield, D. L.; Berry, M. J.; Gladyshev, V. N. (eds.), *Selenium: It's molecular biology and role in human health. 3a ed.* Cap. 24, pp. 313–323, Springer, New York, **2012**.
61. Madhunapantula, S. V.; Desai, D.; Sharma, A.; Huh, S. J.; Amin, S.; Robertson, G. P. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1297–1308.
62. Domínguez-Álvarez, E.; Plano, D.; Font, M.; Calvo, A.; Prior, C.; Jacob, C.; Palop, J. A.; Sanmartín, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *73*, 153–166.
63. Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, *53*, 126–130.
64. Fernández-Herrera, M. A.; López-Muñoz, H.; Hernández-Vázquez, J. M. V.; López-Dávila, M.; Escobar-Sánchez, M. L.; Sánchez-Sánchez, L.; Pinto, B. M.; Sandoval-Ramírez, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 2474–2484.
65. Van Nhien, A. N.; Domínguez, L.; Tomassi, C.; Torres, M. R.; Len, C.; Postel, D.; Marco-Contelles, J. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 4709–4727.
66. Hirschmann, R.; Snoddy Jr., C. S.; Hiskey, C. F.; Wendler, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 4013–4025.
67. Mostafa, Y.A.; Taylor, S. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1535–1544.
68. Farhane, S.; Fournier, M.-A.; Maltais, R.; Poirier, D. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2434–2440.
69. Perron, V.; Rabouin, D.; Asselin, É.; Parent, S.; C.-Gaudreault, R.; Bérubé, G. *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 1–15.
70. Lam, H.-Y. P.; Begleiter, A.; Goldenberg, G. J. *J. Med. Chem.* **1979**, *22*, 200–202.

71. López, Ó.; Maza, S.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9058–9069.
72. Zhiyu, W.; Yue, C.; Neng, W.; Mei, W. D.; Wei, L. Y.; Feng, H.; Gang, S. J.; De Po, Y.; Yuan, G. X.; Jian-Ping, C. *Cancer Biol. Ther.* **2012**, *13*, 138–147.
73. Patel, K.; Gadewar, M.; Tahilyani, V.; Patel, D. K. *Nat. Prod. Bioprospect* **2012**, *2*, 46–52.
74. Raju, J.; Mehta, R. *Nutr. Cancer* **2009**, *61*, 27–35.
75. Hanessian, S.; Lavalle, P. *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 2975–2977.
76. Cheng, M. S.; Wang, Q. L.; Tian, Q.; Song, H. Y.; Liu, Y. X.; Li, Q.; Xu, X.; Miao, H. D.; Yao, X. S.; Yang, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3658–3662.
77. Rincón, S.; del Río, R. E.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S.; Fernández, M. A.; Farfán, N.; Santillan, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2594–2602.
78. Hilario-Martínez, J. C.; Zeferino-Díaz, R.; Muñoz-Hernández, M. A.; Hernández-Linares, M. G.; Cabellos, J. L.; Merino, G.; Sandoval-Ramírez, J.; Jin, Z.; Fernández-Herrera, M. A. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1772–1775.
79. Ireland, R. E.; Gleason, J. L.; Gegnas, L. D.; Highsmith, T. K. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6856–6872.
80. Williams, J. R.; Chai, D.; Bloxton, J. D., II; Gong, H.; Solvibile, W. R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3183–3188.
81. Arunachalam, T.; MacKoul, P. J.; Green, N. M.; Caspi, E. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2966–2968.
82. Martin, R.; Schmidt, A. W.; Theumer, G.; Krause, T.; Entchev, E. V.; Kurzchalia, T. V.; Knölker, H.-J. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 909–920.
83. Kürti, L.; Czako, B. *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, p. 92, Elsevier Academic Press, San Diego, **2005**.
84. Poza, J.; Rega, M.; Paz, V.; Alonso, B.; Rodríguez, J.; Salvador, N.; Fernández, A.; Jiménez, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4722–4740.
85. Shoemaker, R. H. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813–823.
86. Castillo, Q. A.; Triana, J.; Eiroa, J. L.; Calcul, L.; Rivera, E.; Wojtas, L.; Padrón, J. M.; Boberiet, L.; Keramane, M.; Abel-Santos, E.; Báez, L. A.; Germosén, E. A. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 907–913.
87. Romero-Hernández, L. L.; Merino-Montiel, P.; Meza-Reyes, S.; Vega-Báez, J. L.; López, Ó.; Padrón, J. M.; Montiel-Smith, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 21–32.

Capítulo II. Glicoclusters derivados de lactosa y α -GalNAc

2.1 Introducción

Las lectinas son proteínas que se unen a carbohidratos presentes en proteínas y lípidos (glicoconjugados) en la membrana celular y en matrices extracelulares. Se unen a mono- y oligosacáridos de manera reversible y no covalente, con una alta afinidad y especificidad. Se diferencian de las enzimas específicas de azúcar (quinasas, glicosidasas, glicosiltransferasas) al no modificar el sustrato al que se unen y de los anticuerpos específicos de carbohidratos en que no son producto de una respuesta inmunitaria.

Las lectinas se encuentran presentes en la mayoría de organismos vivos (desde virus y bacterias hasta plantas y animales) y juegan un papel importante en funciones biológicas, desde la mediación de la adhesión celular y la promoción de interacciones célula-célula hasta el reconocimiento de patógenos.¹ Se cree que las lectinas en plantas actúan en el mecanismo de defensa contra diferentes tipos de organismos y animales predadores.² En el caso de virus y bacterias, las lectinas realizan el proceso de reconocimiento de carbohidratos presentes en la membrana celular del huésped iniciando el proceso de infección.³

Estas proteínas contienen generalmente dos o más sitios de unión de carbohidratos, son di- u oligovalentes, por lo que al interactuar con los carbohidratos en la superficie de las células se puede llevar a cabo un entrecruzamiento (*cross-linking*), lo que conlleva al aglutinamiento de las células y a su precipitación. La aglutinación de eritrocitos o hemaglutinación ha encontrado su uso en la detección y caracterización del grupo sanguíneo (sistema ABO).⁴

Estos procesos de aglutinación y precipitación causados por lectinas pueden prevenirse o inhibirse por un carbohidrato por el que la lectina sea específica; sin embargo, la afinidad de enlace de una lectina con su carbohidrato generalmente es baja para un solo “dominio de

reconocimiento de carbohidrato” (DRC), se requieren interacciones multivalentes entre muchos DRCs y múltiples carbohidratos para producir una respuesta relevante in vivo.⁵

La inhibición de acoplamiento entre lectinas y carbohidratos también encuentran su aplicación en los casos en donde la unión receptor-carbohidrato produce una respuesta celular dañina para el organismo, tal es el caso de la toxicidad ejercida por lectinas de plantas o la desregulación inmune/invasión de tumores; por lo que el diseño de inhibidores personalizados que impidan el acoplamiento de lectinas no deseables a las células se ha vuelto un objetivo atractivo en el campo de la química medicinal.

2.2 Antecedentes

2.2.1 Tipos de lectinas

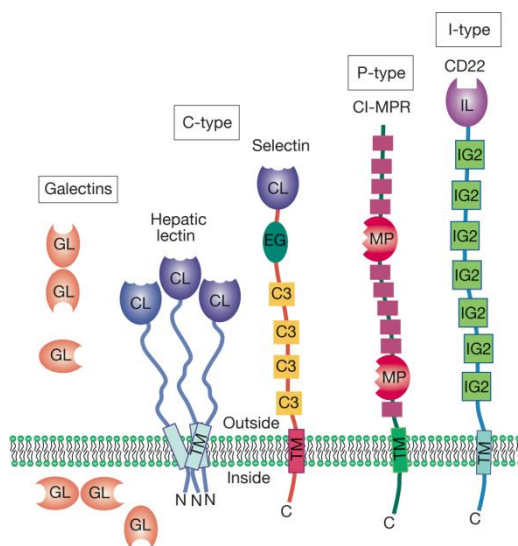


Figura 2.1 Clasificación de lectinas animales de acuerdo a la estructura de su proteína. Tomado de Essentials of Glycobiology, 2da edición.

Las lectinas pueden clasificarse de acuerdo al monosacárido al cual poseen mayor afinidad. De todos los monosacáridos que se encuentran en la naturaleza, las lectinas reconocen unos pocos, principalmente manosa, glucosa, galactosa/*N*-acetilgalactosamina, *N*-acetilglucosamina, fucosa y ácido *N*-acetilneuramínico.³ Las lectinas animales, sin embargo, se clasifican en familias de

acuerdo a la estructura de la proteína: lectinas tipo C, lectinas tipo S (galectinas), lectinas tipo P y lectinas tipo I (**Figura 2.1**).

2.2.1.1 Galectinas (Lectinas tipo S)

Las galectinas (GALs) son una familia de lectinas animales con DRCs específicas de β -galactósidos, se combinan preferentemente con lactosa y *N*-acetil-lactosamina. Representan la clase de lectinas más ampliamente expresada en todos los organismos y están implicadas en una gran diversidad de procesos biológicos intracelulares (interactuando con proteínas citoplasmáticas y nucleares para modular vías de señalización) y extracelulares (interactuando con glicoproteínas y glicolípidos en la membrana celular y la matriz extracelular) tales como la adhesión célula-célula, el transporte de vesículas intracelulares, el crecimiento celular y la apoptosis.

Se sabe que algunas galectinas (GAL3, GAL9 y GAL12) están implicadas en el cáncer, la obesidad y la diabetes, en donde juegan diferentes roles fisiológicos.⁶ Algunas investigaciones indican que en el cáncer contribuyen a la progresión del tumor a través de una variedad de mecanismos (transformación neoplástica, supervivencia de células tumorales, angiogénesis y metástasis del tumor, **Figura 2.2**), mientras los ayudan a escapar de la vigilancia inmune al modular las respuestas inmunes y antiinflamatorias.¹ Se ha observado que las galectinas se encuentran sobreexpresadas en células tumorales y enfermedades de la sangre.

Las galectinas han atraído la atención de muchos grupos de investigación debido a su gran diversidad y amplia distribución en los organismos. La evidencia de su participación en diversos aspectos de la biología del cáncer, ha posicionado a las galectinas como objetivos potenciales contra el tratamiento de este padecimiento.

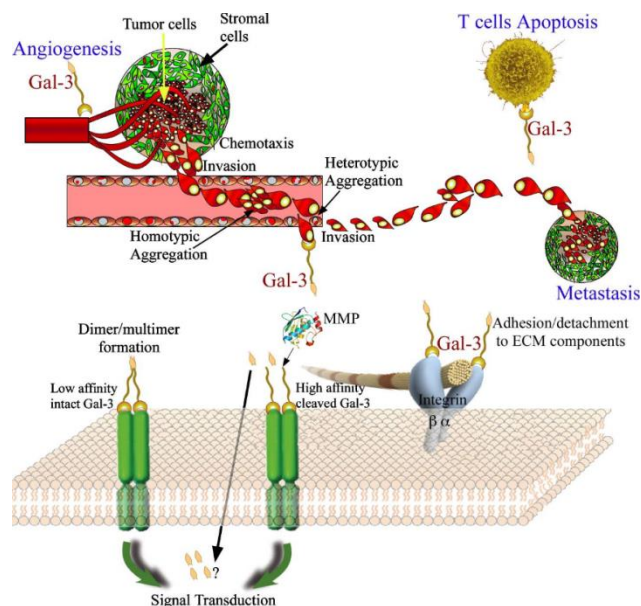


Figura 2.2 GAL3 contribuyendo a la progresión de un tumor. Tomado de *Cancer Microenvironment* **2008**, *1*, 43-51.

2.2.1.2 Lectina tipo C en macrófagos

La lectina tipo C de tipo galactosa en macrófagos (MGL macrophage galactose-type C-type lectin) es un receptor expresado por macrófagos activados y células dendríticas inmaduras (iCDs), el cual se une a residuos α - o β -*N*-acetilgalactosamina (GalNAc) de *N*- y *O*-glicanos transportados por glicoproteínas y/o glicoesfingolípidos.⁷

Las CD son las células presentadoras de antígeno más potentes del sistema inmune. Juegan un papel esencial en la recepción de antígenos y antígenos asociados a patógenos, dirigiendo la respuesta inmunitaria.⁸ Las CD se encargan de escanear los cambios en el ambiente a través de diferentes tipos de receptores para eliminar los nuevos patógenos, estos receptores son altamente especializados e incluyen receptores de lectinas tipo C y receptores tipo Toll.

Las lectinas de la membrana celular de las CD están involucradas en el reconocimiento, recepción y presentación de sustancias extranjeras glicosiladas. La MGL expresada en iCDs es la única lectina de tipo C (tipo calcio) que se cree que participa en el reconocimiento/detección de moléculas auto-alteradas y patógenas debido a la especificidad por los monosacáridos

Gal/GalNAc.⁹ Además, las MGLs son capaces de activar las células T y por lo tanto activar la respuesta inmunitaria. Se ha reportado que la MGL permite a las CD4 a percibir la glicosilación y a reconocer selectivamente las glicoproteínas asociadas a un tumor.⁸

Con la importante actividad que la MGL presenta en el mejoramiento del rendimiento de iCD como células presentadoras de antígenos, mientras que juega un papel como sitio de entrada de reconocimiento de patógenos, la MGL ha llegado a ser un objetivo para entrada o bloqueo.¹⁰

2.2.2 Multivalencia

La membrana celular contiene proteínas y carbohidratos presentes en la bicapa lipídica distribuidos de manera heterogénea que tienen entre otras funciones la de reconocimiento (comunicar la presencia de nutrientes, toxinas o invasores presentes en el exterior de la célula) y unión celular (acoplamiento entre células, con la matriz celular o con patógenos). Estas funciones se llevan a cabo a través de la unión de ligandos específicos a los receptores en la membrana celular.¹¹

Sin embargo, muchas de estas interacciones no ocurren de manera aislada, sino de manera multivalente, es decir, mediante la unión simultánea de múltiples ligandos en una entidad biológica a múltiples receptores en otra. Por ejemplo, se sabe que el virus de la influenza se une a la célula huésped a través de una interacción polivalente entre la hemaglutinina del virus (HA) y los residuos de ácido siálico (SA) de la célula epitelial bronquial, iniciando con el proceso de infección.¹² Estas interacciones pueden ser inhibidas por una molécula que sea de igual manera polivalente, evitando así la unión del virus con la célula (**Figura 2.3**).

En lo que a esto respecta, los ligandos multivalentes naturales y sintéticos se han utilizado para estudiar dos tipos de interacciones con la membrana celular, aquellas interacciones en donde los ligandos multivalentes evitan la unión ligando-receptor (inhibidores) y aquellas interacciones en las que la unión del ligando multivalente induce una respuesta celular (efectores).

Los inhibidores multivalentes pueden interferir en una gran variedad de interacciones tales como la unión célula-célula, célula-matriz celular, célula-virus y célula-toxina; mientras que los efectores multivalentes son utilizados para entender, analizar y manipular vías de transducción de señales.

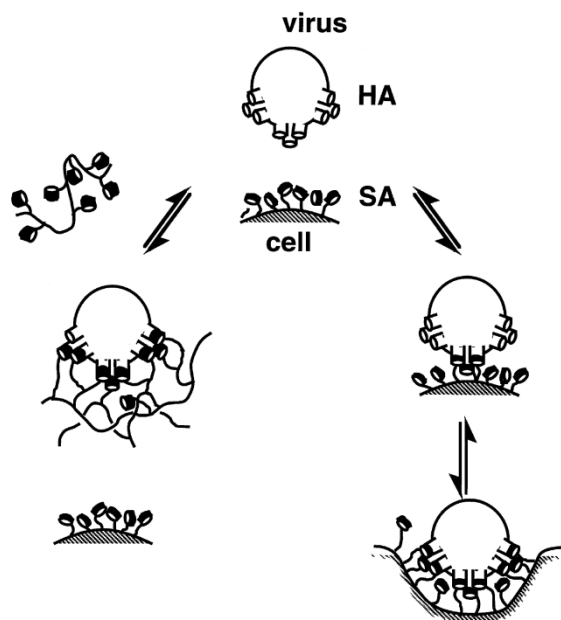


Figura 2.3 Interacción simultánea múltiple entre virus de la influenza y célula huésped. Tomado de *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754-2794.

Las interacciones polivalentes tienen características diferentes a las monovalentes, generalmente las primeras son más fuertes que las segundas. Esta mayor afinidad puede explicarse debido a los diferentes mecanismos de la unión ligando multivalente-receptor, por ejemplo, los ligandos multivalentes se pueden unir a receptores oligoméricos en la membrana celular (**Figura 2.4 a, efecto quelato**) o a múltiples receptores difundidos por la bicapa fluida (**Figura 2.4 b, efecto cluster**). Además, algunas proteínas tienen el sitio de unión principal y un subsitio de unión el cual puede ser ocupado por un ligando multivalente (**Figura 2.4 c, unión subsitio**). Finalmente, la gran cantidad de elementos de unión en los ligandos multivalentes hace que exista una mayor afinidad aun cuando solamente un receptor esté interaccionando (**Figura 2.4 d, efecto estadístico**).

Otro efecto de unión multivalente relevante es la inhibición mediante estabilización estérica, en este efecto el tamaño y la capa de hidratación del ligando multivalente inhibe la unión de otros ligandos a la célula.¹¹

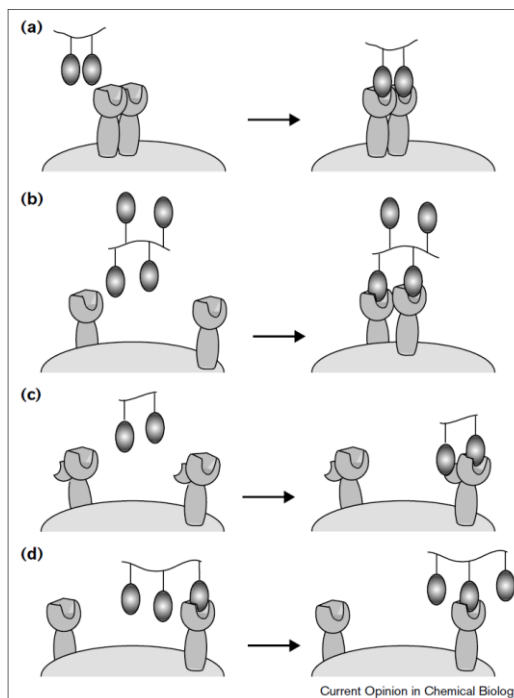


Figura 2.4 Mecanismos de interacción entre ligandos multivalentes y receptores celulares. Tomado de *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 696–703.

2.2.3 Glicoclusters de lactosa y GalNAc

El grupo del Profesor Murphy en Irlanda, se ha dedicado a la síntesis de glicoclusters derivados de GlcNAc, GalNAc y lactosa con actividad como inhibidores de lectinas. En estos estudios se ha observado que la capacidad inhibitoria del derivado depende de la geometría (cambios en el espaciador y/o posición de los azúcares deriva en la distancia de los carbohidratos), de la rigidez de la molécula (mayor actividad con derivados flexibles) y de las características químicas del espaciador. Además, han observado que la actividad de los compuestos es directamente proporcional al grado de valencia de éstos. De manera que los derivados tetravalentes son más activos respecto a los derivados tri- y bivalentes y estos a su vez que los azúcares libres.

En 2009 reportaron la síntesis de lactósidos basados en tereftalamidas, N,N' -diglucosiltereftalamidas y glicociclofanos y su actividad como inhibidores de la toxina de planta VAA (Aglutinina *Viscum album*) y de las lectinas humanas GAL3 y GAL4. El derivado en la **Figura 2.5** mostró mayor actividad como inhibidor de GAL3 con una $IC_{50} = 0.6$ mM, además mostró mayor protección de las células frente a la toxina de planta VAA.¹³

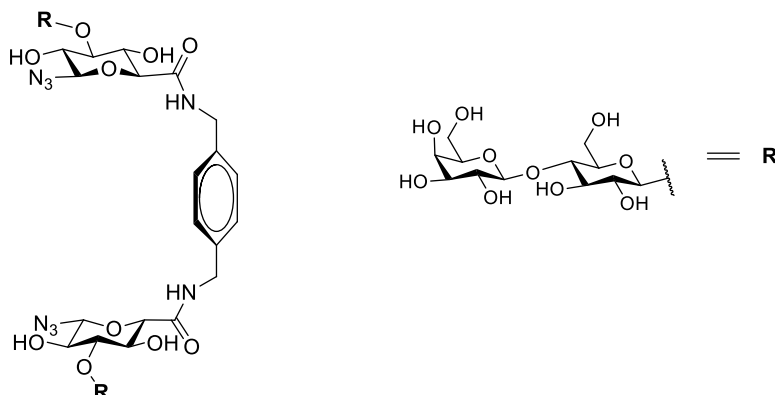


Figura 2.5 Glicocluster bivalente de lactosa con actividad como antitoxina e inhibidor de GAL3.

Más tarde en 2012 reportaron la síntesis de clusters de lactosa bi-, tri- y tetravalentes los cuales fueron probados como antitoxinas de VAA y como inhibidores de galectinas de pollo (CGs), organismo modelo que permite añadir información a las galectinas humanas. El derivado tetravalente mostró ser el inhibidor más activo contra VAA (**Figura 2.6**), siendo 20 veces más potente que la lactosa. Además lograron selectividad en las galectinas de pollo al añadir fucosa al carbohidrato.¹⁴

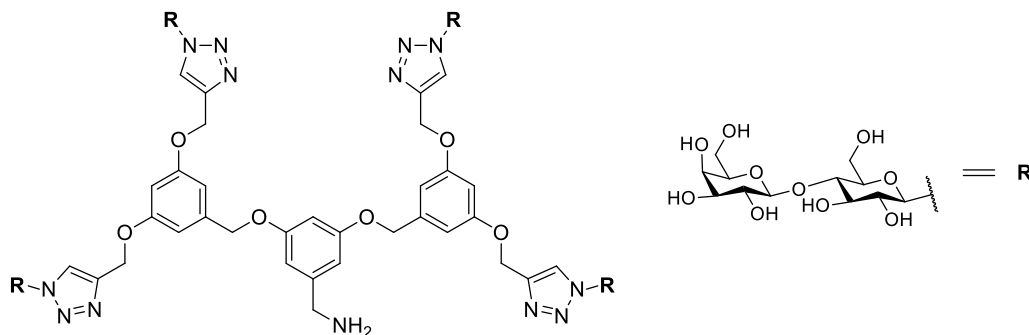


Figura 2.6 Glicocluster tetravalente de lactosa con actividad como inhibidor de lectinas.

Recientemente describieron la síntesis de glicoclusters de GlcNAc y GalNAc como inhibidores de MGL humana y galectinas. La bioactividad y selectividad de los compuestos fue probada en primer lugar con aglutininas de plantas. Una vez más determinaron que el incremento en la valencia tiene un efecto en el incremento de la actividad inhibitoria, siendo el derivado tetravalente el más potente (**Figura 2.7**).¹⁰

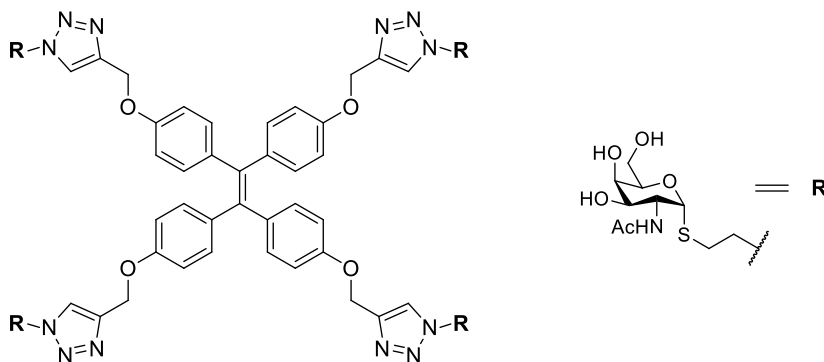
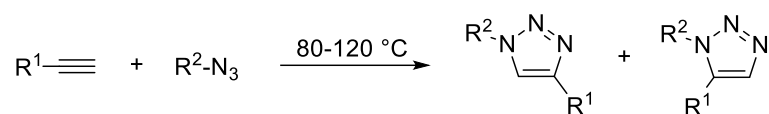


Figura 2.7 Glicocluster tetravalente de GalNAc con actividad como inhibidor de MGL.

2.2.4 Click chemistry

El término *click chemistry* se introdujo por primera vez por Sharpless *et al.* en el 2001 para designar a una serie de reacciones “poderosas, altamente confiables y selectivas” para la síntesis rápida de nuevos compuestos a través de enlaces con heteroátomos (C-X-C).¹⁵ Este tipo de reacciones se caracterizan por tener altos rendimientos, generar subproductos inofensivos y ser estereoespecíficas.

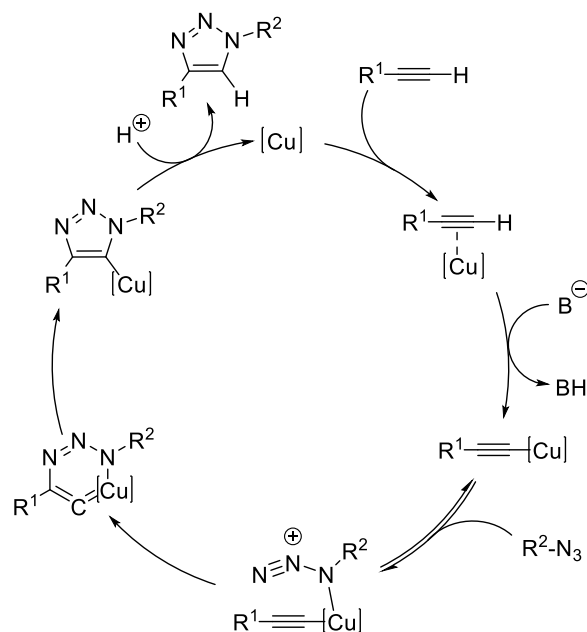
Dentro de las reacciones *click* podemos encontrar a la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos catalizada por Cu(I), esta cicloadición tiene su origen en la cicloadición de Huisgen nombrada en honor a Rolf Huisgen, por ser el primero en estudiar este tipo de cicloadiciones.¹⁶ La reacción original, descrita por Dimroth,¹⁷ implica el uso de temperaturas elevadas y tiene una nula regioselectividad, dando una mezcla 1:1 de los derivados 4- y 5-sustituidos (**Esquema 2.1**).


Esquema 2.1 Cicloadición de Huisgen.

El mecanismo propuesto por Huisgen y que ahora es generalmente aceptado, es un mecanismo pericíclico concertado, entre el dipolo 1,3 de la azida y el dipolarófilo.

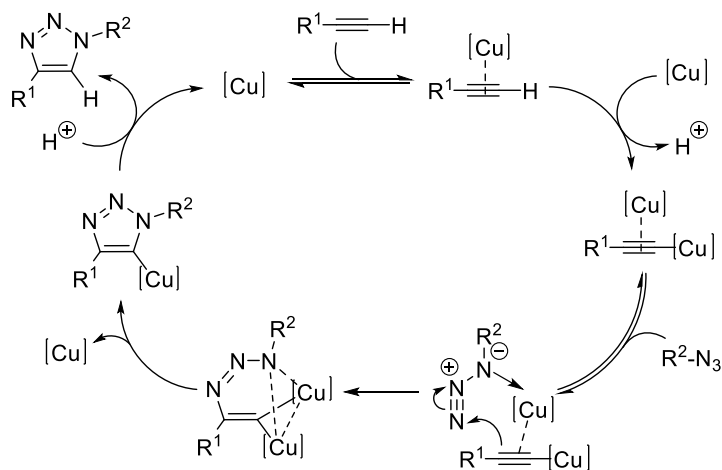
En el 2002, de manera independiente, Sharpless¹⁸ y Meldal¹⁹ describieron una variante de la cicloadición de Huisgen utilizando Cu como catalizador, obteniendo de manera regioselectiva triazoles 1,4-disustituidos. Esta cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (CuAAC) fue descrita por Sharpless como la mejor de todas las reacciones *click chemistry*.

En un principio se propuso un mecanismo mononuclear que incluía la formación de una estructura cíclica de 6 miembros con un átomo de cobre (III) (**Esquema 2.2**).


Esquema 2.2 Mecanismo original propuesto para la CuAAC.

Sin embargo, en el 2013 Fokin mostró evidencia de un intermediario de cobre dinuclear,²⁰ proponiendo el mecanismo mostrado en el **Esquema 2.3**. Recientemente, Bertrand *et al.*²¹

aislaron intermediarios de cobre mono y dinucleares de una CuAAC. De acuerdo al estudio que realizaron, ambas especies se encuentran presentes en el ciclo catalítico, sin embargo, los complejos dinucleares se encuentran presentes en el mecanismo cinéticamente favorecido.



Esquema 2.3 Mecanismo binuclear para la CuAAC.

Cabe señalar que en ambas hipótesis se postula la formación de un acetiluro de cobre, donde el cobre aumenta la acidez del alquino terminal, lo que permite su desprotonación incluso en medio acuoso.

2.3 Objetivos

Objetivo general

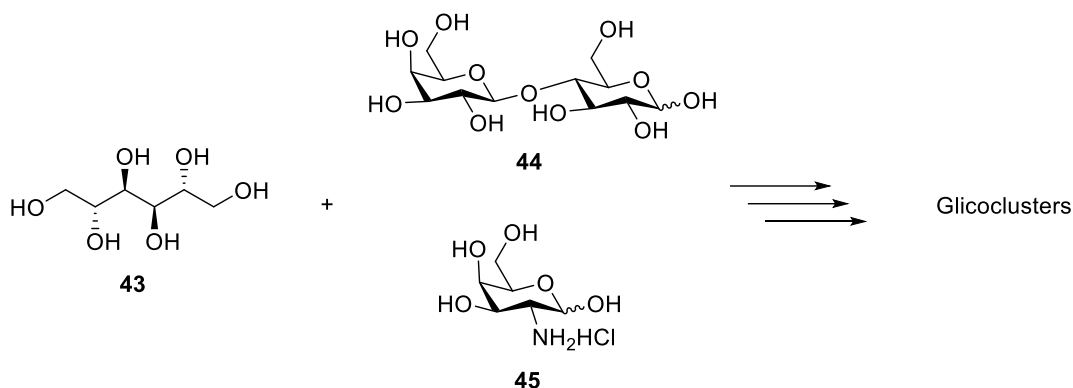
- Sintetizar nuevos glicoclusters de lactosa y GalNAc.

Objetivos particulares

- Sintetizar los carbohidratos derivados de lactosa y GalNAc con la función azida, necesarios para la reacción de tipo *click chemistry*.
- Sintetizar diferentes espaciadores derivados de D-manitol con la función alquino.
- Realizar el acoplamiento de los carbohidratos y el espaciador mediante la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC).
- Sintetizar derivados bivalentes y tetravalentes, a partir de los carbohidratos y espaciadores sintetizados.
- Caracterizar por métodos físicos y espectroscópicos los nuevos derivados.
- Evaluar los nuevos glicoclusters como inhibidores de galectinas y lectina tipo C en macrófagos.

2.4 Discusión de resultados

Para la síntesis de los glicoclusters se utilizó D-manitol (**43**) como espaciador, pues los alcoholes que posee nos permitieron diseñar ligandos con diferentes valencias y posiciones. Se utilizaron lactosa (**44**) y clorhidrato de D-galactosamina (**45**) como materias primas para la síntesis de los carbohidratos que fueron unidos al D-manitol a través de la reacción de tipo *click chemistry* de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) (**Esquema 2.4**)



Esquema 2.4 Materias primas para la formación de glicoclusters.

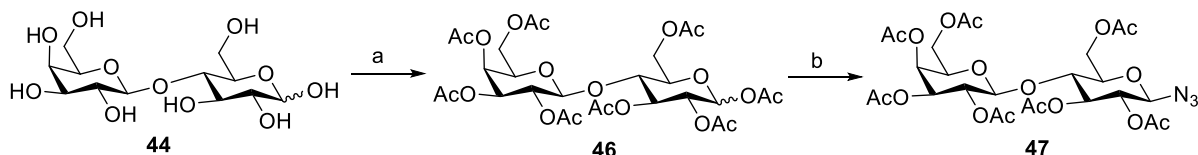
2.4.1 Síntesis de carbohidratos

El primer paso en la síntesis de los glicoclusters fue la formación de los azúcares con la función azido necesaria para el acoplamiento de tipo *click chemistry*. El derivado de lactosa se sintetizó con un rendimiento global del 83%, mientras que el derivado de GalNAc se obtuvo con un rendimiento del 39%.

2.4.1.1 Síntesis del derivado de lactosa

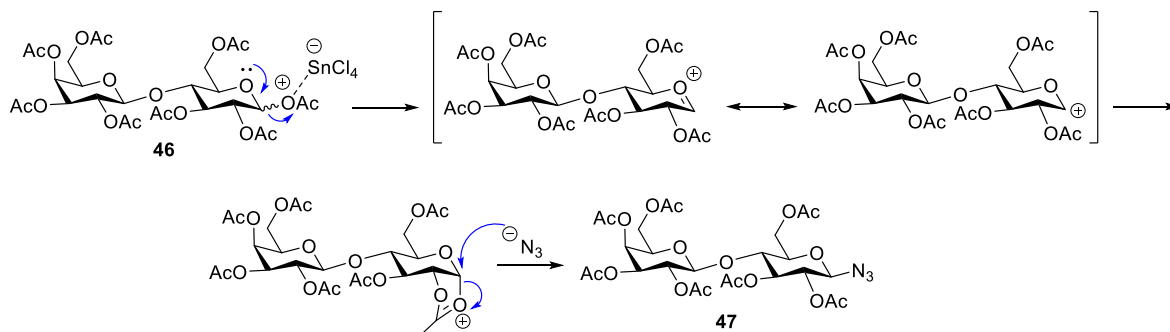
La síntesis del derivado de lactosa se realizó en dos pasos. En primer lugar, los alcoholes del azúcar se acetilaron utilizando Ac₂O y H₂SO₄ catalítico a temperatura ambiente por 10 minutos, dando como único producto el derivado **46** en un 99% de rendimiento. El derivado **46** se obtuvo

como una mezcla de isómeros α/β en una relación 2:1 que fueron utilizados en la siguiente reacción. Posteriormente, la formación del derivado **47** se realizó utilizando TMSN_3 como fuente de azida y SnCl_4 , siguiendo la metodología reportada por Cagnoni *et al.*²² El producto se obtuvo después de 18 h en agitación a temperatura ambiente, obteniendo como único producto el derivado **47** (**Esquema 2.5**).



Esquema 2.5 Síntesis del derivado de lactosa. Reactivos y condiciones: a) Ac_2O , H_2SO_4 , t.a., 10 min, 99%; b) TMSN_3 , SnCl_4 , CH_2Cl_2 , t.a., 18 h, 84%.

El espectro de RMN de ^1H mostró el protón anomérico en 4.61 ppm ($J = 8.8$ Hz) lo que nos permitió determinar la configuración de **47** como el anómero β . El mecanismo de formación del anómero se muestra en el **Esquema 2.6** y se explica debido a la asistencia anquimérica ofrecida por el grupo acetato en C-2, el cual impide el ataque de la azida por la cara α . Los desplazamientos de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C fueron comparados con los reportados en la bibliografía.²³

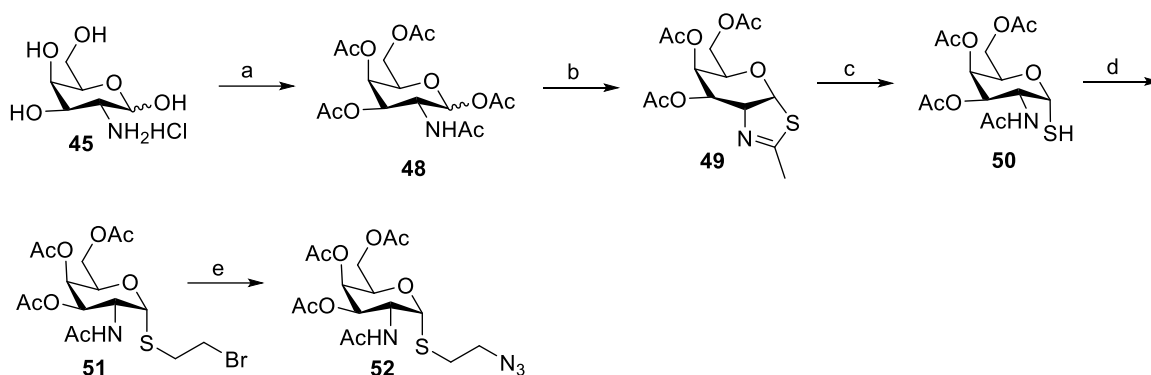


Esquema 2.6 Mecanismo de formación de la azida de lactosa **47**.

2.4.1.2 Síntesis del derivado de GalNAc

La síntesis del derivado de GalNAc se realizó mediante una metodología de 5 pasos a partir de

clorhidrato de D-galactosamina **45**. En primer lugar, la formación de la galactosamina peracetilada **48** se llevó a cabo utilizando condiciones clásicas de acetilación con anhídrido acético y piridina. El producto se obtuvo después de 21 h en agitación a temperatura ambiente en un 73% de rendimiento. La síntesis de los derivados **49** y **50** se realizó siguiendo la metodología descrita por Knapp *et al.*²⁴ El azúcar protegido **48** se trató con el reactivo de Lawesson [2,4-bis(4-metoxifenil)-1,3-ditiazol-2,4-difosfetano-2,4-disulfuro] durante 3 h a 80 °C, obteniendo el derivado de tiazolina **49** en un 66% de rendimiento. Posteriormente, se hidrolizó el anillo de tiazolina utilizando una mezcla TFA-H₂O obteniendo el tiol **50** de manera cuantitativa. El derivado **50** se alquiló utilizando 1,2-dibromoetano y K₂CO₃, de acuerdo a la metodología descrita por André *et al.*,²⁵ obteniendo el derivado bromado **51** en 80% de rendimiento. Finalmente, la síntesis del derivado **52** se realizó siguiendo la metodología descrita por Tropper *et al.*²⁶ utilizando NaN₃ y TBAHS como catalizador de transferencia de fase en un medio bifásico, obteniendo la azida **52** en 97% de rendimiento (**Esquema 2.7**).

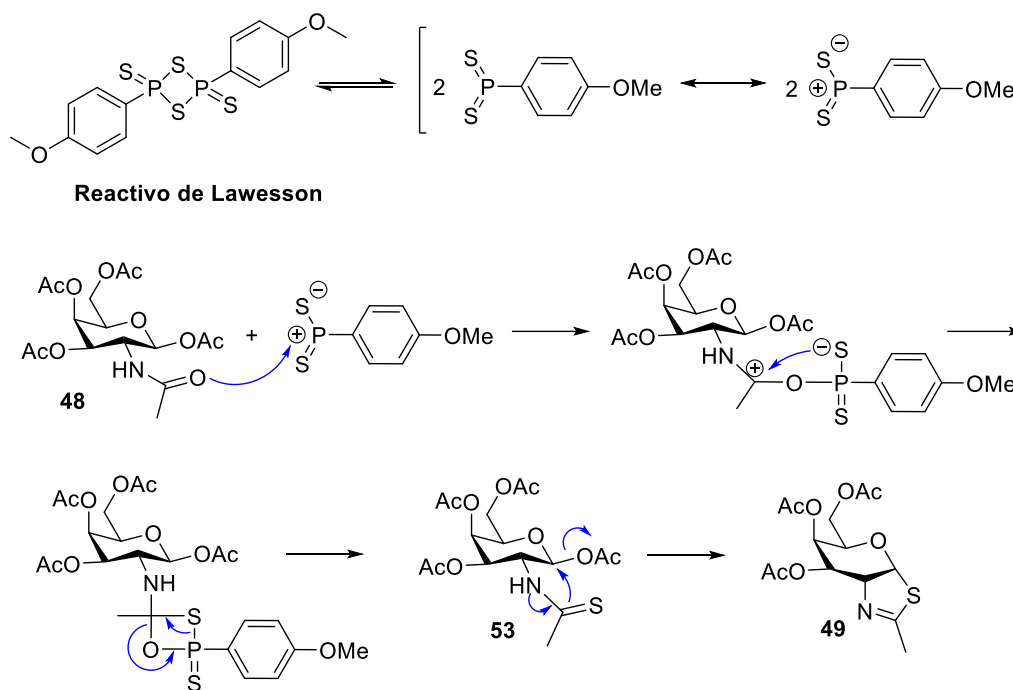


Esquema 2.7 Síntesis del derivado de GalNAc. Reactivos y condiciones: a) Ac₂O, piridina, 0 °C - t.a., 21 h, 73%; b) Reactivo de Lawesson, tolueno, 80°C, 3 h, 66%; c) TFA-H₂O, MeOH, 0 °C - t.a., 2 h, cuantitativo; d) K₂CO₃, 1,2-dibromoetano, acetona-H₂O, t.a., 3 h, 80%; e) NaN₃, TBAHS, CH₂Cl₂-NaHCO₃ ac., t.a., 4 h, 97%.

Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de los derivados sintetizados se compararon con los reportados en la bibliografía,^{25,34,35} excepto por el derivado **49** que fue caracterizado completamente.

El mecanismo de reacción de la tionación y de la ciclación 5-exo-tet se muestran en el **Esquema 2.8**. El reactivo de Lawesson en solución está en equilibrio con dos isómeros ditiofosfina, los cuales

reaccionan con el carbonilo de la acetamida **48** para formar un intermediario cíclico de cuatro miembros que se descompone para formar el correspondiente derivado **53** (no aislado). Finalmente, se lleva a cabo la ciclación espontánea intramolecular entre el azufre de la tioamida y el carbono anomérico de la galactosa para formar el biciclo **49**. El último paso de reacción difiere al mostrado para la formación del derivado **47** que implica la formación de un ion oxocarbenio, pues se ha demostrado que en esta reacción el anómero α no cicla bajo estas condiciones.²⁷



Esquema 2.8 Mecanismo de formación del compuesto **49**.

2.4.2 Síntesis de espaciadores

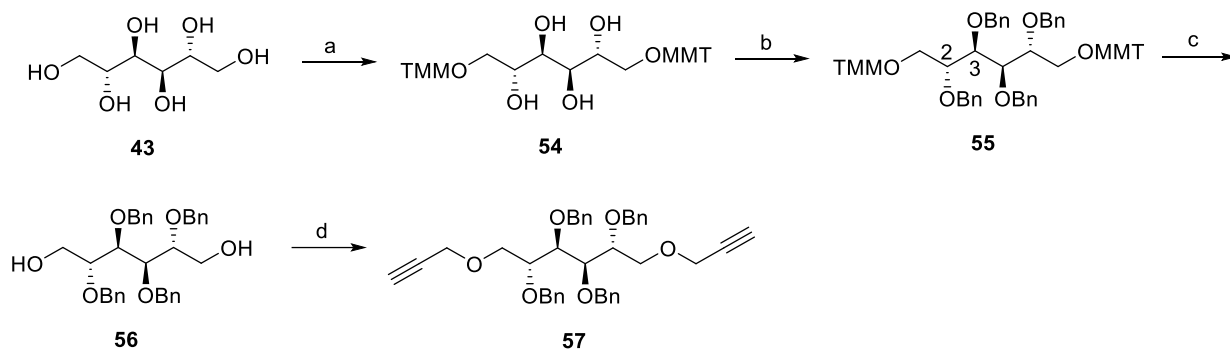
La síntesis de los espaciadores con la función alquino, necesaria para el acoplamiento de tipo *click chemistry*, se realizó a partir de D-manitol (**43**).

Se sintetizó un espaciador bivalente (**Esquema 2.9**) y dos espaciadores tetravalentes (**Esquemas 2.10** y **2.11**) con rendimientos globales del 12-40% a partir de **43** después de 4 o 5 pasos.

2.4.2.1 Síntesis del derivado bivalente **57**

Para la síntesis del espaciador bivalente se realizaron una serie de protecciones y desprotecciones de los alcoholes del D-manitol (**43**) basándonos en la diferente reactividad que poseen para unir el grupo propargilo únicamente en los OH primarios.

En primer lugar, se realizó la protección selectiva de los alcoholes primarios de **43** con el grupo protector MMT (2.1 eq) en medio básico, siguiendo la metodología descrita por Matos y Murphy.²⁸ La reacción se realizó de manera sencilla y a temperatura ambiente. El grupo protector voluminoso permitió obtener el derivado **54** como producto mayoritario en un rendimiento moderado. Un incremento en el tiempo de reacción no produjo mejores resultados (**Esquema 2.9**).



Esquema 2.9 Síntesis del espaciador bivalente **57**. Reactivos y condiciones: a) MMTCl, DMAP, piridina, 0 °C → t.a., 48 h, 60%; b) BnBr, NaH, DMF, 0 °C → t.a., 3 h, 92%; c) H₂SO₄, MeOH-CH₂Cl₂, t.a., 24 h, 90%; d) NaH, bromuro de propargilo, DMF, 0 °C → t.a., 47 h, 80%.

Los espectros de RMN se compararon con los reportados en la bibliografía, en ellos se pudieron observar las señales a frecuencias altas (6.68-7.32 ppm y 113.3-158.7 ppm) correspondientes a los protones y carbonos aromáticos, así como una señal a frecuencias bajas (3.64 y 55.3 ppm) perteneciente a los protones y carbono del grupo metilo.

Una vez protegidos los alcoholes primarios en el derivado **54**, los alcoholes secundarios se sometieron a condiciones de bencilación (BnBr, NaH) para obtener el compuesto **55** después de 3 h en excelente rendimiento. El espectro de RMN de ¹H mostró las nuevas señales a frecuencias

altas correspondientes a los protones aromáticos del bencilo, además se observaron 4 señales dobles entre 4.34-4.76 ppm pertenecientes a los protones diastereotópicos de los $\text{CH}_2\text{-Ph}$ de las posiciones C-2 y C-3. En el espectro de ^{13}C las señales pertenecientes al CH_2 de este grupo se observaron en 71.6 y 73.7 ppm. Las demás señales se compararon con las reportadas en la bibliografía.²⁸

La eliminación del MMT para desproteger los alcoholes primarios se realizó siguiendo la metodología reportada por Matos y Murphy,²⁸ utilizando H_2SO_4 por 24 h para obtener el derivado **56** en excelente rendimiento. Los espectros de RMN mostraron la ausencia de las señales correspondientes a los grupos aromáticos y al metilo del MMT, y fueron comparadas con las reportadas en la bibliografía.

Los alcoholes primarios del derivado **56** se propargilaron bajo condiciones anhidras y a temperatura ambiente por 47 h, utilizando 2 equivalentes por alcohol de NaH como base y de bromuro de propargilo como agente alquilante para obtener el espaciador bivalente **57** en 80% de rendimiento.

Los espectros de RMN de **57** muestran las señales correspondientes al grupo propargilo. En el espectro de ^1H se observa una señal doble en 4.11 ppm perteneciente a los protones $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, mientras que el protón de alquino $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ se observa como una señal triple en 2.34 ppm, ambas con un acoplamiento de largo alcance $^4J_{\text{H,H}} = 2.3$ Hz (**Figura 2.9, Espectro 64**). Los carbonos de este grupo se observan en el espectro de ^{13}C en 58.6 ppm ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), 74.7 ppm ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) y 79.9 ppm ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$) (**Espectro 65**).

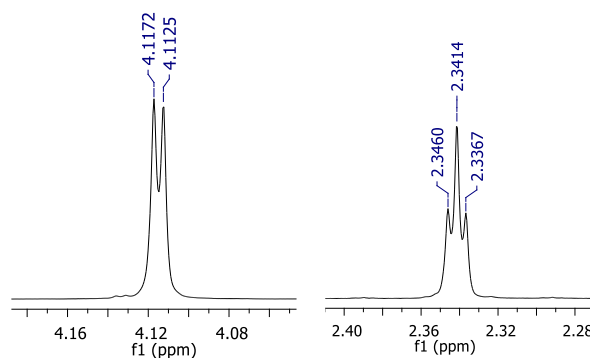
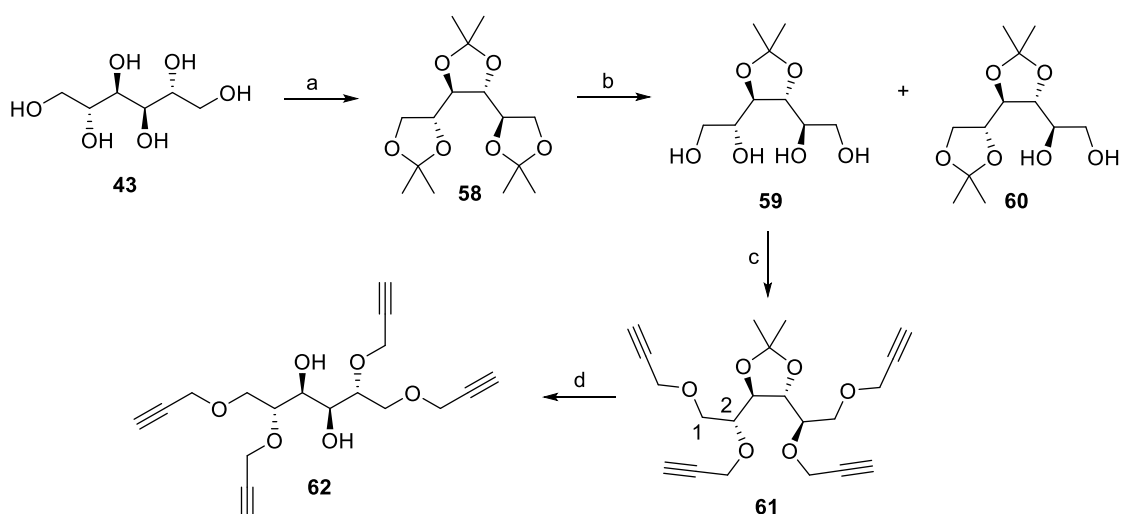


Figura 2.9 Protones pertenecientes al grupo propargilo del derivado **57**.

2.4.2.2 Síntesis del derivado tetravalente simétrico 62

Para la síntesis de los espaciadores tetravalentes se protegieron los alcoholes del D-manitol (**43**) formando acetales. La desprotección de diferentes alcoholes permitió introducir el grupo propargilo en cuatro posiciones diferentes. En este primer paso, se hizo reaccionar el derivado **43** con acetona en medio ácido protegiendo todos los alcoholes de la molécula, siguiendo la metodología reportada por Yadav y Agrawal.²⁹ El derivado **58** se obtuvo después de 41 h de reacción en un 67% de rendimiento (**Esquema 2.10**).



Esquema 2.10 Síntesis del espaciador tetravalente **62**. Reactivos y condiciones: a) Acetona, H_2SO_4 , t.a., 41 h, 67%; b) AcOH, MeOH, t.a., 1h, 44% para **59** y 23% para **60**; c) Bromuro de propargilo, NaH, DMF, $0^\circ\text{C} \rightarrow$ t.a., 25 h, 94%; d) HCl 1M, MeOH, reflujo, 2.5 h, 94%

Los grupos isopropilideno se observaron en el espectro de RMN de ^1H en 1.36 ppm (6H), 1.39 ppm (6H) y 1.43 ppm (6H) como señales simples. En el espectro de ^{13}C los metilos se observaron en 25.4 ppm, 26.6 ppm y 27.6 ppm, mientras que los carbonos cuaternarios se observaron en 109.7 ppm y 110.3 ppm. Los espectros de RMN, así como los demás datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.

La eliminación de los acetales en el derivado **58** se realizó siguiendo la metodología descrita por Chen y Xie.³⁰ Se utilizó una solución acuosa de AcOH al 30% por 1 h, obteniendo la mezcla de derivados parcialmente desprotegidos **59** y **60** en una relación 2:1 y recuperando el 9% de

materia prima. En ambos casos se puede observar que los dioxolanos menos impedidos se hidrolizaron preferentemente. Las diferentes posiciones de los alcoholes desprotegidos permitieron realizar dos tipos de espaciadores para dar lugar a glicoclusters tetravalentes simétricos y asimétricos. Los datos físicos y espectroscópicos de ambos derivados se compararon con los reportados en la bibliografía.^{30,31}

Finalmente, la síntesis del espaciador tetravalente simétrico **62** se realizó a partir del derivado **59**. La propargilación de los alcoholes y la posterior hidrólisis del dioxolano permitió obtener el espaciador deseado. En un primer paso, el derivado **59** se trató con NaH y bromuro de propargilo por 25 h para introducir el grupo propargilo en las posiciones 1, 2, 5 y 6, obteniendo el derivado **61** en un excelente rendimiento.

Los espectros de RMN muestran las señales pertenecientes a los grupos propargilo. A diferencia del derivado **57**, el mayor grado de sustitución en la molécula hace que en el espectro de ^1H los protones diastereotópicos $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$, aparezcan como señales dobles de dobles con $J_{\text{gem}} = 16.0$ Hz y $^4J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz.

En el espectro **A** de la **figura 2.10** se observan los protones $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ de la posición C-2, mientras que en la B se muestran los de la posición C-1 traslapados con una señal en 4.14 ppm. Por su parte, los protones del alquino $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$ aparecen en 2.42 ppm (t) para C-1 y en 2.44 (t) para C-2 (**Espectro 66**). La simetría de la molécula permite obtener una menor cantidad de señales.

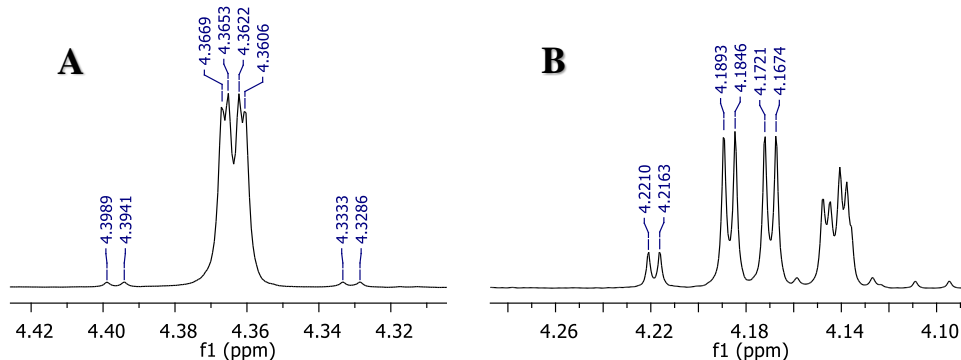


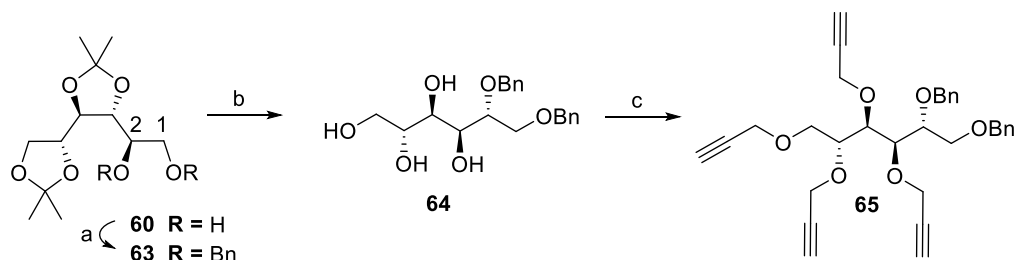
Figura 2.10 Protones pertenecientes a los metilenos de los grupos propargilo en **61**.

La eliminación del acetal más impedido se realizó utilizando HCl 1M a reflujo por 2.5 h, obteniendo el diol **62** en un excelente rendimiento. En el espectro de RMN de ^1H se observa como señal más evidente de la formación de este derivado una señal doble en 2.84 ppm (2H) perteneciente a los protones de los alcoholes, además la ausencia del singlete a frecuencias bajas perteneciente a los metilos del acetal confirmó el producto (**Espectro 68**).

El derivado **62** fue utilizado como espaciador en los glicoclusters tetravalentes simétricos derivados de lactosa y del derivado de α -GalNAc.

2.4.2.3 Síntesis del derivado tetravalente asimétrico **65**

Para la síntesis del espaciador asimétrico se utilizó el diol **60**. En primer lugar, se protegieron los hidroxilos de **60** con un grupo bencilo, utilizando NaH y BnBr por 3 h para dar el derivado **63** en un excelente rendimiento (**Esquema 2.11**).



Esquema 2.11 Síntesis del espaciador tetravalente **65**. Reactivos y condiciones: a) BnBr, NaH, DMF, $0\text{ }^\circ\text{C}$ \rightarrow t.a., 3 h, 94%; b) HCl 1M, MeOH, reflujo, 3 h, 88%; c) Bromuro de propargilo, NaH, DMF, $0\text{ }^\circ\text{C}$ \rightarrow t.a., 18 h, 94%.

En la **Figura 2.11** se muestra una parte del espectro de RMN de ^1H (**Espectro 70**), específicamente la región de los CH_2Ph en donde se observa que la señal de los metilenos del bencilo en C-1 es diferente a los de C-2. Los protones del primero aparecen como una señal simple en 4.54 ppm, mientras que los de C-2 aparecen como señales dobles en 4.68 y 4.78 ppm. Al observar la molécula se puede deducir que los protones que aparecen como un singlete tienen un ambiente químico similar al encontrarse lejanos a los acetales y al final de la cadena

con libre giro, por el contrario, los protones acoplados tienen una mayor restricción en la conformación. Este efecto desaparece al eliminar los acetales.

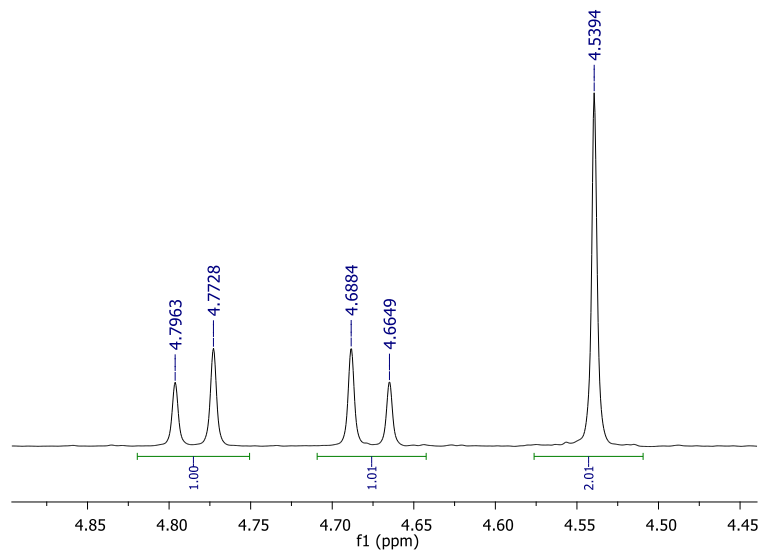


Figura 2.11 Protones pertenecientes a los metilenos de los grupos bencilo en **63**.

La eliminación de ambos acetales en el derivado **63** se llevó a cabo mediante el uso de HCl 1M a reflujo por 3 h, para dar el tetraol **64** como producto mayoritario en buen rendimiento.

Los espectros de RMN mostraron como señal de la obtención del producto la desaparición de los metilos y de los carbonos cuaternarios de los grupos isopropilideno en aproximadamente 109 ppm (**Espectros 72 y 73**).

Por último, la formación del espaciador asimétrico se consiguió mediante la propargilación de los hidroxilos en el derivado **64** utilizando NaH y bromuro de propargilo, obteniendo un excelente rendimiento.

Las señales características de RMN de los grupos propargilo en **65** evidenciaron la formación del producto (**Espectros 74 y 75**), sin embargo, a diferencia de los espaciadores simétricos la asignación de cada señal conllevó un estudio más cuidadoso de los espectros de dos dimensiones COSY, HSQC y HMBC.

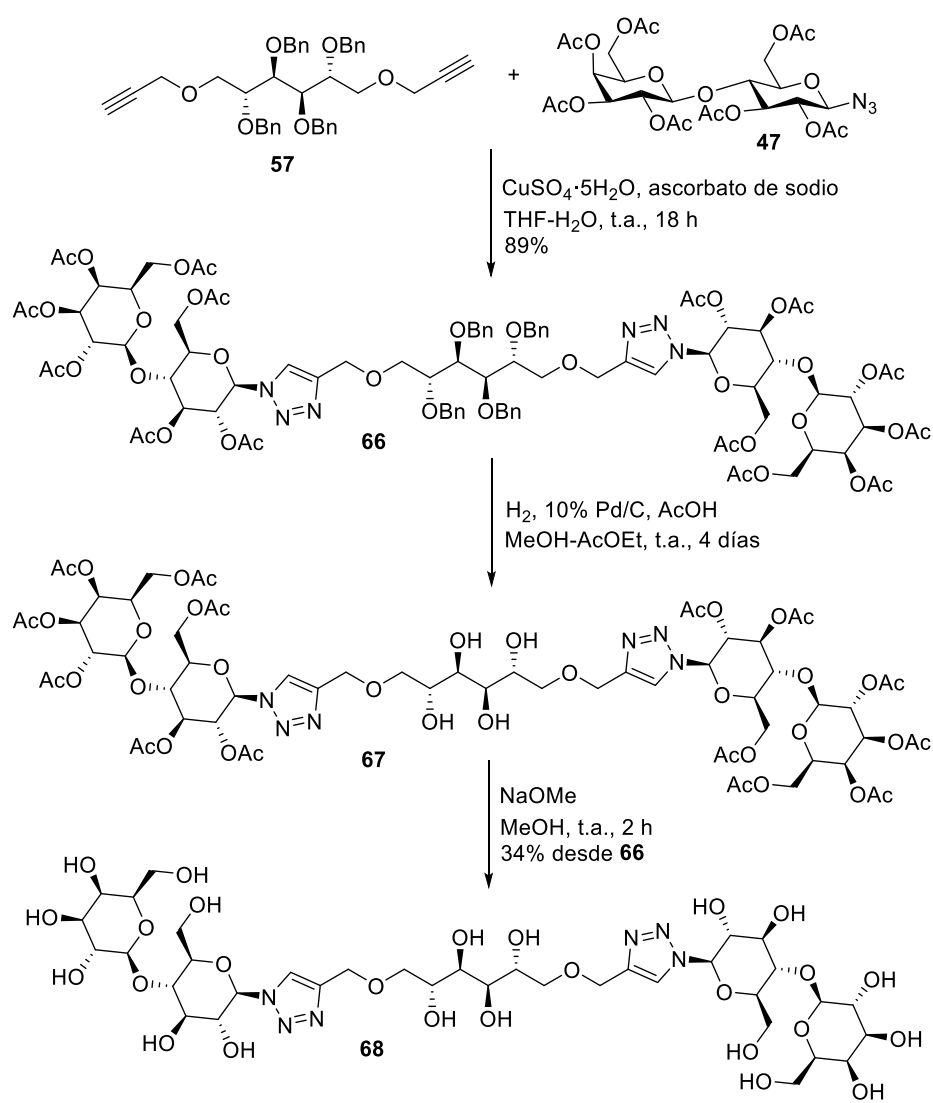
2.4.3 Síntesis de glicoclusters

El acoplamiento entre los carbohidratos y los espaciadores sintetizados se llevó a cabo mediante la reacción tipo *click chemistry* de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC). El catalizador de Cu(I) necesario para la CuAAC se generó *in situ* a partir de una sal de cobre(II) y ácido ascórbico como agente reductor. La posterior eliminación de los grupos protectores en el espaciador y/o en los carbohidratos proporcionó los glicoclusters finales.

2.4.3.1 Síntesis del glicocluster bivalente de lactosa **68**

La síntesis del glicocluster bivalente de lactosa **68** se realizó en tres etapas (**Esquema 2.12**). El primer paso fue el acoplamiento entre el espaciador bivalente **57** y la azida de lactosa **47** mediante el tratamiento con $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y ascorbato de sodio por 18 h, para obtener el derivado **66** en excelente rendimiento. En los espectros de RMN se observan las señales pertenecientes al espaciador y al azúcar protegidos, además se puede observar el protón del triazol formado como una señal simple en 8.07 ppm (**Espectro 76**) y los carbonos del heterociclo en 124.1 y 146.7 ppm (**Espectro 77**).

Posteriormente, el derivado **66** se hidrogenó catalíticamente y en condiciones ácidas durante 4 días para obtener el compuesto desbencilado **67** como producto mayoritario. Los disolventes utilizados tanto en la reacción como en la purificación del derivado **67**, así como el H_2O del ambiente no pudieron eliminarse completamente del compuesto incluso después de liofilizarse varias veces, los espectros de RMN (**Espectros 78 y 79**) muestran señales intensas de H_2O (en 4.92 ppm), MeOH (3.35 y 49.8 ppm) y trazas de CH_2Cl_2 (5.48 y 54.8 ppm) por lo que el rendimiento experimental no fue determinado en este paso. Pese a esto, el compuesto **67** se obtuvo como una espuma blanca.

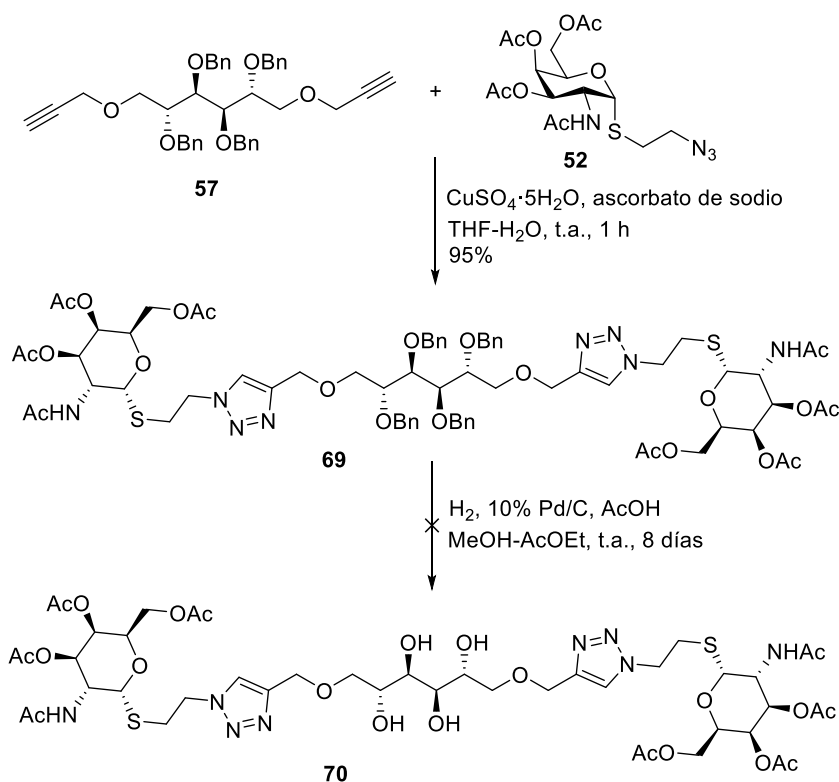


Esquema 2.12 Síntesis del glicocluster bivalente de lactosa **68**.

Finalmente, el glicocluster **68** se obtuvo como único producto después de la eliminación de los grupos acetato mediante el tratamiento con NaOMe por 2 h. Dada la polaridad de la molécula, la purificación se realizó por cromatografía en fase inversa, eluyendo primeramente con H_2O para eliminar las sales y posteriormente con una mezcla 1:1 H_2O -acetonitrilo. El derivado **68** se obtuvo en un 34% después de dos pasos. Los espectros de RMN se obtuvieron en $\text{DMSO}-d_6$ (**Espectros 80 y 81**), por lo que puede observarse el acoplamiento de los OH de la molécula con los protones vecinos.

2.4.3.2 Síntesis del glicocluster bivalente de GalNAc **69**

La reacción de acoplamiento entre el espaciador bivalente **57** y el derivado de α -GalNAc **52** produjo el derivado bivalente **69** en un 95% después de 1 h de reacción (**Esquema 2.13**). Las señales de RMN correspondientes al anillo de triazol en 7.44, 122.8 y 145.4 ppm confirmaron el acoplamiento de ambas moléculas (**Espectros 82 y 83**). Para la eliminación de los grupos bencilo, el glicocluster bivalente protegido **69** se sometió a condiciones de hidrogenación catalítica a 1 atm de presión, sin embargo, después de 8 días de reacción la ccf mostró la formación de múltiples derivados parcialmente desprotegidos.



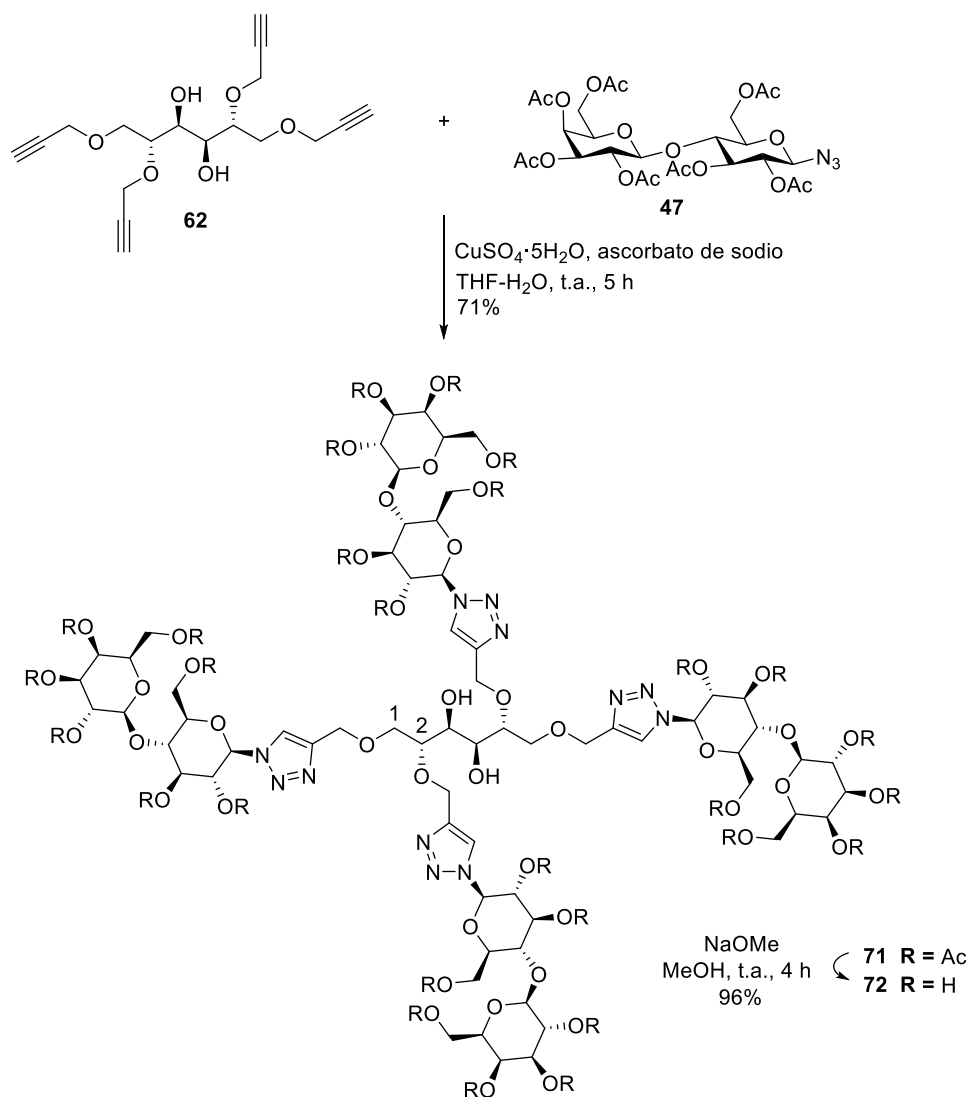
Esquema 2.13 Síntesis del glicocluster bivalente protegido **69**.

Se sabe que los compuestos que tienen átomos de nitrógeno en su estructura con pares electrónicos libres se adsorben fuertemente en el catalizador, desactivándolo. Sin embargo, la adición de un ácido generalmente incrementa la velocidad de hidrogenación al protonar a los nitrógenos.³² En esta reacción la adición de ácido acético no produjo ningún cambio, pues a

diferencia del derivado **66** el compuesto **69** posee un tioglicósido en su estructura, y se ha demostrado que numerosos derivados de S desactivan o envenenan el catalizador evitando así la completa hidrogenación.³³

2.4.3.3 Síntesis del glicocluster tetravalente de lactosa 72

La síntesis del derivado tetravalente simétrico de lactosa se llevó a cabo utilizando el espaciador tetravalente **62** y 1.1 equivalentes de azida de lactosa **47** por cada grupo propargilo (**Esquema 2.14**).



Esquema 2.14 Síntesis del glicocluster tetravalente de lactosa **72**.

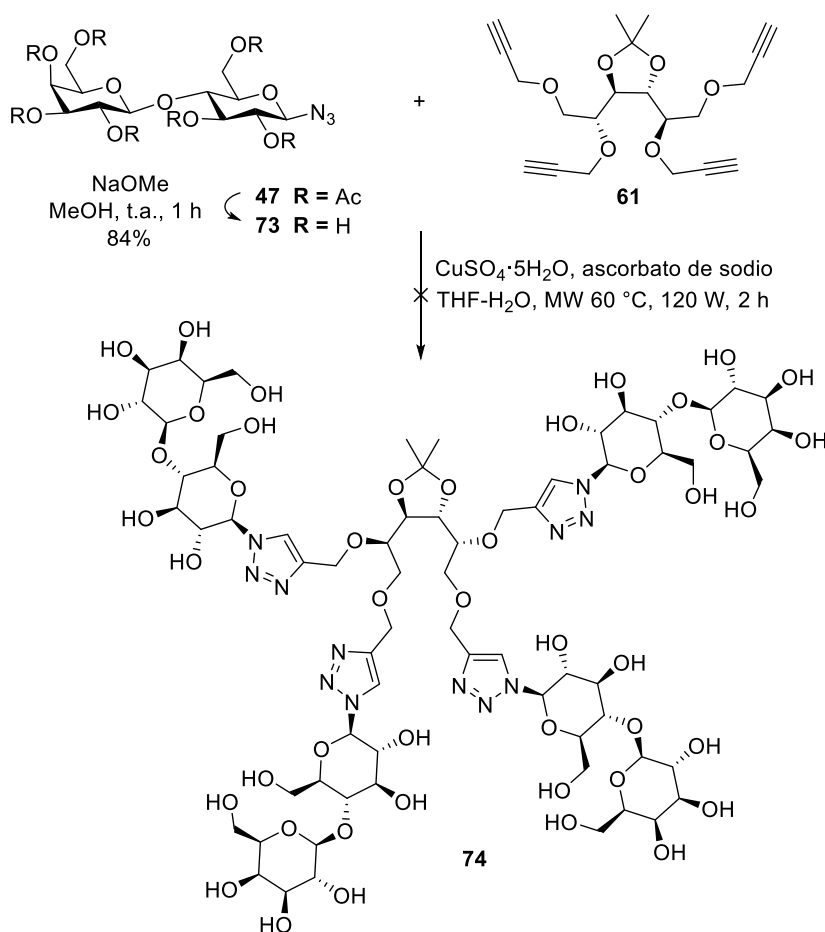
La reacción de CuAAC se realizó utilizando una cantidad equimolar de CuSO_4 y ascorbato de sodio, sin embargo, después de 3 h en agitación fue necesario añadir 0.1 mmol más del agente reductor para que la reacción continuara. El glicocluster protegido **71** se obtuvo como producto mayoritario en un 71% de rendimiento. Los espectros de RMN muestran las señales de los anillos de triazol que están unidos en C-1 y C-2 y que tienen desplazamientos similares a los descritos anteriormente (**Espectros 84 y 85**).

La desprotección final de los azúcares mediante el tratamiento con NaOMe por 4 h, generó el glicocluster final **72** en un excelente rendimiento. La purificación del derivado se realizó por cromatografía en fase inversa utilizando H_2O y acetonitrilo- H_2O .

Los espectros de RMN muestran una mayor cantidad y complejidad de señales debido a la cantidad de átomos en la molécula y al acoplamiento de los protones de los OH, sin embargo, gracias a la simetría de la molécula y a la ayuda de espectros de 2D fue posible asignar cada señal en los espectros (**Espectros 86 y 87**).

Para conocer cómo se afectaba la actividad inhibitoria al realizar un cambio en la conformación de los derivados tetravalentes, se diseñó el glicocluster con conformación restringida **74**. Para la síntesis del derivado se realizó primeramente la desprotección de la lactosa **47** utilizando NaOMe por 1 h, obteniendo el azúcar **73** en un 84% de rendimiento. La reacción de acoplamiento entre el azúcar **73** y el espaciador restringido **61** se mantuvo a t.a. por 1 día y posteriormente a 60 °C en microondas utilizando los reactivos ya establecidos para la formación del anillo de triazol. Después de 2 h de reacción se observó la formación de un derivado menos sustituido que no pudo ser identificado.

El derivado **74** no se formó debido probablemente al alto impedimento estérico en la molécula derivado de la conformación restringida del espaciador (**Esquema 2.15**).

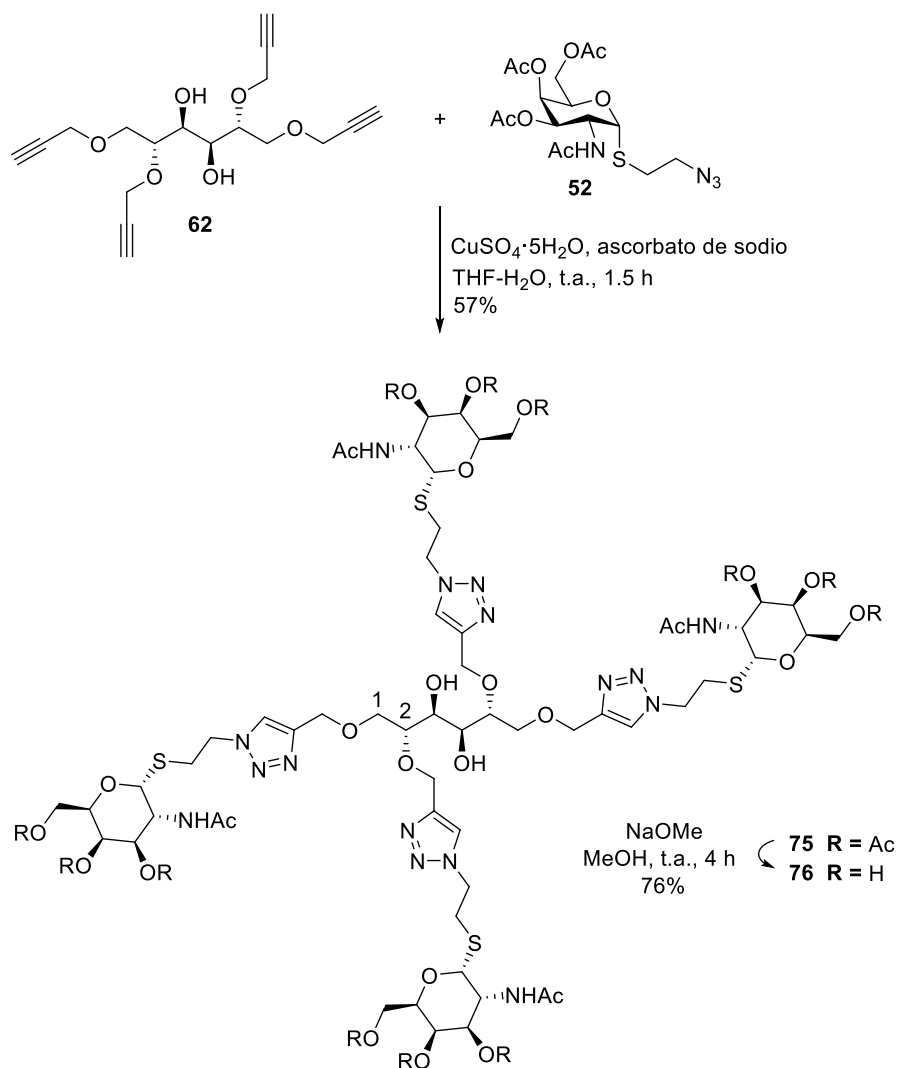


Esquema 2.15 Ensayo para la síntesis del glicocluster tetravalente **74**.

2.4.3.4 Síntesis del glicocluster tetravalente de GalNAc **76**

La síntesis del derivado tetravalente de GalNAc se realizó mediante el acoplamiento entre el espaciador tetravalente **62** y el derivado de GalNAc **52**. El glicocluster acetilado **75** se obtuvo con rendimiento moderado después de 1.5 h de reacción (**Esquema 2.16**). El espectro de RMN de ^1H muestra las señales pertenecientes al espaciador entre 3.69 y 3.87 ppm y las señales del azúcar entre 4.09 y 5.75 ppm, mientras que las señales pertenecientes a los anillos de triazol se observan en 7.78 y 7.79 ppm para los heterociclos unidos en C-2 y C-1, respectivamente. Las demás señales de la molécula, así como las señales de ^{13}C pueden observarse en los **Espectros 88 y 89**.

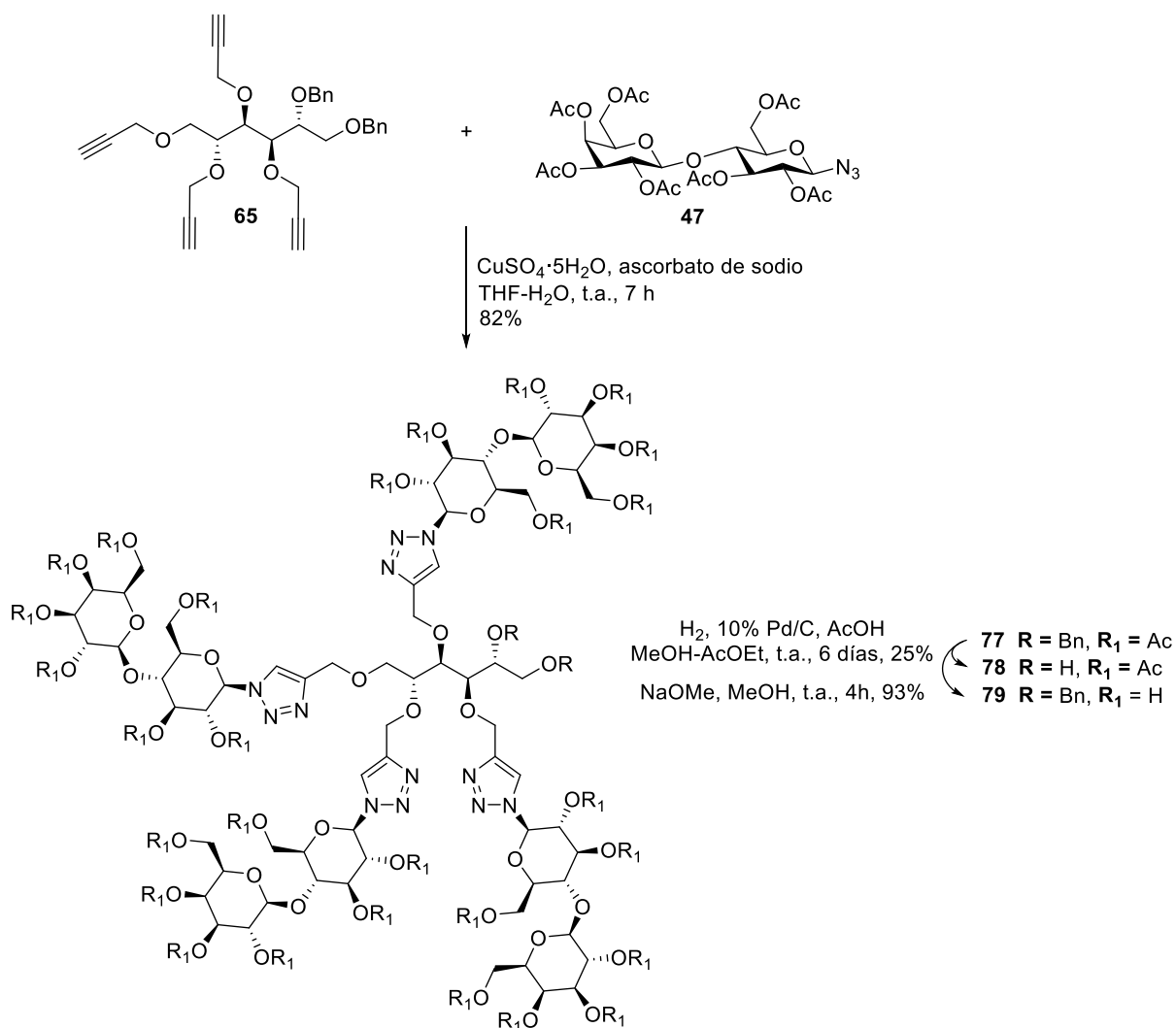
La desacetilación de los azúcares en el glicocluster se realizó mediante el uso de NaOMe 1M por 4 h. Después de la cromatografía en fase inversa se obtuvo el derivado tetravalente **76** en un buen rendimiento. Los espectros de RMN muestran la desaparición de las señales pertenecientes a los acetatos en alrededor de 1.99, 20.9 y 170.0 ppm (**Espectros 90 y 91**).



Esquema 2.16 Síntesis del glicocluster tetravalente de GalNAc **76**.

2.4.3.5 Síntesis del glicocluster tetravalente de lactosa 78

El glicocluster tetravalente asimétrico se sintetizó a partir del espaciador **65** y la azida de lactosa **47**. El acoplamiento mediante la CuAAC se realizó después de 7 h de reacción para obtener el derivado **77** como producto mayoritario en 82% de rendimiento. La obtención del glicocluster totalmente desprotegido no fue posible debido a la dificultad para desbencilar el compuesto **77**, el cual fue sometido a hidrogenación catalítica en medio ácido por 6 días obteniendo el producto desbencilado **78** en un 25% (Esquema 2.17). El alto grado de impedimento estérico de la molécula seguramente dificulta la adsorción sobre el catalizador disminuyendo considerablemente el rendimiento de la reacción.



Esquema 2.17 Síntesis del glicocluster tetravalente asimétrico **79**.

Con estos resultados y ya que es más importante la desprotección del azúcar que la del manitol para la evaluación de la actividad biológica, se procedió a la desacetilación de los azúcares a partir del derivado **77** utilizando NaOMe por 4 h, obteniendo el glicocluster final **79** en un excelente rendimiento. La cantidad de átomos de la molécula aunada a la falta de simetría y al uso de DMSO- d_6 como disolvente dificultó la asignación de las señales en los espectros de RMN (**Espectros 96 y 97**).

2.4.4 Actividad biológica

La actividad biológica fue evaluada en la Universidad Ludwig-Maximilians en Munich, Alemania por el grupo del Profesor Hans-Joachim Gabius.

El derivado tetravalente de GalNAc **76**, fue evaluado dentro de un panel de seis glicoclusters que poseen este mismo carbohidrato (de bi- a tetravalentes) como inhibidor de cuatro lectinas con especificidad por ese monosacárido: dos lectinas tetravalentes de leguminosa: aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA) y aglutinina de soya (SBA), una lectina hexamérica de la glándula de albúmina del caracol comestible (o de viña) (*Helix pomatia* (HPA)) y la lectina humana de tipo C de tipo galactosa en macrófagos (MGL) en dos formas diseñadas: como dominio de reconocimiento de carbohidrato monomérico libre (CRD) y como CRD extendido por el tallo de hélice α superenrollada del receptor transmembrana que confiere su trimerización.

Los ensayos se realizaron sobre tejido de yeyuno de murino, mientras el estudio histoquímico de lectina se realizó por microscopía óptica y microscopía de fluorescencia.

Mediante este estudio se mostró la influencia de los parámetros de los glicoclusters (estructura del núcleo y valencia) y de las lectinas (arquitectura, especificidad fina y valencia) en la actividad biológica, en dos poblaciones celulares, además fue posible evaluar la actividad de los glicoclusters en lectinas individuales probadas en mezclas, tal como se encuentran *in situ*.

El ensayo diseñado permite predecir la eficacia de inhibidores de lectinas (glicoclusters) *in vivo*, sin las limitaciones encontradas en los ensayos comúnmente utilizados³⁴, los cuales no representan la complejidad natural de los tipos de células ni la complejidad espacial y estructural de los glicoconjugados. Además, en comparación con las evaluaciones en cultivos celulares, el tejido asegura el análisis de las células en su microambiente. Por otro lado, la imitación de la ocurrencia natural de lectinas en mezclas permitirá rastrear las consecuencias, no bien definidas hasta ahora, de la competencia por sitios de unión y reactividad cruzada de glicoclusters entre lectinas.

La confiabilidad y sensibilidad de este ensayo, así como la posibilidad de realizarlo sobre cualquier tipo de tejido, lo hace una herramienta a considerar antes de realizar la evaluación de los glicoclusters *in vivo*, por ejemplo, para minimizar los solapamientos hacia los sitios de unión mediante refinamientos estructurales de los inhibidores.³⁵

2.5 Conclusiones

Se sintetizaron tres diferentes espaciadores bi- y tetravalentes con la función alquino a partir del D-manitol. Además, se sintetizaron dos azúcares con la función azida derivados de lactosa y GalNAc.

A partir de los espaciadores y los azúcares sintetizados, se obtuvieron 4 nuevos glicoclusters finales con diferentes valencias y distancias entre los carbohidratos mediante la reacción CuAAC

Los derivados finales, así como los compuestos intermediarios no reportados fueron caracterizados por métodos físicos y espectroscópicos.

El derivado tetravalente de GalNAc **76** se utilizó en el diseño de un ensayo para determinar la actividad de inhibidores de lectinas y predecir su eficacia *in vivo*.

Los glicoclusters derivados de lactosa siguen siendo evaluados como inhibidores de lectinas en la Universidad Ludwig-Maximilians en Munich, Alemania por el grupo del Profesor Hans-Joachim Gabius.

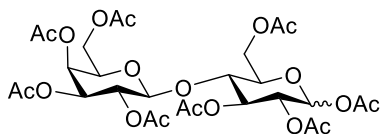
Los resultados de las pruebas biológicas proveerán información para el diseño y síntesis de futuros inhibidores.

2.6 Desarrollo experimental

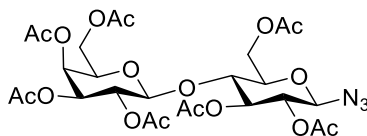
2.6.1 Métodos generales

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Schmidt & Haensch Unipol L 1000. Los espectros de RMN fueron obtenidos en un instrumento Varian Inova 500 MHz. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm (δ) y los espectros fueron referenciados de acuerdo al valor de los picos residuales de cada disolvente: CDCl_3 (7.26 y 77.16 ppm), CD_3OD (3.31 y 49.0 ppm) y $\text{DMSO-}d_6$ (2.50 y 39.52 ppm) para RMN de ^1H y ^{13}C respectivamente. Los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz). Las señales de RMN de ^1H y ^{13}C fueron asignadas con ayuda de los experimentos de RMN de 1D y 2D (APT, COSY, HSQC y HMBC). Los espectros de masas de baja y alta resolución fueron obtenidos por ESI utilizando un espectrómetro Waters LCT Premier XE. La cromatografía en columna se realizó utilizando gel de sílice 60. La cromatografía de fase inversa se llevó a cabo utilizando gel de sílice C_{18} . La ccf se realizó utilizando placas comerciales de gel de sílice 60 F_{254} y gel de sílice C_{18} . Para el revelado de las placas se utilizó la radiación con luz ultravioleta de onda corta de 254 nm, H_2SO_4 (ac), ninhidrina en EtOH y/o una solución de molibdato.

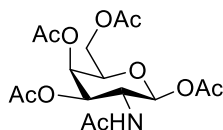
2.6.2 Métodos de síntesis, datos físicos y espectroscópicos de los compuestos obtenidos



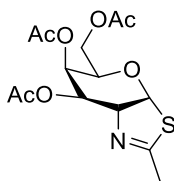
1,2,3,6,2',3',4',6'-Octa-*O*-acetil lactosa (46). Una suspensión de lactosa (**44**, 0.5 g, 1.46 mmol) en Ac_2O (1.3 mL, 14.0 mmol) se agitó por 5 min y se añadió H_2SO_4 conc. (1 gota), con lo que la temperatura de la reacción aumentó. La reacción se enfrió a t.a. y se añadió CH_2Cl_2 (2.5 mL). La mezcla resultante se agitó por 10 min a t.a., posteriormente se añadió H_2O (3 mL) y se agitó toda la noche. La reacción se lavó con una solución saturada acuosa de NaHCO_3 (3 \times 5 mL) y salmuera (2 \times 5 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. Se obtuvo el compuesto **46** como un sólido blanco (0.98 g, 99%) y se usó en el siguiente paso sin mayor purificación.



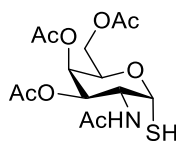
2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-acetil- β -lactosil azida (47). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Cagnoni *et al.*²² A una solución de lactosa peracetilada **46** (0.93 g, 1.37 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (11 mL) se añadió TMSN_3 (0.36 mL, 2.7 mmol) y SnCl_4 (98 μL , 0.84 mmol) bajo Ar. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a t.a. por 18 h, posteriormente se lavó con una solución saturada acuosa de NaHCO_3 (3 \times 10 mL) y con salmuera (2 \times 10 mL), la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 ciclohexano- AcOEt) para dar el derivado **47** como una espuma blanca (0.76 g, 84%). Los datos espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.²³



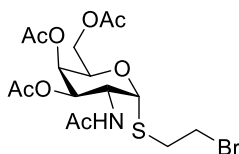
2-Acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetil-2-desoxi- β -D-galactopiranososa (48). A una suspensión de clorhidrato de D-galactosamina (**45**, 1.0 g, 4.64 mmol) en piridina (15 mL) a 0 °C, se añadió lentamente Ac_2O (3.7 mL, 39.1 mmol). La reacción se mantuvo en agitación toda la noche a t.a. Posteriormente, el disolvente se evaporó y el residuo se recristalizó con MeOH para dar el compuesto **48** como cristales blancos (1.38 g, 77%). Los datos espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.³⁶



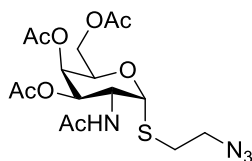
(3aR,5R,6R,7R,7aR)-5-(Acetoximetil)-6,7-diacetoxi-2-metil-5,6,7,7a-tetrahidro-3aH-pirano[3,2-d]tiazol (49). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Knapp *et al.*²⁷ A una suspensión del compuesto **48** (1.39 g, 3.56 mmol) en tolueno (20 mL) se añadió el reactivo de Lawesson (1.24 g, 3.06 mmol). La mezcla se colocó en agitación a 80 °C por 4 h, se enfrió a t.a. y se neutralizó con NaHCO_3 (146 mg). El sólido se filtró y el tolueno se evaporó hasta reducir su volumen. El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 CH_2Cl_2 -AcOEt) para dar el derivado **49** como un aceite amarillo (0.8 g, 66%). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 6.20 (d, 1H, $J_{1,2} = 6.2$ Hz, H-1 Gal), 5.46 (t, 1H, $J_{\text{H,H}} = 3.2$ Hz, H-4 Gal), 5.16 (dd, 1H, $J_{3,2} = 7.8$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3 Gal), 4.33 (dd, 1H, $J_{2,3} = 7.8$ Hz, $J_{2,1} = 6.2$ Hz, H-2 Gal), 4.24 (m, 1H, H-5 Gal), 4.17 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz, $J_{6a,5} = 7.4$ Hz, H-6a Gal), 4.04 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 11.5$ Hz, $J_{6b,5} = 5.6$ Hz, H-6b Gal), 2.21 (s, 3H, CH_3 tiazolina), 2.21 (3H), 2.03 (3H), 2.0 (3H) (OCOCH_3). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 170.2, 169.8 (OCOCH_3), 168.5 (C-2), 89.0 (C-1 Gal), 74.5 (C-2 Gal), 70.7 (C-3 Gal), 70.6 (C-5 Gal), 66.3 (C-4 Gal), 60.9 (C-6 Gal), 21.5 (CH_3 tiazolina), 20.9, 20.7, 20.6 (OCOCH_3). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_7\text{S}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 346.0955, observado: 346.0970.



2-Acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranososa (50). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Knapp *et al.*²⁴ A una solución del derivado **49** (0.18 g, 0.51 mmol) en MeOH (2 mL) se añadieron H₂O (4 gotas) y TFA (4 gotas) a 0 °C. La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. por 2 h, después de este tiempo el disolvente se evaporó para dar el compuesto **50** como un aceite incoloro (0.185 g, cuantitativo). El derivado se utilizó en el siguiente paso sin mayor purificación. Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.³⁷

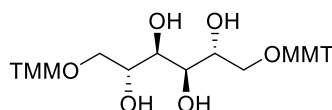


2-Bromoetil 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranosido (51). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por André *et al.*²⁵ A una solución del derivado **50** (0.18 g, 0.51 mmol) en una mezcla 2:1 acetona-H₂O (3 mL) se añadieron K₂CO₃ (84 mg, 0.60 mmol) y 1,2-dibromoetano (0.35 mL, 4.11 mmol). La mezcla se agitó a t.a. por 5 h, después de este tiempo el disolvente orgánico se evaporó y el residuo se disolvió con CH₂Cl₂, las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con H₂O (2×3 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El derivado se purificó por cromatografía en columna (1:1 → 2:3 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **51** como una espuma blanca (0.19 g, 80%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.

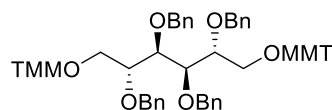


2-Azidoetil 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranosido (52). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Tropper *et al.*²⁶ A una solución del derivado **51** (0.27 g, 0.58 mmol) en una mezcla 1:1 CH₂Cl₂-NaHCO₃ ac. (4 mL), se añadieron TBAHS

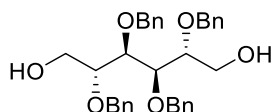
(0.2 g, 0.58 mmol) y NaN_3 (0.19 g, 2.9 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. por 4 h, después de este tiempo las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con H_2O , se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (1:1 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **52** como una espuma blanca (0.24 g, 97%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.²⁵



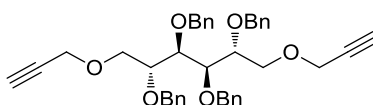
1,6-Bis-O-[(4-metoxifenil)difenilmetil]-D-manitol (54). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Matos y Murphy.²⁸ A una solución de D-manitol (**43**, 0.5 g, 2.74 mmol) y DMAP (0.17 g, 1.37 mmol) en piridina anhidra (4 mL) se añadió gota a gota una solución de MMT-Cl (1.77 g, 5.74 mmol) en piridina anhidra (6 mL) a 0 °C durante 1 hora. La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. bajo Ar por 48 h, posteriormente se diluyó con AcOEt (50 mL), se lavó con una solución saturada de NH_4Cl (2×20 mL) y salmuera (2×20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **54** como una espuma blanca (1.19 g, 60%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



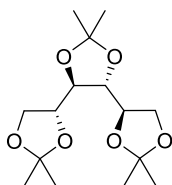
1,6-Bis-O-[(4-metoxifenil)difenilmetil]-2,3,4,5-tetra-O-bencil-D-manitol (55). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Matos y Murphy.²⁸ A una solución del derivado **54** (0.36 g, 0.5 mmol) en DMF anhidra (12 mL) se añadió NaH (60% en aceite mineral, 0.2 g, 5.0 mmol) y BnBr (0.6 mL, 5.0 mmol) a 0 °C y bajo Ar. La suspensión se agitó a t.a. por 3 h, posteriormente se eliminó el exceso de NaH con MeOH y AcOEt a 0 °C. La mezcla se lavó con salmuera (4×20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (20:1 ciclohexano-AcOEt) para dar el derivado **55** como una espuma blanca (496 mg, 92%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



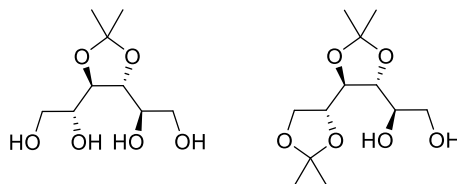
2,3,4,5-Tetra-*O*-bencil-D-manitol (56). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Matos y Murphy.²⁸ A una solución del derivado **55** (0.52 g, 0.48 mmol) en una mezcla 10:3 MeOH-CH₂Cl₂ (8 mL) se agregó H₂SO₄ conc. (100 μ L). La reacción se mantuvo en agitación a t.a. por 24 h, posteriormente se neutralizó con NaHCO₃, se filtró y se lavó con salmuera (3 \times 10 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 ciclohexano-AcOEt) para dar el derivado **56** como un aceite incoloro (236 mg, 90%). Los datos físicos espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



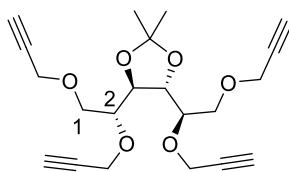
2,3,4,5-Tetra-*O*-bencil-1,6-di-*O*-(prop-2-inil)-D-manitol (57). A una solución del compuesto **55** (0.23 g, 0.42 mmol) en DMF anhidra (15 mL), se añadió NaH (60% en aceite mineral, 68 mg, 1.69 mmol) a 0 °C y bajo Ar. La suspensión se agitó por 15 min a t.a. y posteriormente se añadió una solución de bromuro de propargilo (80% en tolueno, 0.19 mL, 1.69 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 47 h, después de este tiempo el exceso de NaH se eliminó con MeOH y AcOEt a 0 °C. La mezcla se diluyó con AcOEt, se lavó con salmuera (4 \times 25 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (19:1 ciclohexano-AcOEt) para dar el derivado **57** como un aceite amarillo (0.17 g, 67%). $[\alpha]_D^{20} +5$ (*c* 0.8, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.33-7.23 (m, 20H, Ar-H), 4.75 (d, 2H, $J_{gem} = 11.5$ Hz, CH₂Ph-2), 4.70 (d, 2H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH₂Ph-3), 4.62 (d, 2H, $J_{gem} = 11.5$ Hz, CH₂Ph-2), 4.47 (d, 2H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH₂Ph-3), 4.11 (d, 4H, $J_{H,H} = 2.3$ Hz, CH₂C \equiv CH), 3.99 (m, 2H, H-2), 3.94 (dd, 2H, $J_{gem} = 10.4$ Hz, $J_{1a,2} = 2.8$ Hz, H-1a), 3.87 (m, 2H, H-3), 3.77 (dd, 2H, $J_{gem} = 10.4$ Hz, $J_{1b,2} = 4.9$ Hz, H-1b), 2.34 (t, 2H, $J_{H,H} = 2.3$ Hz, CH₂C \equiv CH). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 138.9, 138.7 (Ar-*Cipso*), 128.4 (x2), 128.3 (x2), 127.9 (x2), 127.8 (x2) (Ar-C), 127.6, 127.5 (Ar-*Cp*), 79.9 (CH₂C \equiv CH), 79.2 (C-2), 79.0 (C-3), 74.7 (CH₂C \equiv CH), 74.4 (CH₂-Ph-2), 71.9 (CH₂-Ph-3), 69.2 (C-1), 58.6 (CH₂C \equiv CH). HRESI-MS calculado para C₄₀H₄₂NaO₆ ([M+Na]⁺): 641.2879, observado: 641.2823.



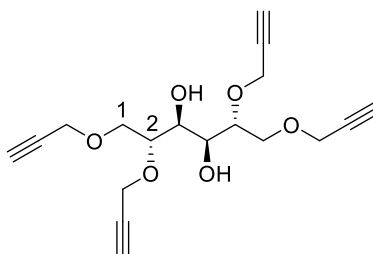
1,2:3,4:5,6-Tri-*O*-isopropilideno-D-manitol (58). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Yadav y Agrawal.²⁹ A una suspensión de D-manitol (**43**, 1.5 g, 8.2 mmol) en acetona anhidra (19 mL) se añadió H₂SO₄ conc. (0.15 mL). La mezcla se agitó a t.a. por 41 h, después de este tiempo, se añadió H₂O y se neutralizó con NaOH ac. El disolvente orgánico se evaporó y se añadió CH₂Cl₂ (20 mL). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna (7:3 ciclohexano-AcOEt) para dar el derivado **58** como un sólido blanco (1.67 g, 67%). Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.



3,4-*O*-Isopropilideno-D-manitol (59) y 3,4:5,6-di-*O*-isopropilideno-D-manitol (60). Se sintetizó de acuerdo a la metodología descrita por Chen y Xie.³⁰ A una solución acuosa de AcOH al 30% (25 mL) se añadió una solución del derivado **58** (1.67 g, 5.52 mmol) en MeOH (4 mL). La mezcla resultante se calentó a 40 °C por 1 h, después de este tiempo el disolvente se evaporó y el AcOH se co-evaporó con tolueno. El residuo se disolvió con acetona anhidra y se añadió K₂CO₃ anhidro en exceso. La mezcla se agitó por 5 minutos, posteriormente el sólido se filtró y se lavó con acetona. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (1:1 ciclohexano-AcOEt → 9:1 CH₂Cl₂-MeOH) para dar los derivados **59** (0.54 g, 44%) y **60** (0.33 g, 23%) como un aceite incoloro y un sólido blanco, respectivamente. Se recuperaron 150 mg de materia prima. Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.^{30,31}

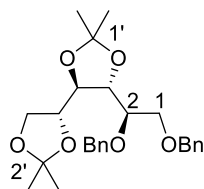


3,4-*O*-Isopropilideno-1,2,5,6-tetra-*O*-(prop-2-inil)-D-manitol (61). A una solución del derivado **60** (0.49 g, 2.2 mmol) en DMF anhidra (30 mL) se añadió NaH (60% en aceite mineral, 1.0 g, 26.3 mmol) a 0 °C y bajo Ar. La suspensión se agitó por 15 min y se añadió una solución de bromuro de propargilo (80% en tolueno, 2.9 mL, 26.3 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 25 h, después de este tiempo el exceso de NaH se eliminó con MeOH a 0 °C. La mezcla se diluyó con AcOEt, se lavó con salmuera (3×20 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (9:1 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **61** como un aceite amarillo (0.77 g, 94%). $[\alpha]_D^{20} +6$ (*c* 0.8, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 4.38 (dd, 2H, $J_{gem} = 16.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2a}C \equiv CH-2), 4.35 (dd, 2H, $J_{gem} = 16.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2b}C \equiv CH-2), 4.20 (dd, 2H, $J_{gem} = 15.9$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2a}C \equiv CH-1), 4.15 (dd, 2H, $J_{gem} = 15.9$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2b}C \equiv CH-1), 4.14 (dd, 2H, $J_{3,2} = 3.6$ Hz, $J_{3,1} = 1.5$ Hz, H-3), 3.88 (dddd, 2H, $J_{2,3} = 3.6$ Hz, $J_{2,1b} = 6.3$ Hz, $J_{2,1a} = 3.2$ Hz, $J_{H,H} = 1.5$ Hz, H-2), 3.84 (dd, 2H, $J_{1a,1b} = 10.6$ Hz, $J_{1a,2} = 3.2$ Hz, H-1a), 3.64 (dd, 2H, $J_{1b,1a} = 10.6$ Hz, $J_{1b,2} = 6.3$ Hz, H-1b), 2.44 (t, 2H, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH₂C \equiv CH-2), 2.42 (t, 2H, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH₂C \equiv CH-1), 1.39 (s, 6H, CH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 110.1 (C(CH₃)₂), 80.1 (CH₂C \equiv CH-2), 79.7 (CH₂C \equiv CH-1), 78.1 (C-2), 78.0 (C-3), 74.8 (CH₂C \equiv CH-1), 74.7 (CH₂C \equiv CH-2), 70.0 (C-1), 58.7 (CH₂C \equiv CH-1), 58.0 (CH₂C \equiv CH-2), 27.2 (CH₃). HRESI-MS calculado para C₂₁H₂₆NaO₆ ([M+Na]⁺): 397.1627, observado: 397.1663.



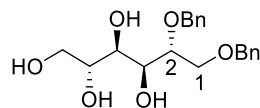
1,2,5,6-Tetra-*O*-(prop-2-inil)-D-manitol (62). A una solución del derivado **61** (0.12 g, 0.32 mmol) en MeOH (2.7 mL) se añadió HCl 1M (0.3 mL). La mezcla resultante se mantuvo a reflujo por 2.5 h, posteriormente se enfrió a t.a., se añadió exceso de NaHCO₃ y se agitó por 15

min. El sólido se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna (7:3 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **62** como un aceite amarillo (0.1 g, 94%). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 4.37 (dd, 2H, $J_{\text{gem}} = 16.0$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{C}\equiv\text{CH}-2$), 4.32 (dd, 2H, $J_{\text{gem}} = 16.0$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}\text{C}\equiv\text{CH}-2$), 4.20 (d, 4H, $J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-1$), 3.91 (m, 2H, H-3), 3.88 (m, 2H, H-1a), 3.85 (m, 2H, H-2), 3.75 (dd, $J_{1\text{b},1\text{a}} = 10.1$ Hz, $J_{1\text{b},2} = 4.8$ Hz, 2H, H-1b), 2.84 (d, 2H, $J_{\text{OH},3} = 6.2$ Hz, OH), 2.46 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-2$), 2.45 (t, 2H, $J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-1$). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 80.0 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-2$), 79.5 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-1$), 78.2 (C-2), 75.0 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-1$), 74.8 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-2$), 69.8 (C-1), 69.4 (C-3), 58.8 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-1$), 58.1 ($\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-2$). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NaO}_6$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 357.1314, observado: 357.1295.

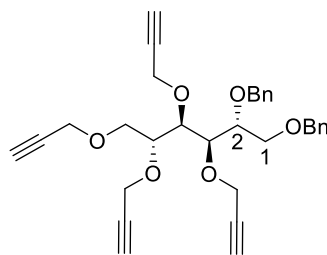


1,2-Di-O-bencil-3,4:5,6-di-O-isopropilideno-D-manitol (63). A una solución del compuesto **59** (0.33 g, 1.26 mmol) en DMF anhidra (10 mL), se agregó NaH (60% en aceite mineral, 0.3 g, 7.6 mmol) a 0 °C y bajo Ar. La suspensión se agitó por 15 min a esa temperatura y posteriormente se agregó bromuro de bencilo (0.9 mL, 7.6 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 3 h, después de este tiempo el exceso de NaH se eliminó con MeOH a 0 °C. La mezcla se diluyó con AcOEt, se lavó con salmuera (3×10 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna (20:1 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **63** como un aceite incoloro (0.52 g, 94%). $[\alpha]_D^{20} +7$ (c 1.3, CHCl_3). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.36-7.24 (m, 10H, Ar-H), 4.78 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_{2\text{a}}\text{Ph}-2$), 4.68 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, $\text{CH}_{2\text{b}}\text{Ph}-2$), 4.54 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{Ph}-1$), 4.13 (q, 1H, $J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, H-5), 4.07 (m, 1H, H-3), 4.06 (m, 1H, H-4), 4.05 (m, 1H, H-6a), 3.91 (dd, 1H, $J_{6\text{b},6\text{a}} = 8.3$ Hz, $J_{6\text{b},5} = 6.1$ Hz, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, $J_{2,1\text{b}} = 6.1$ Hz, $J_{2,1\text{a}} = J_{2,3} = 3.9$ Hz, H-2), 3.78 (dd, 1H, $J_{1\text{a},1\text{b}} = 10.4$ Hz, $J_{1\text{a},2} = 3.9$ Hz, H-1a), 3.65 (dd, 1H, $J_{1\text{b},1\text{a}} = 10.4$ Hz, $J_{1\text{b},2} = 6.1$ Hz, H-1b), 1.37 (s, 6H, CH_3-1'), 1.35 (s, 3H, CH_3-2'), 1.31 (s, 3H, CH_3-2'). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) δ 138.5, 138.4 (Ar-Cipso), 128.5 (x2), 128.4 (x2), 128.1 (x2), 127.7 (x2), 127.7 (x2) (Ar-C), 109.9 (C-1'), 109.6 (C-2'), 79.8 (C-3), 78.6 (C-4), 78.6 (C-2), 77.1 (C-5), 73.5 ($\text{CH}_2\text{Ph}-1$), 73.1

(CH₂Ph-2), 70.3 (C-1), 66.9 (C-6), 27.4 (x2) (CH₃-1'), 26.6 (CH₃-2'), 25.5 (CH₃-2'). HRESI-MS calculado para C₂₆H₃₄NaO₆ ([M+Na]⁺): 465.2253, observado: 465.2202.

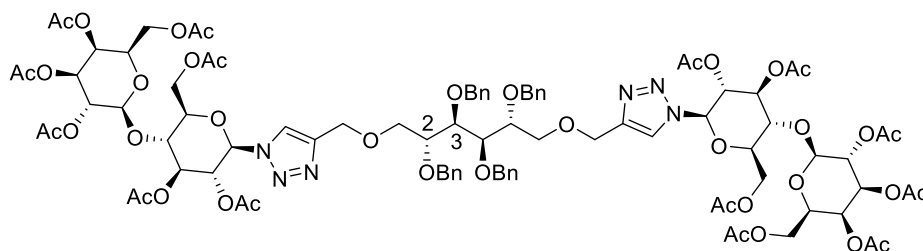


1,2-Di-O-bencil-D-manitol (64). A una solución del compuesto **63** (0.49 g, 1.1 mmol) en MeOH (9 mL) se agregó HCl 1M (1 mL). La mezcla se colocó a reflujo por 3 h, después de este tiempo se enfrió a t.a. y se añadió NaHCO₃ en exceso. La suspensión se agitó por 15 min, posteriormente el sólido se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna (15:1 CH₂Cl₂-MeOH) para dar el compuesto **64** como un sólido blanco (0.35 g, 88%). $[\alpha]_D^{20}$ -3 (c 0.9, MeOH). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 7.36-7.23 (m, 10H, Ar-H), 4.73 (d, 1H, $J_{gem} = 11.2$ Hz, CH_{2a}Ph-2), 4.61 (d, 1H, $J_{gem} = 11.2$ Hz, CH_{2b}Ph-2), 4.58 (d, 1H, $J_{gem} = 12.2$ Hz, CH_{2a}Ph-1), 4.55 (d, 1H, $J_{gem} = 12.2$ Hz, CH_{2b}Ph-1), 3.97 (dd, 1H, $J_{3,2} = 8.2$ Hz, $J_{3,4} = 0.7$ Hz, H-3), 3.89 (dd, 1H, $J_{1a,1b} = 10.3$ Hz, $J_{1a,2} = 2.5$ Hz, H-1a), 3.81 (m, 2H, H-6a, H-5), 3.77 (ddd, 1H, $J_{2,3} = 8.2$ Hz, $J_{2,1b} = 5.3$ Hz, $J_{2,1a} = 2.5$ Hz, H-2), 3.72 (dd, 1H, $J_{1b,1a} = 10.3$ Hz, $J_{1b,2} = 5.3$ Hz, H-1b), 3.70 (m, 1H, H-4), 3.63 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 11.1$ Hz, $J_{6b,5} = 6.0$ Hz, H-6b), RMN ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD) δ 140.1, 139.8 (Ar-C_{ipso}), 129.3 (x2), 129.2 (x2), 129.0 (x2), 128.8 (x2) (Ar-C), 128.6, 128.5 (Ar-Cp), 80.0 (C-2), 74.4 (CH₂Ph-1), 73.8 (CH₂Ph-2), 73.0 (C-4), 71.4 (C-1), 71.3 (C-5), 70.1 (C-3), 65.1 (C-6). HRESI-MS calculado para C₂₀H₂₆NaO₆ ([M+Na]⁺): 385.1627, observado: 385.1631.



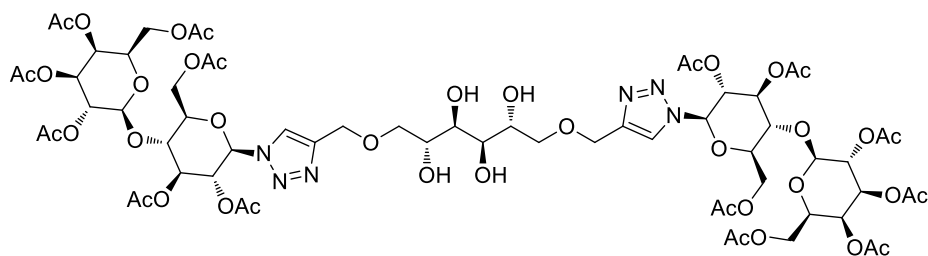
1,2-Di-O-bencil-3,4,5,6-tetra-O-(prop-2-inil)-D-manitol (65). A una solución del compuesto **64** (0.33 g, 0.91 mmol) en DMF anhidra (10 mL) se agregó NaH (60% en aceite mineral, 0.43 g, 10.9 mmol) a 0 °C y bajo Ar. La suspensión se agitó a esa temperatura por 15 min, posteriormente se agregó bromuro de propargilo (80% en tolueno, 1.2 mL, 10.9 mmol). La mezcla resultante se mantuvo en agitación a t.a. por 18 h, después de este tiempo se eliminó el

exceso de NaH con MeOH a 0 °C. La reacción se diluyó con AcOEt, se lavó con salmuera (3×10 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (10:1 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **65** como un aceite amarillo (0.44 g, 94%). $[\alpha]_D^{20}$ -2 (c 1.2, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.25 (m, 10H, Ar-H), 4.72 (d, 1H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH_{2a}Ph-2), 4.62 (d, 1H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH_{2b}Ph-2), 4.59 (d, 1H, $J_{gem} = 12.2$ Hz, CH_{2a}Ph-1), 4.55 (d, 1H, $J_{gem} = 12.2$ Hz, CH_{2b}Ph-1), 4.39 (dd, 1H, $J_{gem} = 15.6$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2a}C \equiv CH-3), 4.35 (dd, 1H, $J_{gem} = 15.6$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2b}C \equiv CH-3), 4.32 (dd, 1H, $J_{gem} = 15.5$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2a}C \equiv CH-4), 4.32 (dd, 1H, $J_{gem} = 16.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2a}C \equiv CH-5), 4.26 (dd, 1H, $J_{gem} = 16.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2b}C \equiv CH-5), 4.25 (dd, 1H, $J_{gem} = 15.5$ Hz, $J_{H,H} = 2.4$ Hz, CH_{2b}C \equiv CH-4), 4.20 (dd, 1H, $J_{gem} = 16.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.3$ Hz, CH_{2a}C \equiv CH-6), 4.17 (dd, 1H, $J_{gem} = 16.0$ Hz, $J_{H,H} = 2.3$ Hz, CH_{2b}C \equiv CH-6), 3.96 (dd, 1H, $J_{H,H} = 5.8$ Hz, $J_{H,H} = 2.9$ Hz, H-3), 3.94 (m, 1H, H-6a), 3.93 (m, 1H, H-5), 3.92 (m, 1H, H-4), 3.91 (m, 1H, H-1a), 3.87 (m, 1H, H-2), 3.73 (m, 1H, H-6b), 3.72 (m, 1H, H-1b), 2.43 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.3$ Hz), 2.42 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.4$ Hz), 2.40 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.3$ Hz), 2.36 (t, 1H, $J_{H,H} = 2.3$ Hz) (CH₂C \equiv CH). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 138.7, 138.4 (Ar-C_{ipso}), 128.5 (x2), 128.4 (x2), 127.9 (x2), 127.8 (x2) (Ar-C), 127.7, 127.6 (Ar-C_p), 80.4 (CH₂C \equiv CH-3), 80.3 (CH₂C \equiv CH-4), 80.0 (CH₂C \equiv CH-5), 79.7 (CH₂C \equiv CH-6), 78.6 (C-2), 78.5 (C-3), 78.3 (C-4), 77.6 (C-5), 74.9 (CH₂C \equiv CH-6), 74.9 (CH₂C \equiv CH-5), 74.6 (CH₂C \equiv CH-4), 74.6 (CH₂C \equiv CH-3), 73.5 (CH₂Ph-1), 71.9 (CH₂Ph-2), 69.1 (C-1), 68.3 (C-6), 59.8 (x2) (CH₂C \equiv CH-3, CH₂C \equiv CH-4), 58.6 (CH₂C \equiv CH-6), 57.1 (CH₂C \equiv CH-5). HRESI-MS calculado para C₃₂H₃₅NaO₆ ([M+H]⁺): 515.2434, observado: 515.2418.



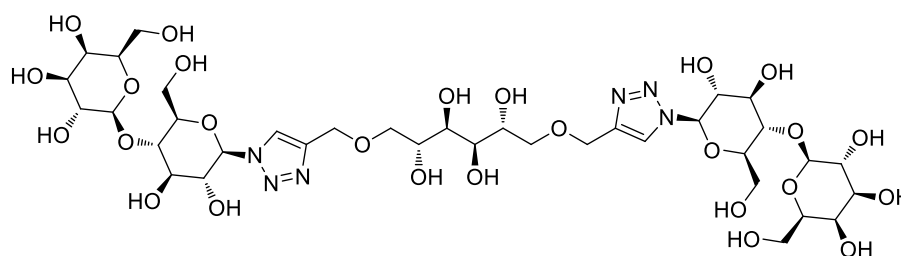
2,3,4,5-Tetra-O-bencil-1,6-bis-O-[1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (66**). A una solución del compuesto **47** (0.29 g, 0.44 mmol) y el derivado **57** (0.125 g, 0.2 mmol) en una mezcla 3:2 THF-H₂O (17.5 mL), se añadieron ascorbato de sodio (48 mg, 0.24 mmol) y CuSO₄·5H₂O (60**

mg, 0.24 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 18 h. Después de este tiempo el disolvente se evaporó y el residuo se disolvió con CH_2Cl_2 , se lavó con H_2O (2×15 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (1:1 \rightarrow 1:2 ciclohexano-AcOEt) para dar el compuesto **66** como una espuma blanca (0.35 g, 89%). $[\alpha]_D^{20}$ -6 (*c* 0.8, MeOH). RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 8.07 (s, 2H, H-triazol), 7.29-7.23 (m, 20H, Ar-H), 6.04 (d, 2H, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, H-1 Glc), 5.50 (dd, 2H, $J_{2,3} = 9.4$ Hz, $J_{2,1} = 9.0$ Hz, H-2 Glc), 5.45 (dd, 2H, $J_{3,2} = 9.4$ Hz, $J_{3,4} = 8.6$ Hz, H-3 Glc), 5.38 (d, 2H, $J_{\text{H,H}} = 3.3$ Hz, H-4 Gal), 5.14 (dd, 2H, $J_{3,2} = 10.4$ Hz, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-3 Gal), 5.05 (dd, 2H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{2,1} = 7.8$ Hz, H-2 Gal), 4.77 (d, 2H, $J_{1,2} = 7.8$ Hz, H-1 Gal), 4.62 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, $\text{CH}_{2\text{aPh-2}}$), 4.57 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, $\text{CH}_{2\text{aPh-3}}$), 4.56 (m, 4H, CH_2 triazol), 4.55 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, $\text{CH}_{2\text{bPh-2}}$), 4.50 (d, 2H, $J_{6\text{a},6\text{b}} = 11.3$ Hz, H-6a Glc), 4.40 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.7$ Hz, $\text{CH}_{2\text{bPh-3}}$), 4.17 (m, 6H, H-5 Gal, H-6 Gal), 4.15 (d, 2H, $J_{6\text{b},6\text{a}} = 11.3$ Hz, H-6b Glc), 4.11 (m, 2H, H-5 Glc), 4.06 (dd, 2H, $J_{4,5} = 9.3$ Hz, $J_{4,3} = 8.6$ Hz, H-4 Glc) 3.95 (m, 2H, H-2), 3.86 (dd, 2H, $J_{1\text{a},1\text{b}} = 10.5$ Hz, $J_{1\text{a},2} = 2.4$ Hz, H-1a), 3.80 (m, 2H, H-3), 3.69 (dd, 2H, $J_{1\text{b},1\text{a}} = 10.5$ Hz, $J_{1\text{b},2} = 4.7$ Hz, H-1b), 2.14 (s, 6H), 2.07 (s, 6H), 2.06 (s, 6H), 2.03 (s, 6H), 1.97 (s, 6H), 1.93 (s, 6H), 1.72 (s, 6H) (OCOCH_3). RMN ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) δ 172.2, 172.0, 171.9, 171.5, 171.4, 171.1, 170.4 (OCOCH_3), 146.7 (C-4 triazol), 140.1, 139.9 (Ar-C $_{\text{ipso}}$), 129.4 (x2), 129.3 (x2), 129.0 (x2), 129.0 (x2), 128.6, 128.6 (Ar-C), 124.1 (C-5 triazol), 102.1 (C-1 Gal), 86.4 (C-1 Glc), 80.1 (C-2), 80.0 (C-3), 77.0 (C-4 Glc), 77.0 (C-5 Glc), 75.4 ($\text{CH}_2\text{Ph-2}$), 74.2 (C-3 Glc), 72.6 ($\text{CH}_2\text{Ph-3}$), 72.4 (C-3 Gal), 72.1 (C-2 Glc), 71.9 (C-5 Gal), 70.7 (C-2 Gal), 70.3 (C-1), 68.6 (C-4 Gal), 65.0 (CH_2 triazol), 63.5 (C-6 Glc), 62.4 (C-6 Gal), 21.1, 20.7, 20.7, 20.7, 20.5 (x2), 20.2 (OCOCH_3). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{92}\text{H}_{113}\text{N}_6\text{O}_{40}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$): 1941.6987, observado: 1941.7081.



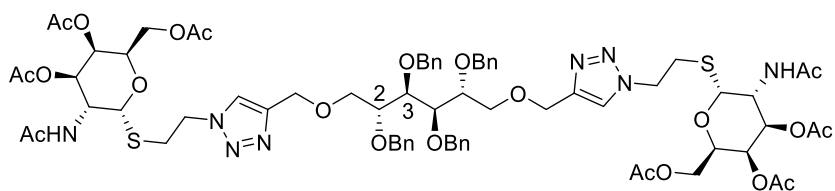
1,6-Bis-*O*-[1-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (67**).**

A una solución del derivado **66** (0.3 g, 0.15 mmol) en una mezcla 7:3 MeOH-AcOEt (10 mL) se añadieron 10% Pd/C (0.2 g) y AcOH catalítico (0.2 mL). La mezcla resultante se hidrogenó a 1 atm y t.a. por 4 días. Después de este tiempo el catalizador se filtró sobre Celita® y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna (30:1 CH₂Cl₂-MeOH) para dar el compuesto **67** como una espuma blanca. RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 8.23 (s, 2H, H-triazol), 6.09 (d, 2H, $J_{1,2} = 9.2$ Hz, H-1 Glc), 5.55 (dd, 2H, $J_{2,3} = 9.4$ Hz, $J_{2,1} = 9.2$ Hz, H-2 Glc), 5.46 (dd, 2H, $J_{3,2} = 9.4$ Hz, $J_{3,4} = 8.8$ Hz, H-3 Glc), 5.38 (d, 2H, $J_{H,H} = 3.5$ Hz, H-4 Gal), 5.14 (dd, 2H, $J_{3,2} = 10.4$ Hz, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, H-3 Gal), 5.04 (dd, 2H, $J_{2,3} = 10.4$ Hz, $J_{2,1} = 7.9$ Hz, H-2 Gal), 4.79 (d, 2H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1 Gal), 4.67 (s, 4H, CH₂ triazol), 4.55 (d, 2H, $J_{6a,6b} = 11.6$ Hz, H-6a Glc), 4.20 (m, 2H, H-5 Gal), 4.18 (m, 2H, H-6b Glc), 4.16 (m, 6H, H-6 Gal, H-5 Glc), 4.11 (m, 2H, H-4 Glc), 3.92 (d, 2H, $J_{3,2} = 7.6$ Hz, H-3), 3.88 (ddd, 2H, $J_{2,3} = 7.6$ Hz, $J_{2,1b} = 5.4$ Hz, $J_{2,1a} = 3.3$ Hz, H-2), 3.72 (dd, 2H, $J_{1a,1b} = 10.0$ Hz, $J_{1a,2} = 3.3$ Hz, H-1a), 3.67 (dd, 2H, $J_{1b,1a} = 10.0$ Hz, $J_{1b,2} = 5.4$ Hz, H-1b), 2.14 (s, 6H), 2.07 (s, 6H), 2.07 (s, 6H), 2.06 (s, 6H), 2.06 (s, 6H), 1.94 (s, 6H), 1.83 (s, 6H) (OCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD) δ 172.4, 172.2, 171.9, 171.7, 171.5, 171.3, 170.6 (OCOCH₃), 146.2 (C-4 triazol), 124.2 (C-5 triazol), 101.8 (C-1 Gal), 86.3 (C-1 Glc), 76.8 (C-5 Glc), 76.8 (C-4 Glc), 74.1 (C-3 Glc), 72.7 (C-1), 72.4 (C-3 Gal), 72.0 (C-2 Glc), 71.8 (C-2), 71.6 (C-5 Gal), 70.6 (C-2 Gal), 70.4 (C-3), 68.6 (C-4 Gal), 65.0 (CH₂ triazol), 63.4 (C-6 Glc), 62.3 (C-6 Gal), 21.0, 20.6, 20.6, 20.6, 20.4 (x2), 20.1 (OCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₆₄H₈₈N₆NaO₄₀ ([M+Na]⁺): 1603.4934, observado: 1603.4972.



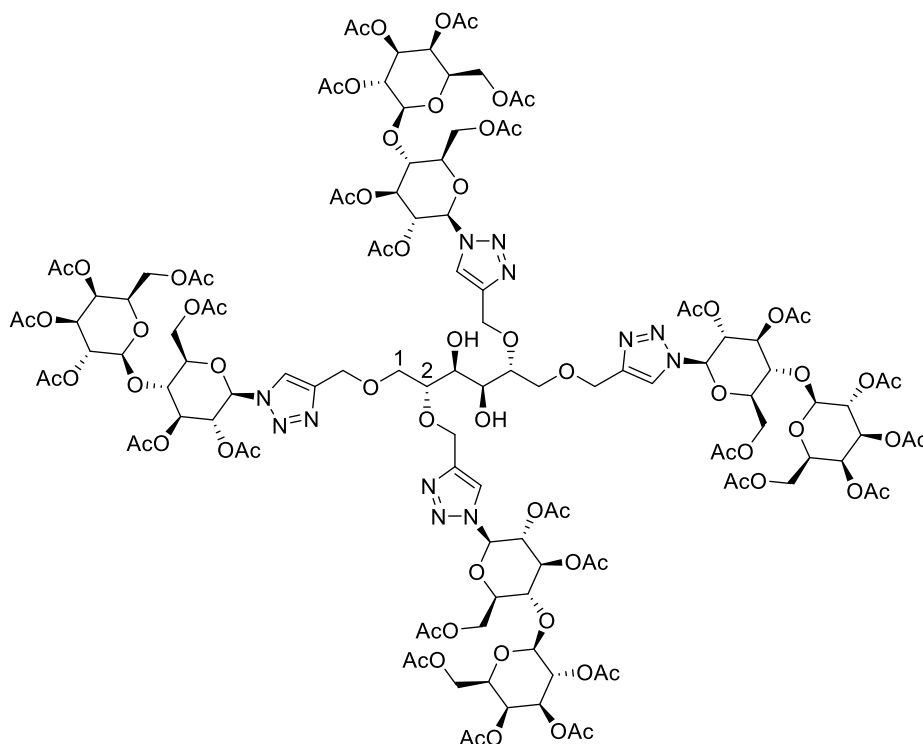
1,6-Di-O-[1-(β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-

manitol (68). A una solución del derivado **67** (0.24 g, 0.15 mmol) en MeOH anhidro (10 mL) se añadió una solución recién preparada de NaOMe 1M en MeOH (0.3 mL). La mezcla se agitó a t.a. por 2 h, después se añadió Amberlita IR-120 H⁺ y se agitó hasta alcanzar un pH = 7. La resina se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (H₂O \rightarrow 1:1 MeCN-H₂O) para dar el compuesto **68** como un polvo amarillo (51 mg, 34% desde **66**). $[\alpha]_D^{20}$ +13 (c 1.2, DMSO). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.28 (s, 2H, H-triazol), 5.62 (d, 2H, $J_{1,2}$ = 9.3 Hz, H-1 Glc), 5.57 (d, 2H, $J_{H,H}$ = 5.8 Hz, OH), 5.13 (d, 2H, $J_{H,H}$ = 3.9 Hz, OH), 4.90 (s, 2H, OH), 4.83 (sa, 2H, OH), 4.69 (t, 4H, $J_{H,H}$ = 5.7 Hz, OH), 4.63 (d, 2H, $J_{H,H}$ = 5.7 Hz, OH), 4.56 (s, 4H, CH₂ triazol), 4.55 (sa, 2H, OH), 4.26 (d, 2H, $J_{1,2}$ = 7.2 Hz, H-1 Gal), 4.18 (d, 2H, $J_{H,H}$ = 7.5 Hz, OH), 3.84 (td, 2H, $J_{2,H}$ = 9.3 Hz, $J_{2,OH}$ = 5.8 Hz, 2H, H-2 Glc), 3.77 (m, 2H, H-6a Glc), 3.71 (dd, 2H, $J_{1a,1b}$ = 9.7 Hz, $J_{1a,2}$ = 1.6 Hz, H-1a), 3.65 (m, 2H, H-5 Glc), 3.63 (m, 2H, H-3), 3.60 (m, 4H, H-4 Gal, H-6b Glc), 3.58 (m, 2H, H-3 Glc), 3.56 (m, 2H, H-2), 3.54 (m, 4H, H-6 Gal), 3.49 (m, 2H, H-5 Gal), 3.48 (m, 4H, H-4 Glc, H-1b), 3.35 (m, 2H, H-2 Gal), 3.34 (m, 2H, H-3 Gal). RMN ¹³C (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 144.3 (C-4 triazol), 123.0 (C-5 triazol), 103.8 (C-1 Gal), 86.9 (C-1 Glc), 79.8 (C-4 Glc), 77.8 (C-5 Glc), 75.6 (C-5 Gal), 75.2 (C-3 Glc), 73.3 (C-1), 73.3 (C-3 Gal), 71.8 (C-2 Glc), 70.6 (C-2 Gal), 69.6 (C-4 Gal), 69.2 (C-2), 68.2 (C-3), 63.9 (CH₂ triazol), 60.4 (C-6 Gal), 60.1 (C-6 Glc). HRESI-MS calculado para C₃₆H₆₀N₆NaO₂₆ ([M+Na]⁺): 1015.3455, observado: 1015.3399.



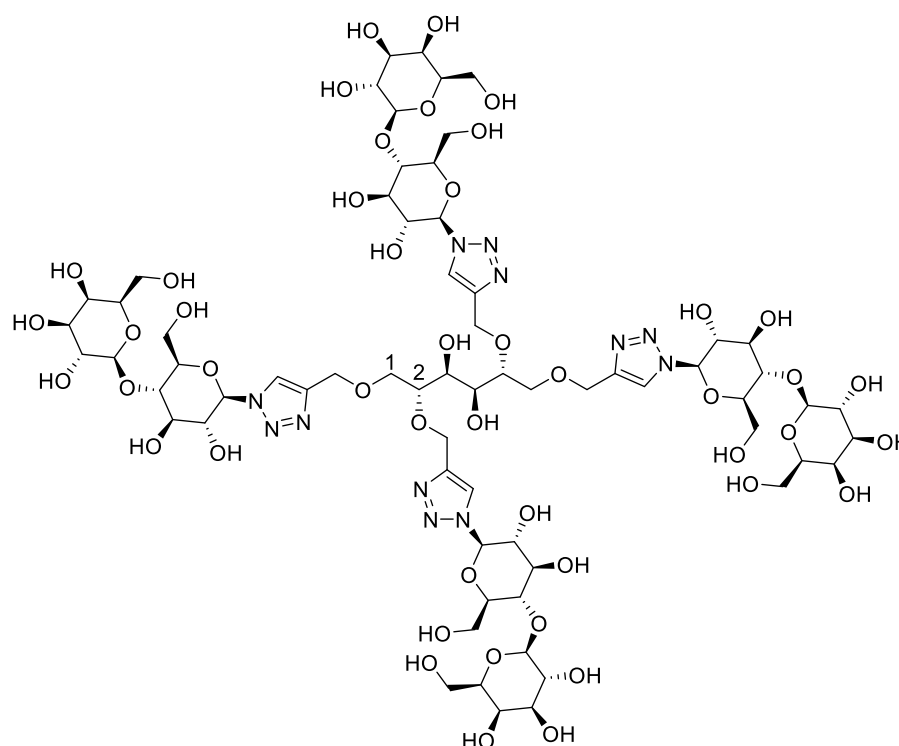
2,3,4,5-Tetra-*O*-bencil-1,6-bis-*O*-[1-{2-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranosil)etil}-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (69). A una solución de los derivados **52** (0.18 g, 0.41 mmol) y **57** (0.15 g, 0.25 mmol) en una mezcla 2:1 THF-H₂O (12 mL) se añadieron ascorbato de sodio (52 mg, 0.26 mmol) y CuSO₄·5H₂O (64 mg, 0.26 mmol). La mezcla se agitó a t.a. por 1 h, después de este tiempo el disolvente se evaporó y el residuo se disolvió con CH₂Cl₂, se lavó con H₂O (2×15 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (40:1 → 35:1 CH₂Cl₂-MeOH) para dar el compuesto **69** como una espuma blanca (0.29 g, 95%). $[\alpha]_D^{20} +80$ (*c* 0.7, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (s, 2H, H-triazol), 7.31-7.23 (m, 20H, Ar-H), 5.84 (d, 2H, $J_{\text{NH},2 \text{ Gal}} = 8.1$ Hz, NH), 5.61 (d, 2H, $J_{1,2} = 5.3$ Hz, H-1 Gal), 5.37 (d, 2H, $J_{\text{H,H}} = 2.4$ Hz, H-4 Gal), 4.98 (dd, 2H, $J_{3,2} = 11.8$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3 Gal), 4.74 (ddd, 2H, $J_{2,3} = 11.8$ Hz, $J_{2,\text{NH}} = 8.1$ Hz, $J_{2,1} = 5.3$ Hz, H-2 Gal), 4.67 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, CH_{2a}Ph-2), 4.61 (s, 4H, CH₂ triazol), 4.61 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.4$ Hz, CH_{2b}Ph-2), 4.60 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.6$ Hz, CH_{2a}Ph-3), 4.49 (m, 2H, H-5 Gal), 4.44 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 11.6$ Hz, CH_{2b}Ph-3), 4.44 (dt, 2H, $J_{\text{gem}} = 14.0$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SCH₂CH_{2a}), 4.38 (dt, 2H, $J_{\text{gem}} = 14.0$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SCH₂CH_{2b}), 4.12 (dd, 2H, $J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, $J_{6a,5} = 5.9$ Hz, H-6a Gal), 4.07 (dd, 2H, $J_{6b,6a} = 11.4$ Hz, $J_{6b,5} = 6.9$ Hz, H-6b Gal), 3.97 (m, 2H, H-2), 3.89 (dd, 2H, $J_{1a,1b} = 10.1$ Hz, $J_{1a,2} = 3.1$ Hz, H-1a), 3.86 (m, 2H, H-3), 3.73 (dd, 2H, $J_{1b,1a} = 10.1$ Hz, $J_{1b,2} = 4.6$ Hz, H-1b), 3.04 (dt, 2H, $J_{\text{gem}} = 14.0$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SCH_{2a}CH₂), 2.93 (dt, 2H, $J_{\text{gem}} = 14.0$ Hz, $J_{\text{H,H}} = 7.0$ Hz, SCH_{2b}CH₂), 2.16 (s, 3H), 2.0 (s, 3H), 1.98 (s, 3H) (OCOCH₃), 1.96 (s, 3H, NHCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 171.0 (OCOCH₃), 170.5 (NHCOCH₃), 170.4, 170.2 (OCOCH₃), 145.4 (C-4 triazol), 138.8, 138.7 (Ar-Cipso), 128.4 (x2), 128.3 (x2) (Ar-Cm), 127.8 (x2), 127.6 (x2) (Ar-Co), 127.5, 127.5 (Ar-Cp), 122.8 (C-5 triazol), 85.3 (C-1 Gal), 79.2 (C-2), 79.0 (C-3), 74.3 (CH₂Ph-2), 71.8 (CH₂Ph-3), 69.8 (C-1), 68.3 (C-3 Gal), 67.7 (C-5 Gal), 67.2 (C-4 Gal), 64.8 (CH₂ triazol), 62.0 (C-6 Gal), 49.6 (SCH₂CH₂), 48.5 (C-2 Gal), 31.1 (SCH₂CH₂), 23.3 (NHCOCH₃), 20.8, 20.7,

20.7 (OCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₇₂H₉₀N₈NaO₂₂S₂ ([M+Na]⁺): 1505.5509, observado: 1505.5563.



1,2,5,6-Tetraquis-O-[1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (71). A una solución de los derivados **47** (0.35 g, 0.53 mmol) y **62** (40 mg, 0.12 mmol) en una mezcla 2:1 THF-H₂O (20 mL), se añadieron ascorbato de sodio (70 mg, 0.35 mmol) y CuSO₄·5H₂O (60 mg, 0.25 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 5 h. Después de este tiempo el disolvente se evaporó y el residuo se disolvió con CH₂Cl₂, se lavó con salmuera (2×15 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (30:1 CH₂Cl₂-MeOH) para dar el compuesto **71** como un sólido amarillo (0.25 g, 71%). $[\alpha]_D^{20}$ -17 (*c* 1.5, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.80 (s, 2H, H-triazol 2), 7.78 (s, 2H, H-triazol 1), 5.86 (d, 2H, $J_{1,2}$ = 8.8 Hz, H-1 Glc-1), 5.82 (d, 2H, $J_{1,2}$ = 8.7 Hz, H-1 Glc-2), 5.43 (dd, 4H, $J_{2,3}$ = 9.7 Hz, $J_{2,1}$ = 8.8 Hz, H-2 Glc), 5.40 (td, 4H, $J_{3,2}$ = $J_{3,4}$ = 9.7 Hz, $J_{H,H}$ = 3.4 Hz, H-3 Glc), 5.34 (d, 4H, $J_{H,H}$ = 3.2 Hz, H-4 Gal), 5.11 (dd, 4H, $J_{2,3}$ = 10.4 Hz, $J_{2,1}$ = 7.9 Hz, H-2 Gal), 4.97 (dd, 4H, $J_{3,2}$ = 10.4 Hz, $J_{3,4}$ = 3.4 Hz, H-3 Gal), 4.81 (d, 2H, J_{gem} = 12.9 Hz, CH_{2a} triazol-2), 4.73 (d, 2H, J_{gem} = 12.9 Hz, CH_{2b} triazol-2), 4.68 (d, 2H, J_{gem} = 12.7 Hz, CH_{2a} triazol-

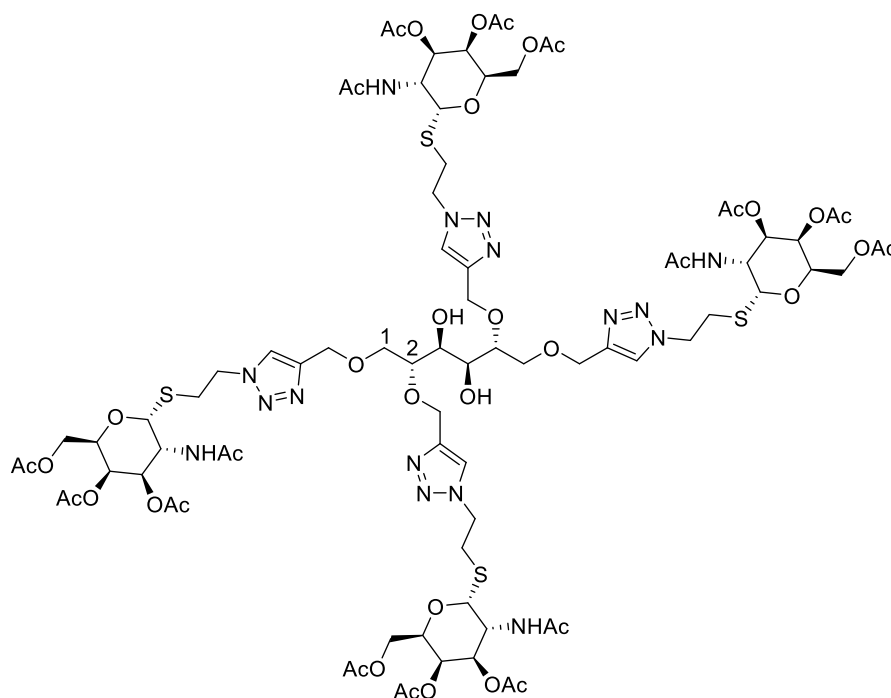
1), 4.62 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.7$ Hz, CH_{2b}-triazol-1), 4.55 (d, 4H, $J_{1,2} = 7.9$ Hz, H-1 Gal), 4.47 (d, 4H, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6a Glc), 4.15 (dd, 4H, $J_{6b,6a} = 12.2$ Hz, $J_{6b,5} = 5.2$ Hz, H-6b Glc), 4.13 (dd, 4H, $J_{6a,6b} = 11.2$ Hz, $J_{6a,5} = 6.3$ Hz, H-6a Gal), 4.08 (dd, 4H, $J_{6b,6a} = 11.2$ Hz, $J_{6b,5} = 7.5$ Hz, H-6b Gal), 4.0 (dd, 4H, $J_{4,3} = 9.7$ Hz, $J_{4,5} = 8.5$ Hz, H-4 Glc), 3.96 (m, 4H, H-5 Glc), 3.91 (m, 4H, H-5 Gal), 3.84 (m, 2H, H-3), 3.82 (m, 2H, H-1a), 3.68 (m, 2H, H-1b), 3.67 (m, 2H, H-2), 3.37 (d, 2H, $J_{\text{OH},3} = 6.8$ Hz, OH), 2.14 (s, 12H), 2.06 (s, 12H), 2.04 (s, 12H), 2.04 (s, 24H), 1.95 (s, 12H), 1.83 (s, 6H), 1.82 (s, 6H) (OCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 170.4 (x2), 170.4, 170.4, 170.2 (x2), 170.1 (x2), 169.6 (x2), 169.4, 169.4, 169.2 (x2) (OCOCH₃) 145.8 (C-4 triazol-2), 145.6 (C-4 triazol-1), 121.9 (C-5 triazol-2), 121.7 (C-5 triazol-1), 101.2 (x2) (C-1 Gal), 85.5 (x2) (C-1 Glc), 78.8 (C-2), 76.0, 75.9 (C-5 Glc), 75.8, 75.7 (C-4 Glc), 72.7 (x2) (C-3 Glc), 71.0 (x2) (C-3 Gal), 70.8 (x2) (C-2 Glc), 70.7 (x2) (C-5 Gal), 70.7 (C-1), 69.2 (x2) (C-2 Gal), 68.9 (C-3), 66.7 (x2) (C-4 Gal), 64.7 (CH₂ triazol-1), 63.8 (CH₂ triazol-2), 62.0 (x2) (C-6 Glc), 60.9 (x2) (C-6 Gal), 20.9 (x2), 20.8 (x2), 20.7, 20.7, 20.7 (x2), 20.7 (x2), 20.6 (x2), 20.3, 20.3 (OCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₁₂₂H₁₆₂N₁₂NaO₇₄ ([M+Na]⁺): 3001.9180, observado: 3001.8777.



1,2,5,6-Tetra-*O*-[1-(β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (72).

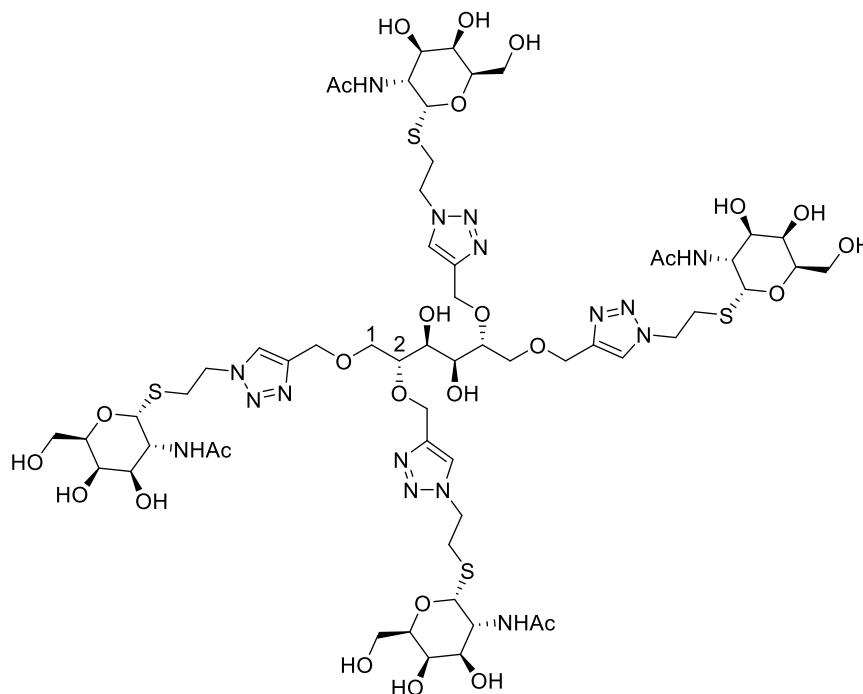
A una solución del derivado **71** (0.17 g, 0.058 mmol) en MeOH anhidro (5 mL) se añadió una solución recién preparada de NaOMe 1M en MeOH (1.0 mL). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 4 h, después de este tiempo se agregó Amberlita IR-120 H⁺ y se agitó hasta alcanzar un pH = 7. Posteriormente la resina se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (H₂O \rightarrow 1:1 MeCN-H₂O) para dar el compuesto **72** como un polvo blanco (0.1 g, 96%). $[\alpha]_D^{20} +14$ (*c* 1.0, DMSO). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.31 (s, 2H, H-triazol 1), 8.21 (s, 2H, H-triazol 2), 5.64 (d, 2H, $J_{1,2} = 9.1$ Hz, H-1 Glc-1), 5.62 (d, 2H, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, H-1 Glc-2), 5.55 (dd, 4H, $J_{H,H} = 9.5$ Hz, $J_{H,H} = 6.0$ Hz, OH), 5.12 (d, 4H, $J_{H,H} = 4.1$ Hz, OH), 4.88 (d, 4H, $J_{H,H} = 6.6$ Hz, OH), 4.80 (m, 4H, OH), 4.75 (d, 2H, $J_{gem} = 11.7$ Hz, CH_{2a} triazol-2), 4.67 (m, 10H, OH), 4.61 (m, 2H, CH_{2b} triazol-2), 4.60 (m, 4H, CH₂ triazol-1), 4.54 (m, 4H, OH), 4.26 (d, 2H, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, H-1 Gal), 4.25 (d, 2H, $J_{1,2} = 6.8$ Hz, H-1 Gal), 3.92 (d, 2H, $J_{H,H} = 9.6$ Hz, H-1a), 3.87 (m, 4H, H-2 Glc), 3.77 (m, 4H, H-6a Glc), 3.65 (m, 6H, H-5 Glc, H-2), 3.64 (m, 4H, H-4 Gal), 3.62 (m, 2H, H-1b), 3.60 (m, 6H, H-6b Glc, H-3), 3.58 (m, 4H, H-3 Glc), 3.56 (m, 4H, H-6a Gal), 3.52 (m, 4H, H-6b Gal), 3.50 (m, 4H, H-5 Gal), 3.49 (m, 4H, H-4 Glc), 3.35 (m, 4H, H-2 Gal), 3.34 (m, 4H, H-3 Gal). RMN

^{13}C (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 144.6 (C-4 triazol-2), 144.2 (C-4 triazol-1), 123.2 (C-5 triazol-1), 122.9 (C-5 triazol-2), 103.8 (x2) (C-1 Gal), 87.0 (x2) (C-1 Glc), 79.8 (x2) (C-4 Glc), 78.3 (C-2), 77.8, 77.8 (C-5 Glc), 75.6 (x2) (C-5 Gal), 75.2, 75.2 (C-3 Glc), 73.3 (x2) (C-3 Gal), 71.8 (x2) (C-2 Glc), 71.5 (C-1), 70.6 (x2) (C-2 Gal), 68.2 (x3) (C-3, C-4 Gal), 63.9 (CH_2 triazol-1), 63.5 (CH_2 triazol-2), 60.5 (x2) (C-6 Gal), 60.1 (x2) (C-6 Glc). HRESI-MS calculado para $\text{C}_{66}\text{H}_{106}\text{N}_{12}\text{NaO}_{46}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$): 1825.6222, observado: 1825.6100.



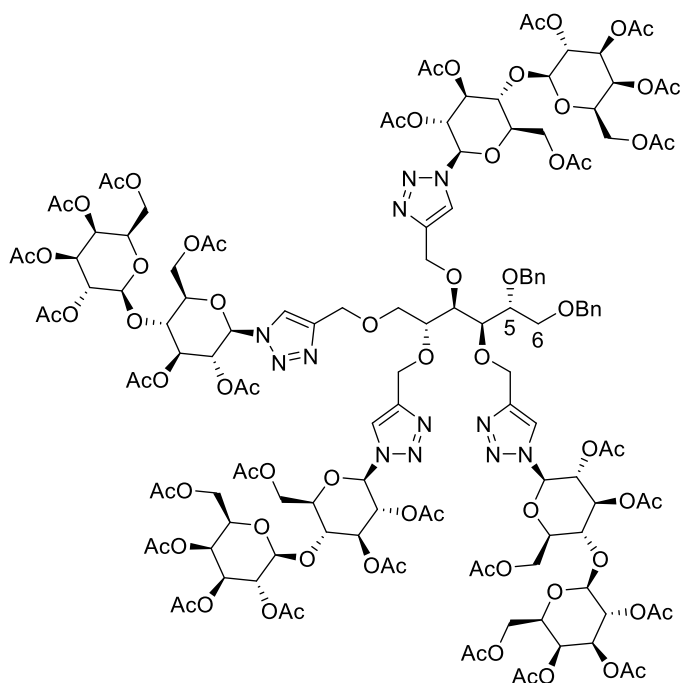
1,2,5,6-Tetraquis-*O*-[1-{2-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetil-2-desoxi-1-tio- α -D-galactopiranosil)etil}-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (75). A una solución de los derivados **52** (0.16 g, 0.37 mmol) y **62** (43 mg, 0.13 mmol) en una mezcla 2:1 THF- H_2O (10 mL), se añadieron ascorbato de sodio (26 mg, 0.13 mmol) y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (33 mg, 0.13 mmol). La mezcla resultante se mantuvo en agitación a t.a. por 1.5 h. Después de este tiempo el disolvente se evaporó y el residuo se disolvió con CH_2Cl_2 , se lavó con salmuera (2×10 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El producto se purificó por cromatografía en columna (15:1 CH_2Cl_2 -MeOH) para dar el compuesto **75** como un sólido blanco (0.11 g, 57%). $[\alpha]_D^{20} +81$ (c 1.1, CHCl_3). RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ 7.79 (s, 2H, H-triazol 1), 7.78 (s, 2H, H-triazol 2), 6.82 (d, 2H, $J_{\text{NH},2 \text{ Gal}} = 7.6$ Hz, NH), 6.76 (d, 2H, $J_{\text{NH},2 \text{ Gal}} = 7.6$ Hz, NH), 5.75 (d, 2H, $J_{1,2} = 4.6$ Hz, H-1 Gal), 5.74 (d, 2H, $J_{1,2} = 4.6$ Hz, H-1 Gal), 5.41 (s, 4H, H-4 Gal), 5.0 (dd,

2H, $J_{3,2} = 11.8$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3 Gal), 4.99 (dd, 2H, $J_{3,2} = 11.8$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3 Gal), 4.80 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, CH_{2a} triazol-2), 4.72 (m, 4H, H-2 Gal), 4.71 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, CH_{2b} triazol-2), 4.71 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, CH_{2a} triazol-1), 4.62 (d, 2H, $J_{\text{gem}} = 12.8$ Hz, CH_{2b} triazol-1), 4.61 (m, 8H, SCH₂CH₂), 4.55 (dd, 4H, $J_{5,6b} = 7.0$ Hz, $J_{5,6a} = 5.4$ Hz, H-5 Gal), 4.15 (dd, 4H, $J_{6a,6b} = 11.3$ Hz, $J_{6a,5} = 5.4$ Hz, H-6a Gal), 4.09 (dd, 4H, $J_{6b,6a} = 11.3$ Hz, $J_{6b,5} = 7.0$ Hz, H-6b Gal), 3.87 (t, 2H, $J_{3,H} = 6.4$ Hz, H-3), 3.80 (m, 2H, H-1a), 3.71 (m, 2H, H-2), 3.69 (m, 2H, H-1b), 3.65 (d, 2H, $J_{\text{OH},3} = 6.4$ Hz, OH), 3.18 (m, 4H, SCH₂CH₂), 3.08 (m, 4H, SCH₂CH₂), 2.16 (s, 12H), 2.0 (s, 6H), 1.99 (s, 6H), 1.99 (s, 12H), 1.98 (s, 6H) (OCOCH₃), 1.98 (s, 6H, NHCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 171.1, 171.1 (NHCOCH₃), 170.9, 170.9, 170.6, 170.6, 170.4, 170.4 (OCOCH₃), 145.3 (C-4 triazol-2), 145.0 (C-4 triazol-1), 123.7 (x2) (C-5 triazol-1, C-5 triazol-2), 85.2, 84.9 (C-1 Gal), 78.6 (C-2), 70.0 (C-1), 68.9 (C-3), 68.3 (x2) (C-3 Gal), 67.5 (x2) (C-5 Gal), 67.2 (x2) (C-4 Gal), 64.7 (CH₂-triazol-1), 63.7 (CH₂-triazol-2), 62.2, 62.2 (C-6 Gal), 49.8, 49.6 (SCH₂CH₂), 48.4 (x2) (C-2 Gal), 31.3, 31.2 (SCH₂CH₂), 23.2 (x2) (NHCOCH₃), 20.9, 20.9, 20.8 (x2), 20.8 (x2) (OCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₈₂H₁₁₈N₁₆NaO₃₈S₄ ([M+Na]⁺): 2085.6574, observado: 2085.6567.



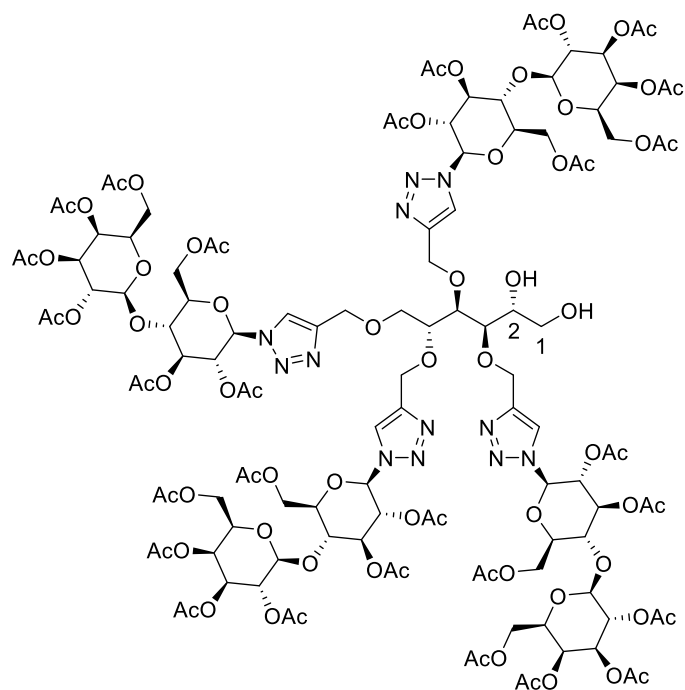
1,2,5,6-Tetra-O-[1-{2-(2-acetamido-2-desoxy-1-thio- α -D-galactopiranosil)etil}-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (76). A una solución del derivado **75** (42 mg, 0.02 mmol) en MeOH

anhidro (2 mL), se añadió una solución recién preparada de NaOMe 1M en MeOH (0.35 mL). La mezcla se agitó a t.a. por 4 h, posteriormente se agregó Amberlita IR-120 H⁺ y se agitó hasta alcanzar un pH = 7. La resina se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (H₂O → 1:1 MeCN-H₂O) para dar el compuesto **76** como un sólido blanco (24 mg, 76%). $[\alpha]_D^{20} +106$ (c 0.8, DMSO). RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.10 (s, 2H, H-triazol 1), 8.0 (s, 2H, H-triazol 2), 7.77 (d, 4H, $J_{\text{NH},2 \text{ Gal}} = 6.5$ Hz, NH), 5.51 (d, 4H, $J_{1,2} = 5.1$ Hz, H-1 Gal), 4.70 (m, 6H, OH, CH_{2a} triazol-2), 4.68 (m, 4H, OH), 4.61 (m, 2H, OH), 4.58 (m, 6H, CH_{2b} triazol-2, OH), 4.56 (m, 4H, CH₂ triazol-1), 4.53 (m, 8H, SCH₂CH₂), 4.19 (ddd, 4H, $J_{2,3} = 11.8$ Hz, $J_{2,\text{NH}} = 6.5$ Hz, $J_{2,1} = 5.1$ Hz, H-2 Gal), 3.92 (m, 4H, H-5 Gal), 3.85 (m, 2H, H-1a), 3.73 (m, 4H, H-4 Gal), 3.60 (m, 4H, H-2, H-3), 3.58 (m, 2H, H-1b), 3.55 (m, 8H, H-6 Gal), 3.50 (m, 4H, H-3 Gal), 3.02 (m, 4H, SCH₂CH₂), 2.93 (m, 4H, SCH₂CH₂), 1.81 (s, 6H), 1.80 (s, 6H) (NHCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.9, 169.9 (NHCOCH₃), 144.4 (C-4 triazol-2), 144.0 (C-4 triazol-1), 124.0 (C-5 triazol-1), 123.8 (C-5 triazol-2), 84.4 (x2) (C-1 Gal), 78.1 (C-2), 72.2, 72.2 (C-5 Gal), 71.1 (C-1), 68.1 (x3) (C-4 Gal, C-3), 67.5 (x2) (C-3 Gal), 64.0 (CH₂ triazol-1), 63.4 (CH₂ triazol-2), 60.9, 60.9 (C-6 Gal), 50.0 (x2) (C-2 Gal), 49.3 (x2) (SCH₂CH₂), 29.9, 29.8 (SCH₂CH₂), 22.7 (x2) (NHCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₅₈H₉₄N₁₆NaO₂₆S₄ ([M+Na]⁺): 1581.5306, observado: 1581.5365.



5,6-Di-O-bencil-1,2,3,4-tetraquis-O-[1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (77). A una solución de los derivados **47** (0.32 g, 0.48 mmol) y **65** (75 mg, 0.14 mmol) en una mezcla 2:1 THF-H₂O (20 mL), se añadieron ascorbato de sodio (60 mg, 0.3 mmol) y CuSO₄·5H₂O (74 mg, 0.3 mmol). La mezcla resultante se agitó a t.a. por 7 h. Después de este tiempo el disolvente se evaporó y el residuo se disolvió con CH₂Cl₂, se lavó con salmuera (2×15 mL), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (25:1 CH₂Cl₂-Isopropanol) para dar el derivado **77** como un sólido amarillo (0.31 g, 82%). $[\alpha]_D^{20}$ -16 (*c* 1.0, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.71 (s, 1H) (H-triazol), 7.33-7.22 (m, 10H, Ar-H), 5.84 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 9.0 Hz), 5.79 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 9.2 Hz), 5.76 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 9.2 Hz), 5.75 (d, 1H, $J_{1,2}$ = 9.2 Hz) (H-1 Glc), 5.54 (dd, 1H, $J_{2,3}$ = 9.4 Hz, $J_{2,1}$ = 9.2 Hz, H-2 Glc), 5.47 (m, 3H, H-2 Glc), 5.41 (dd, 1H, $J_{3,4}$ = $J_{3,2}$ = 9.3 Hz, H-3 Glc), 5.39 (m, 3H, H-3 Glc), 5.36 (m, 4H, H-4 Gal), 5.13 (dd, 4H, $J_{2,3}$ = 10.0 Hz, $J_{2,1}$ = 8.2 Hz, H-2 Gal), 4.99 (m, 4H, H-3 Gal), 4.79 (d, 1H, J_{gem} = 12.0 Hz), 4.75 (d, 1H, J_{gem} = 12.0 Hz), 4.72 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.68 (m, 1H) (CH₂-triazol), 4.66 (d, 1H, J_{gem} = 11.5 Hz, CH_{2a}Ph-5), 4.62 (m, 2H), 4.58 (m, 1H) (CH₂-triazol), 4.56 (m, 5H, H-1 Gal, CH_{2b}Ph-5), 4.54 (d, 1H, J_{gem} = 12.1 Hz, CH_{2a}Ph-6), 4.51 (d, 1H, J_{gem} = 12.1 Hz, CH_{2b}Ph-6), 4.46 (m, 4H, H-6a Glc), 4.14 (m, 4H, H-6a

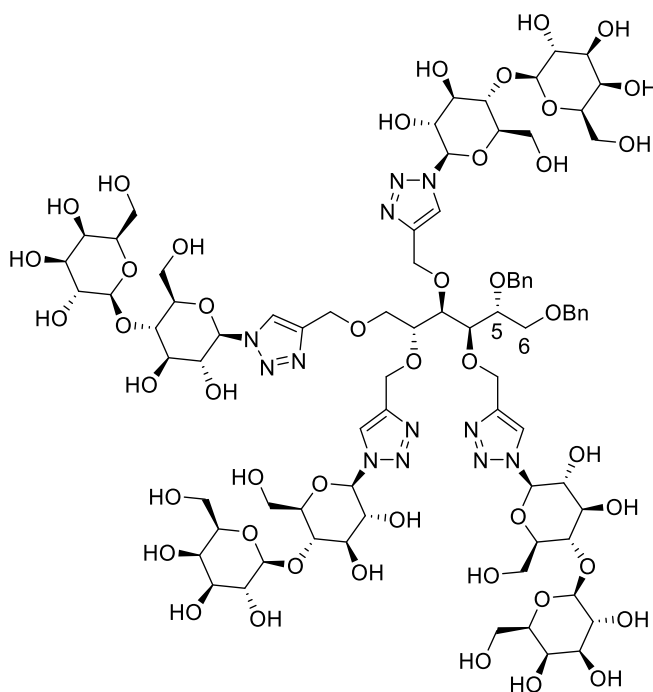
Gal), 4.13 (m, 4H, H-6b Glc), 4.10 (m, 4H, H-6b Gal), 4.03 (dd, 1H, $J_{4,3} = J_{4,5} = 9.6$ Hz, H-4 Glc), 3.97 (m, 3H, H-4 Glc), 3.95 (m, 2H, H-2, H-3 o H-4), 3.93 (m, 4H, H-5 Gal), 3.92 (m, 4H, H-5 Glc), 3.87 (m, 1H, H-6a), 3.83 (m, 1H, H-1a), 3.82 (m, 1H, H-5), 3.80 (m, 1H, H-2, H-3 o H-4), 3.71 (m, 1H, H-6b), 3.68 (m, 1H, H-1b), 2.16 (s, 12H), 2.06 (s, 12H), 2.06 (s, 12H), 2.05 (s, 12H), 2.04 (s, 6H), 2.04 (s, 6H), 1.97 (s, 12H), 1.82 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.80 (s, 6H) (OCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) δ 170.5, 170.5 (x3), 170.4, 170.4, 170.4, 170.3, 170.2, 170.2 (x3), 170.1 (x4), 169.7, 169.7, 169.7, 169.7, 169.2, 169.2 (x2), 169.2 (x3), 169.2, 169.2 (OCOCH₃), 146.0, 145.7, 145.6, 145.6 (C-4 triazol), 138.7, 138.4 (Ar-C_{ipso}), 128.5 (x2), 128.5 (x2), 127.9 (x2), 127.9 (x2) (Ar-C), 127.7, 127.6 (Ar-Cp), 122.4, 122.4, 122.2, 122.1 (C-5 triazol), 101.3 (x4) (C-1 Gal), 85.5, 85.4, 85.4 (x2) (C-1 Glc), 79.3, 79.1, 79.1 (C-2, C-3 o C-4), 78.7 (C-5), 75.9 (x2), 75.9, 75.8 (C-5 Glc), 75.8 (x2), 75.8 (x2) (C-4 Glc), 73.4 (CH₂Ph-6), 73.0, 73.0 (x2), 72.9 (C-3 Glc), 71.8 (CH₂Ph-5), 71.1 (x4) (C-3 Gal), 70.9, 70.9 (x2), 70.8 (C-5 Gal), 70.6, 70.5 (x3) (C-2 Glc), 69.2 (x4) (C-2 Gal), 69.0 (x2) (C-6, C-1), 66.7 (x4) (C-4 Gal), 65.8, 65.6, 64.5, 63.4 (CH₂-triazol), 62.1, 62.0, 62.0 (x2) (C-6 Glc), 60.9 (x2), 60.9 (x2) (C-6 Gal), 20.9, 20.9 (x2), 20.9, 20.9 (x4), 20.8 (x8), 20.7 (x4), 20.6 (x4), 20.4, 20.4, 20.3, 20.3 (OCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₁₃₆H₁₇₅N₁₂O₇₄ ([M+H]⁺): 3160.0300, observado: 3160.0376.



3,4,5,6-Tetraquis-*O*-[1-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3,6-tri-*O*-acetil- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (78).

A una solución del compuesto **77** (0.18 g, 0.058 mmol) en una mezcla 7:3 MeOH-AcOEt (10 mL), se agregaron 10% Pd/C (0.13 g) y AcOH catalítico (1.0 mL). La suspensión se hidrogenó a 1 atm y t.a. por 6 días. Después de este tiempo el catalizador se filtró sobre Celita® y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en columna (20:1 CH₂Cl₂-Isopropanol) para dar el compuesto **78** como una espuma blanca (44 mg, 25%). $[\alpha]_D^{20}$ -14 (*c* 0.3, CHCl₃). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 8.27 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.20 (s, 1H) (H-triazol), 6.10 (d, 1H, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, H-1 Glc), 6.08 (m, 3H, H-1 Glc), 5.61 (m, 4H, H-2 Glc), 5.46 (m, 4H, H-3 Glc), 5.38 (d, 4H, $J_{H,H} = 3.4$ Hz, H-4 Gal), 5.15 (m, 4H, H-3 Gal), 5.06 (m, 4H, H-2 Gal), 4.82 (m, 1H, CH₂-triazol), 4.80 (m, 4H, H-1 Gal), 4.76 (m, 3H), 4.75 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.64 (m, 1H) (CH₂-triazol), 4.56 (d, 2H, $J_{6a,6b} = 11.2$ Hz, H-6a Glc), 4.55 (d, 2H, $J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, H-6a Glc), 4.17 (m, 4H, H-5 Gal), 4.16 (m, 12H, H-6b Glc, H-6 Gal), 4.14 (m, 4H, H-5 Glc), 4.12 (m, 4H, H-4 Glc), 4.02 (d, 1H, $J_{H,H} = 6.4$ Hz, H-4 o H-5), 3.90 (dd, 1H, $J_{6a,6b} = 10.8$, $J_{6a,5} = 1.7$ Hz, H-6a), 3.82 (m, 1H, H-4 o H-5), 3.78 (m, 2H, H-2, H-3), 3.77 (m, 1H, H-1a), 3.69 (dd, 1H, $J_{6b,6a} = 10.8$ Hz, $J_{6b,5} = 4.3$ Hz, H-6b), 3.63 (dd, 1H, $J_{1b,1a} = 10.1$ Hz, $J_{1b,2} = 3.2$ Hz, H-1b), 2.15 (s, 12H), 2.09 (s, 3H), 2.08 (s, 9H), 2.07 (s, 12H), 2.06 (s, 3H), 2.05 (s, 9H), 2.05 (s,

6H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.94 (s, 12H), 1.81 (s, 6H), 1.81 (s, 3H), 1.81 (s, 3H) (OCOCH₃). RMN ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD) δ 172.3 (x3), 172.3, 172.1 (x4), 171.9 (x4), 171.6 (x2), 171.6 (x2), 171.5 (x4), 171.2 (x4), 170.7, 170.6 (x2), 170.6 (OCOCH₃), 147.0, 146.9, 146.9, 146.6 (C-4 triazol), 124.6, 124.5, 124.5, 124.4 (C-5 triazol), 102.1 (x4) (C-1 Gal), 86.4, 86.4, 86.4, 86.4 (C-1 Glc), 80.7 (C-3), 79.7, 79.6 (C-4 o C-5), 77.1 (x3), 77.0 (C-4 Glc o C-5 Glc), 77.0, 77.0, 77.0 (x2) (C-4 Glc o C-5 Glc), 74.4 (x2), 74.3, 74.3 (C-3 Glc), 72.5 (x4) (C-3 Gal), 72.4 (C-2), 72.1 (x2), 72.0, 72.0 (C-2 Glc), 71.8 (x4) (C-5 Gal), 70.7 (x4) (C-2 Gal), 69.9 (C-6), 68.6 (x4) (C-4 Gal), 66.4, 66.1, 64.9 (CH₂-triazol), 64.4 (C-1), 63.6 (x4) (C-6 Glc), 63.5 (CH₂-triazol), 62.3 (x4) (C-6 Gal), 21.2, 21.2 (x3), 20.8 (x3), 20.8, 20.8 (x4), 20.7, 20.7 (x3), 20.5 (x4), 20.5 (x4), 20.3 (x2), 20.3, 20.3 (OCOCH₃). HRESI-MS calculado para C₁₂₂H₁₆₂N₁₂NaO₇₄ ([M+Na]⁺): 3001.9180, observado: 3001.9148.



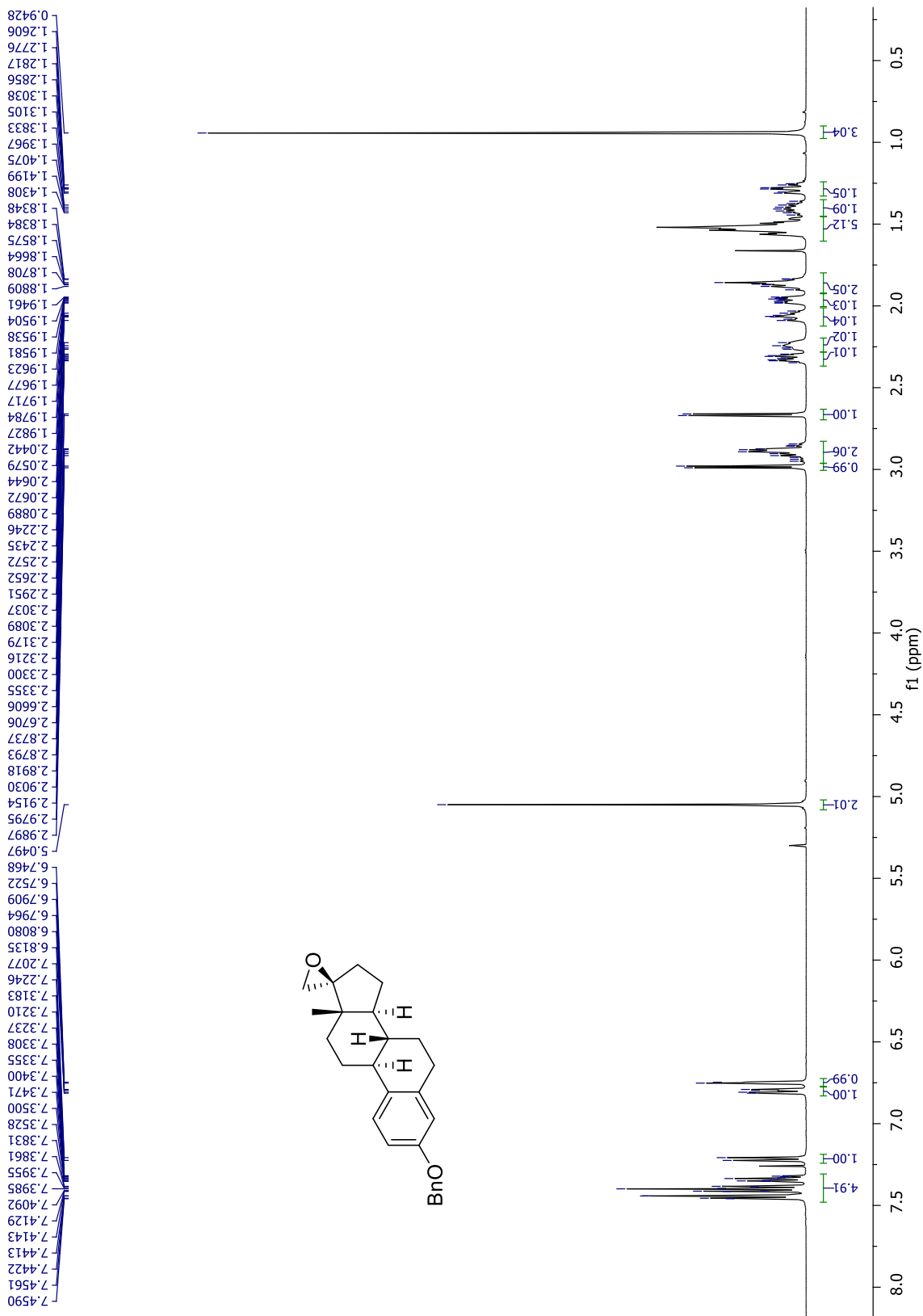
5,6-Di-O-bencil-1,2,3,4-tetra-O-[1-(β -D-galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopiranosil)-1,2,3-triazol-4-il]metil-D-manitol (79). A una solución del compuesto **77** (0.16 g, 0.05 mmol) en MeOH anhidro (5 mL), se añadió una solución recién preparada de NaOMe 1M en MeOH (1.0 mL). La mezcla se agitó a t.a. por 4 h, después de este tiempo se agregó Amberlita IR-120 H⁺ y se agitó hasta alcanzar un pH = 7. La resina se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se purificó por cromatografía en fase inversa (H₂O \rightarrow 1:1 MeCN-H₂O) para dar el derivado **79**

como un sólido blanco (91 mg, 93%). $[\alpha]_D^{20} +11$ (c 1.1, DMSO). RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.30 (s, 1H), 8.29 (s, 2H), 8.28 (s, 1H) (H-triazol), 7.39-7.26 (m, 10H, Ar-H), 5.63 (m, 4H, H-1 Glc), 5.56 (m, 4H, OH), 5.12 (m, 4H, OH), 4.88 (m, 4H, OH), 4.85 (m, 1H, CH₂-triazol), 4.80 (m, 4H, OH), 4.73-4.61 (m, 6H, CH₂-triazol), 4.73 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.9$ Hz, CH_{2a}Ph-5), 4.67 (m, 8H, OH), 4.63 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, CH_{2a}Ph-6), 4.60 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.9$ Hz, CH_{2b}Ph-5), 4.57 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 12.1$ Hz, CH_{2b}Ph-6), 4.53 (m, 4H, OH), 4.50 (d, 1H, $J_{\text{gem}} = 11.5$ Hz, CH₂-triazol), 4.25 (m, 4H, H-1 Gal), 4.10 (d, 1H, $J_{\text{H,H}} = 9.3$ Hz, H-6a), 4.0 (d, 1H, $J_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, H-1a), 3.95 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.87 (m, 1H) (H-2, H-3 o H-4), 3.86 (m, 4H, H-2 Glc), 3.84 (m, 1H, H-5), 3.80 (m, 1H, H-6b), 3.76 (m, 1H, H-1b), 3.75 (m, 4H, H-6a Glc), 3.65 (m, 4H, H-5 Glc), 3.63 (m, 4H, H-4 Gal), 3.60 (m, 4H, H-6b Glc), 3.56 (m, 4H, H-3 Glc), 3.56 (m, 4H, H-6a Gal), 3.51 (m, 4H, H-6b Gal), 3.49 (m, 4H, H-5 Gal), 3.48 (m, 4H, H-4 Glc), 3.35 (m, 4H, H-2 Gal), 3.33 (m, 4H, H-3 Gal). RMN ^{13}C (125.7 MHz, DMSO- d_6) δ 144.0, 144.0, 144.0, 143.9 (C-4 triazol), 138.6, 138.5 (Ar-Cipso), 128.4 (x2), 128.3 (x2), 128.3, 127.6 (x2), 127.5, 127.4 (x2) (Ar-C), 123.3, 123.3, 123.1 (x2) (C-5 triazol), 103.8 (x4) (C-1 Gal), 87.0 (x4) (C-1 Glc), 79.8 (x2), 79.8 (x2) (C-4 Glc), 77.8, 77.8 (x3) (C-5 Glc), 77.6 (C-5), 77.2, 77.2, 77.1 (C-2, C-3 o C-4), 75.6 (x4) (C-5 Gal), 75.2, 75.2 (x3) (C-3 Glc), 73.3 (x4) (C-3 Gal), 72.3 (CH₂Ph-6), 71.8 (x2), 71.8 (x2) (C-2 Glc), 70.6 (x4) (C-2 Gal), 70.4 (CH₂Ph-5), 68.2 (x4) (C-4 Gal), 67.8 (x2) (C-6, C-1), 65.0, 65.0, 63.9, 62.1 (CH₂-triazol), 60.5 (x4) (C-6 Gal), 60.0 (x2), 60.0, 60.0 (C-6 Glc). HRESI-MS calculado para C₈₀H₁₁₈N₁₂NaO₄₆ ([M+Na]⁺): 2005.7161, observado: 2005.7125.

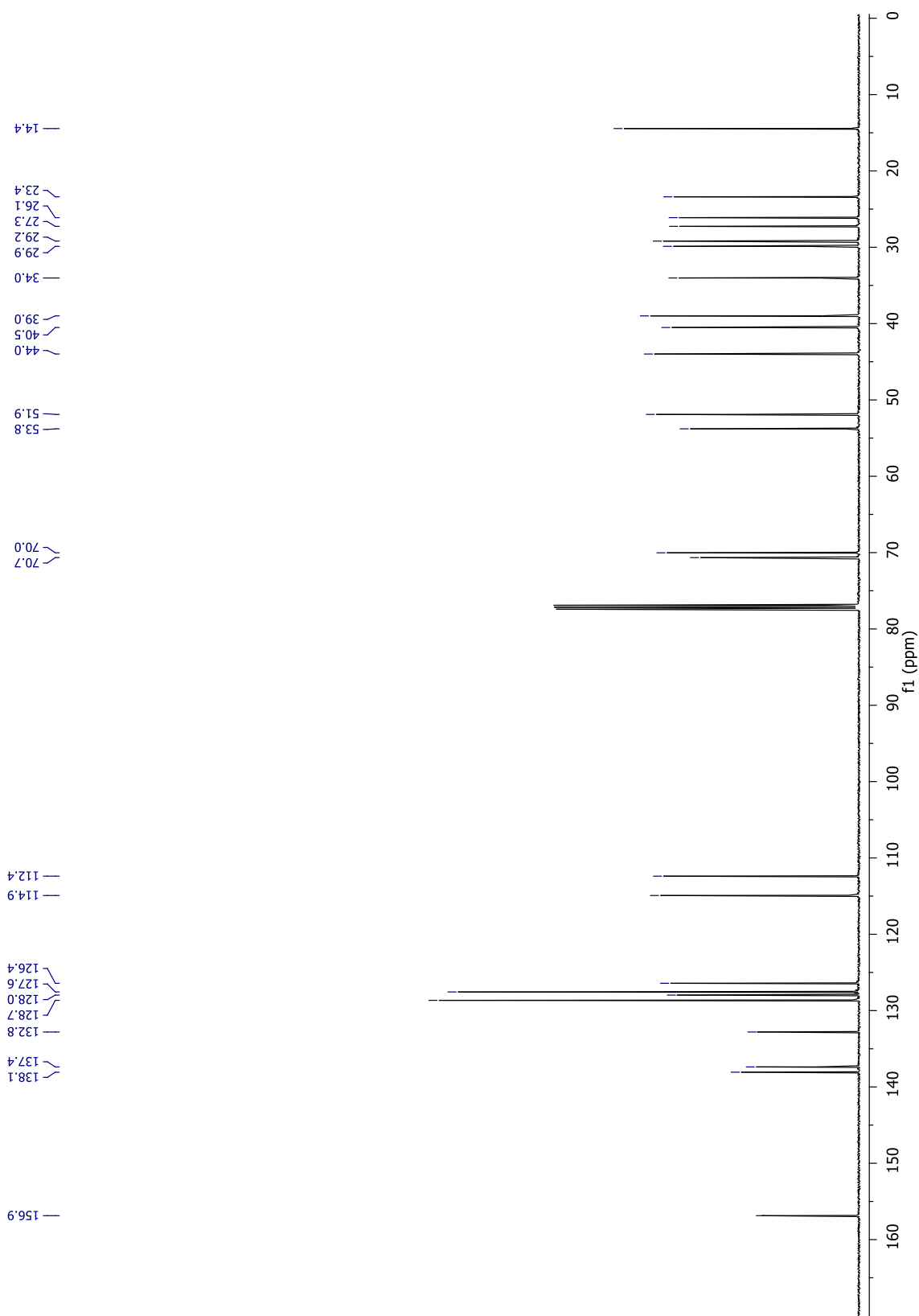
2.7 Bibliografía

- ¹. Liu, F-T.; Rabinovich, G. A. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 29–41.
- ². Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M. *Plant Physiol.* **1995**, *109*, 347–352.
- ³. Sharon, N.; Lis, H. *Lectins, 2da ed.* Springer, Dordrecht, **2007**.
- ⁴. Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.
- ⁵. Varki, A.; Etzler, M. E.; Cummings, R. D.; Esko, J. D. Discovery and classification of glycan-binding proteins. En: Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Freeze, H. H.; Stanley, P.; Bertozzi, C. R.; Hart, G. W.; Etzler, M. E. (eds.), *Essentials of Glycobiology, 2 ed.* Cap. 26, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2009**.
- ⁶. Mukherjee, R.; Kim, S. W.; Park, T.; Choi, M. S.; Yun, J. W. *Int. J. Obes.* **2015**, *39*, 1349–1358.
- ⁷. Zizzari, I. G.; Martufi, P.; Battisti, F.; Rahimi, H.; Caponnetto, S.; Bellati, F.; Nuti, M.; Rughetti, A.; Napoletano, C. *PLoS ONE*, *10*: e0132617.
- ⁸. Napoletano, C.; Zizzari, I. G.; Rughetti, A.; Rahimi, H.; Irimura, T.; Clausen, H.; Wandall, H. H.; Belleudi, F.; Bellati, F.; Pierelli, L.; Frati, L.; Nuti, M. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 936–945.
- ⁹. Denda-Nagai, K.; Aida, S.; Saba, K.; Suzuki, K.; Moriyama, S.; Oo-puthinan, S.; Tsuiji, M.; Morikawa, A.; Kumamoto, Y.; Sugiura, D.; Kudo, A.; Akimoto, Y.; Kawakami, H.; Bovin, N. V.; Irimura, T. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19193–19204.
- ¹⁰. André, S.; O’Sullivan, S.; Koller, C.; Murphy, P. V.; Gabius, H.-J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 4190–4203.
- ¹¹. Kiessling, L. L.; Gestwicki, J. E.; Strong, L. E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696–703.
- ¹². Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- ¹³. Leyden, R.; Velasco-Torrijos, T.; André, S.; Gouin, S.; Gabius, H.-J.; Murphy, P. V. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9010–9026.
- ¹⁴. Wang, G.-N.; André, S.; Gabius, H.-J.; Murphy, P. V. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6893–6907.
- ¹⁵. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- ¹⁶. Huisgen, R. *Proc. Chem. Soc.* **1961**, 357–396.
- ¹⁷. Dimroth, O.; Fester, G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, *43*, 2219–2223.
- ¹⁸. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- ¹⁹. Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- ²⁰. Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. *Science* **2013**, *340*, 457–460.

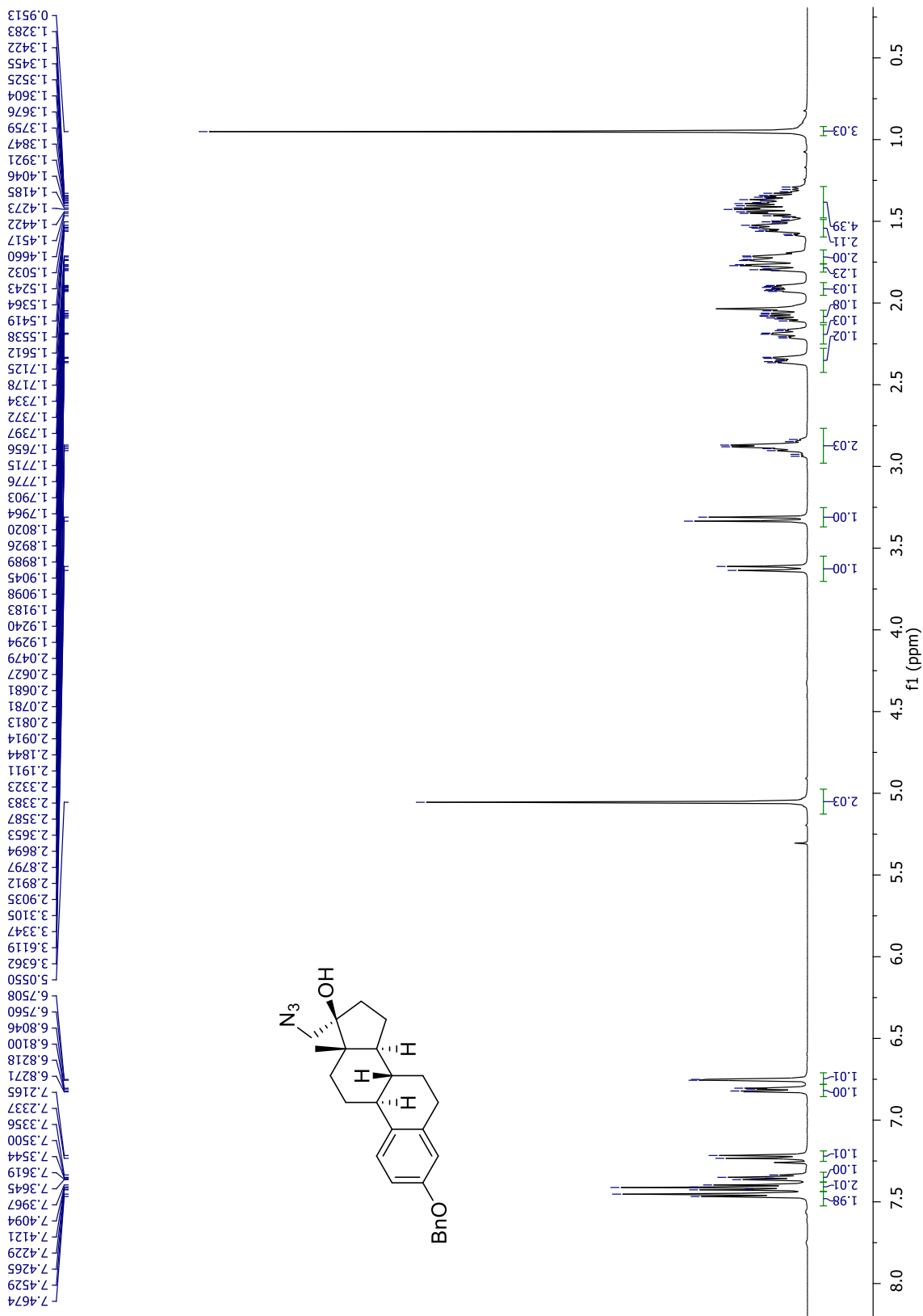
21. Jin, L.; Tolentino, D. R.; Melaimi, M.; Bertrand, G. *Sci. Adv.* **2015**; *1*:e1500304.
22. Cagnoni, A. J.; Varela, O.; Gouin, S. G.; Kovensky, J.; Uhrig, M. L. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3064–3077.
23. Yu, H.; Chokhawala, H.; Karpel, R.; Yu, H.; Wu, B.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Jia, Q.; Chen, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618–17619.
24. Knapp, S.; Myers, D. S. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2995–2999.
25. André, S.; O’Sullivan, S.; Koller, C.; Murphy, P. V.; Gabius, H.-J. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 4190–4203.
26. Tropper, F. D.; Andersson, F. O.; Braun, S.; Roy, R. *Synthesis* **1992**, *7*, 618–620.
27. Knapp, S.; Vocadlo, D.; Gao, Z.; Kirk, B.; Lou, J.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804–6805.
28. Matos, M.-C.; Murphy, P. V. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1803–1806.
29. Yadav, V. K.; Agrawal, D. *Chem. Commun.* **2007**, 5232–5234.
30. Chen, N.; Xie, J. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10716–10721.
31. Chandrasekhar, M.; Chandra, K. L.; Singh, V. K. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4039–4045.
32. Maxted, E. B.; Walker, A. G. *J. Chem. Soc.* **1948**, 1093–1097.
33. a) Oudar, J. *Catal. Rev.* **1980**, *22*, 171–195. b) Dunleavy, J. K. *Platinum Metals Rev.* **2006**, *50*, 110.
34. a) Belardi, B.; O’Donoghue, G. P.; Smith, A. W.; Groves, J. T.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 9549–9552. b) Gabius, H.-J. *Folia Biol. (Praha)* **2017**, *63*, 121–131. c) Xiao, Q.; Ludwig, A.-K.; Romanò, C.; Buzzacchera, I.; Sherman, S. E.; Vetro, M.; Vértesy, S.; Kaltner, H.; Reed, E. H.; Möller, M.; Wilson, C. J.; Hammer, D. A.; Oscarson, S.; Klein, M. L.; Gabius, H.-J.; Percec, V. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E2509–E2518.
35. Kaltner, H.; Manning, J. C.; García Caballero, G.; Di Salvo, C.; Gabba, A.; Romero-Hernández, L. L.; Knospe, C.; Wu, D.; Daly, H. C.; O’Shea, D. F.; Gabius, H.-J.; Murphy, P. V. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 28716–28735.
36. Dowlut, M.; Hall, D. G.; Hindsgaul, O. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9809–9813.
37. Galonić, D. P.; van der Donk, W. A.; Gin, D. Y. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 5997–6006.

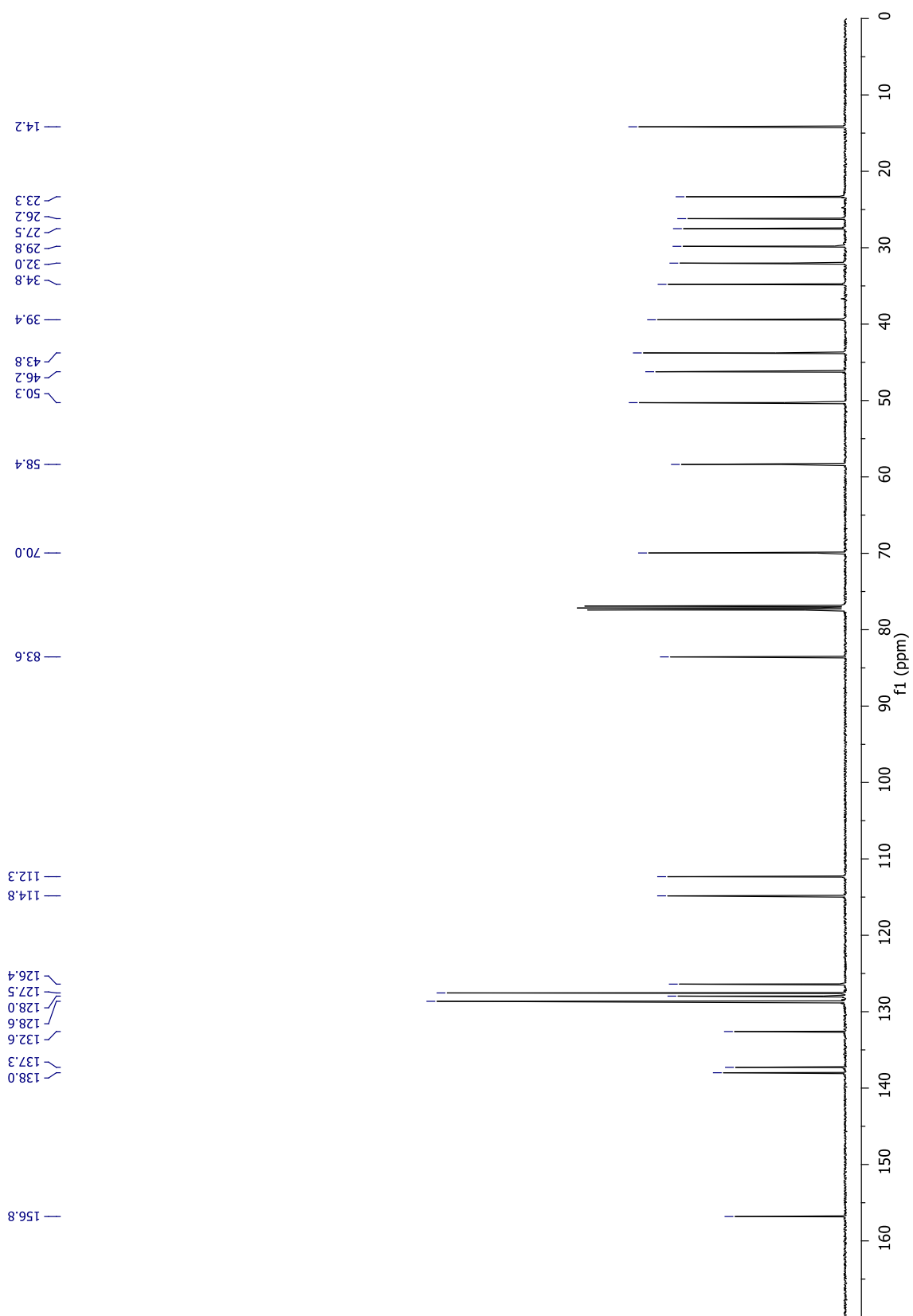


Espectro 1. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 13.

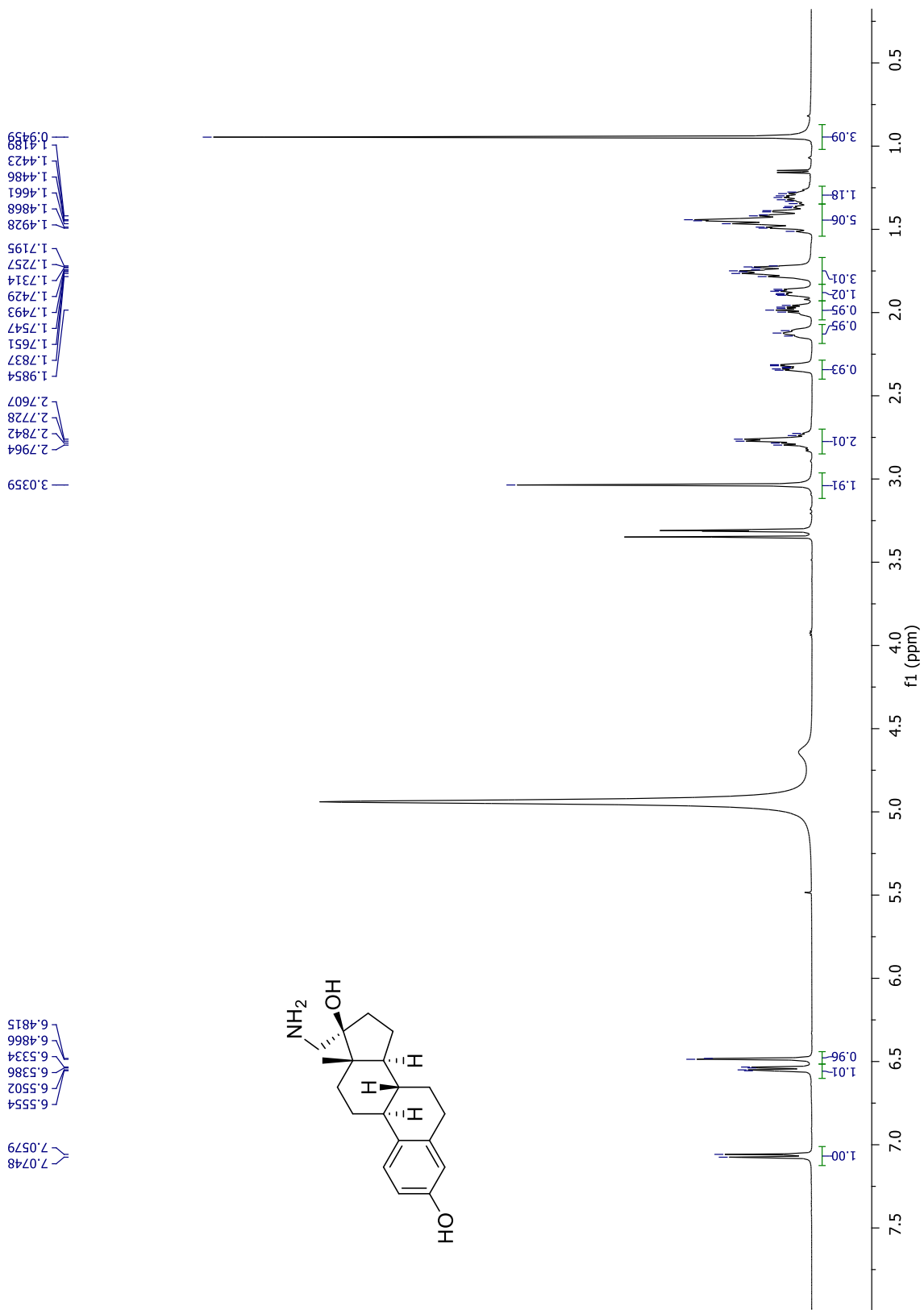


Espectro 2. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **13**.

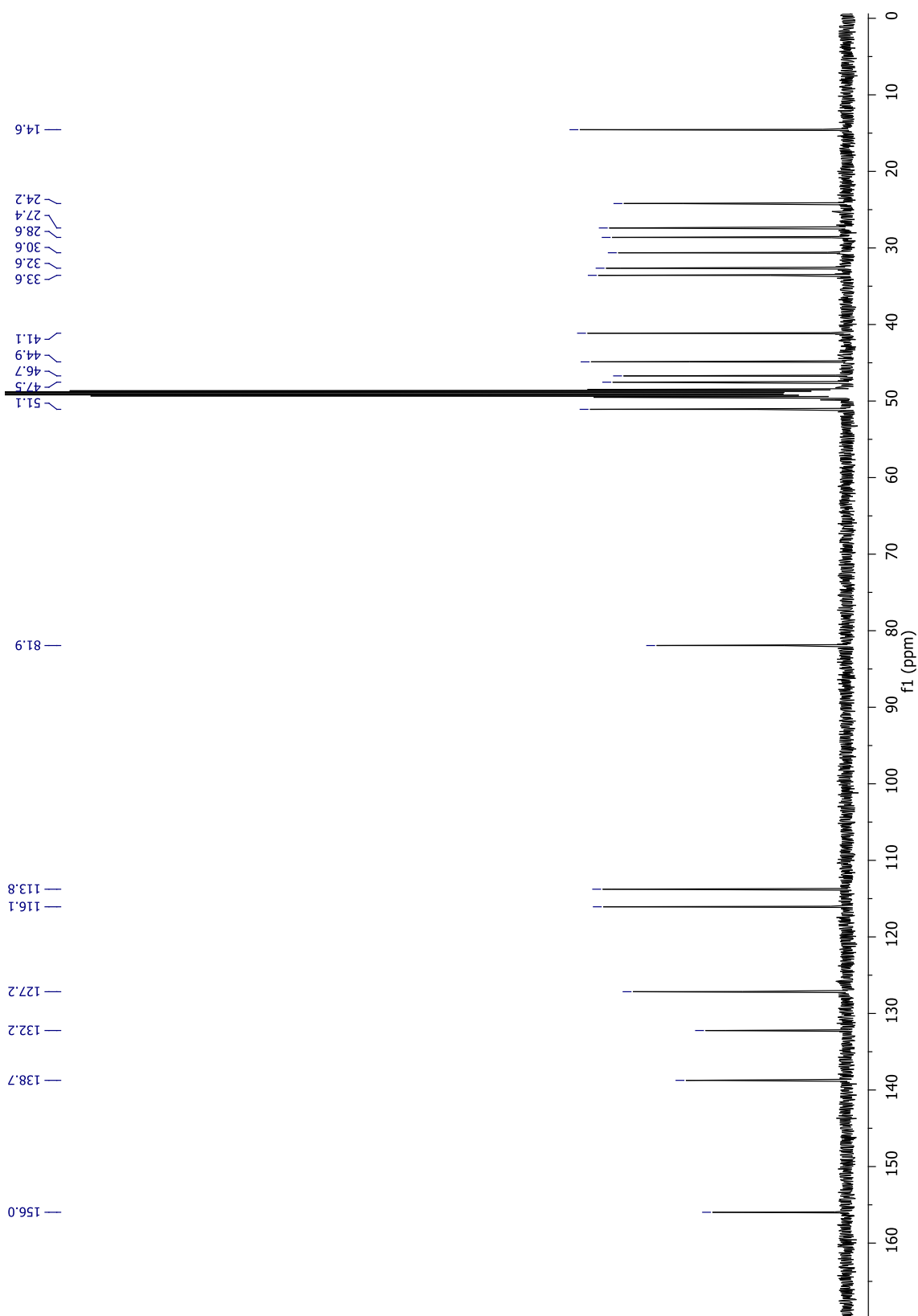




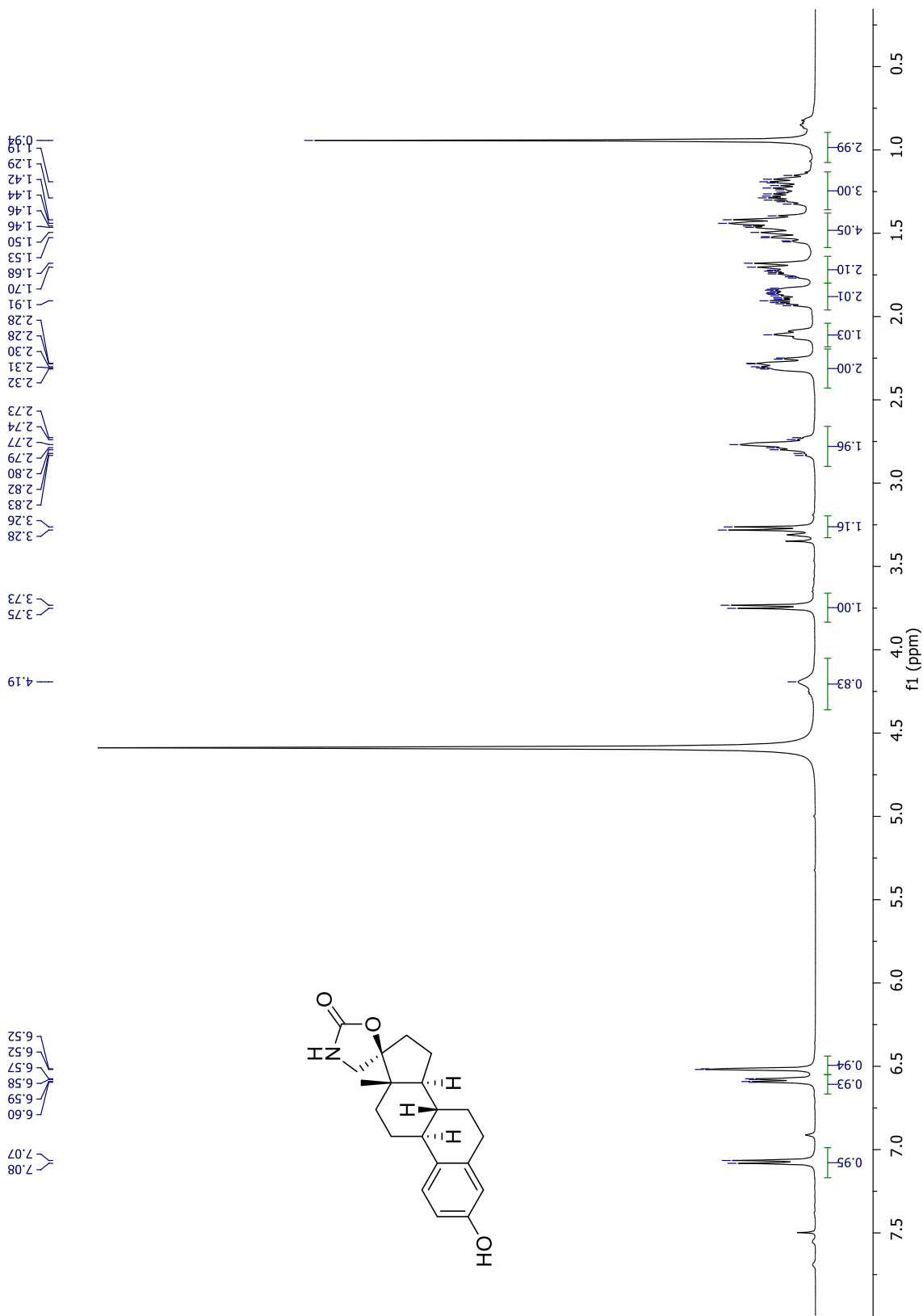
Espectro 4. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **14**.

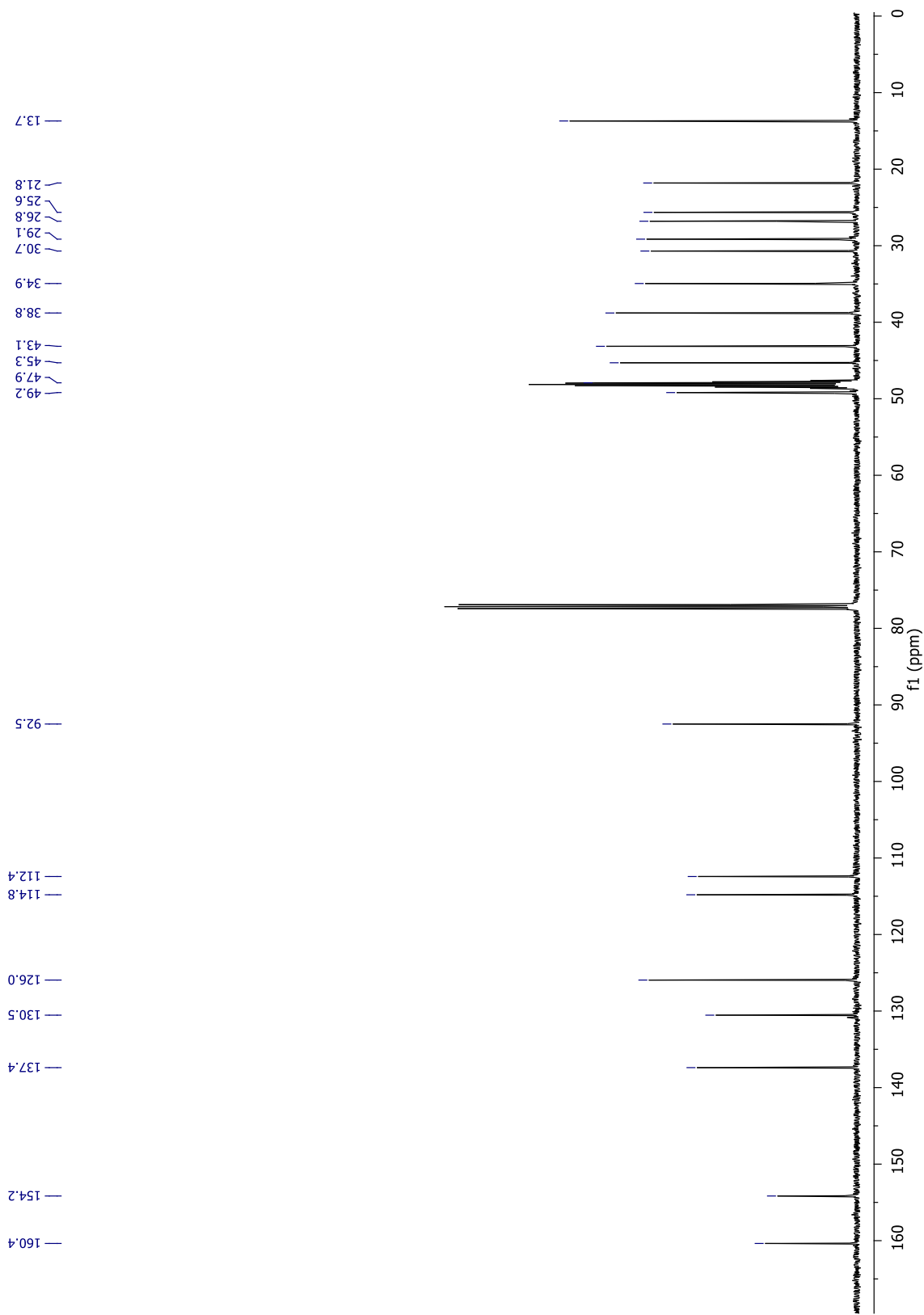


Espectro 5. RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) del derivado 15.

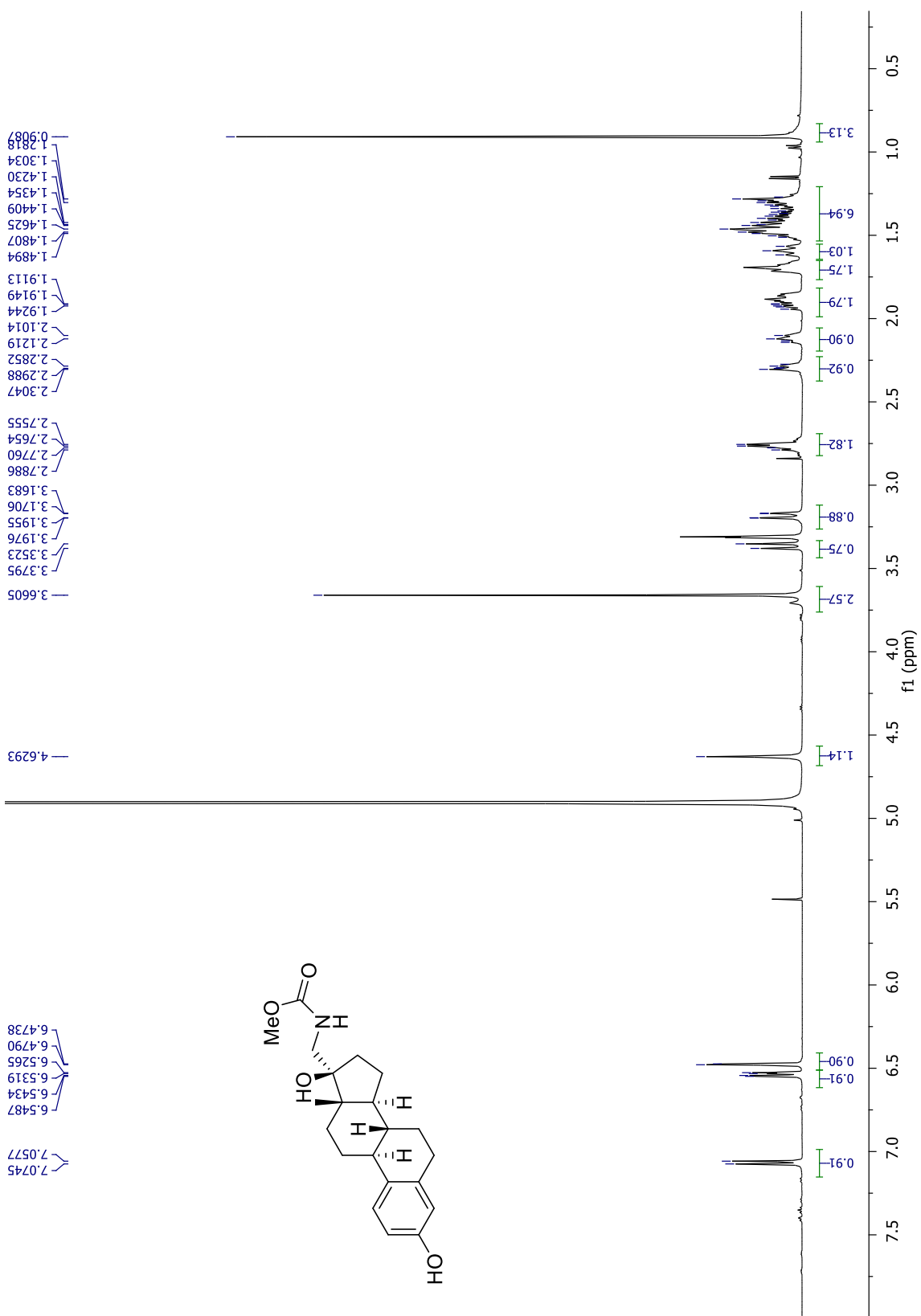


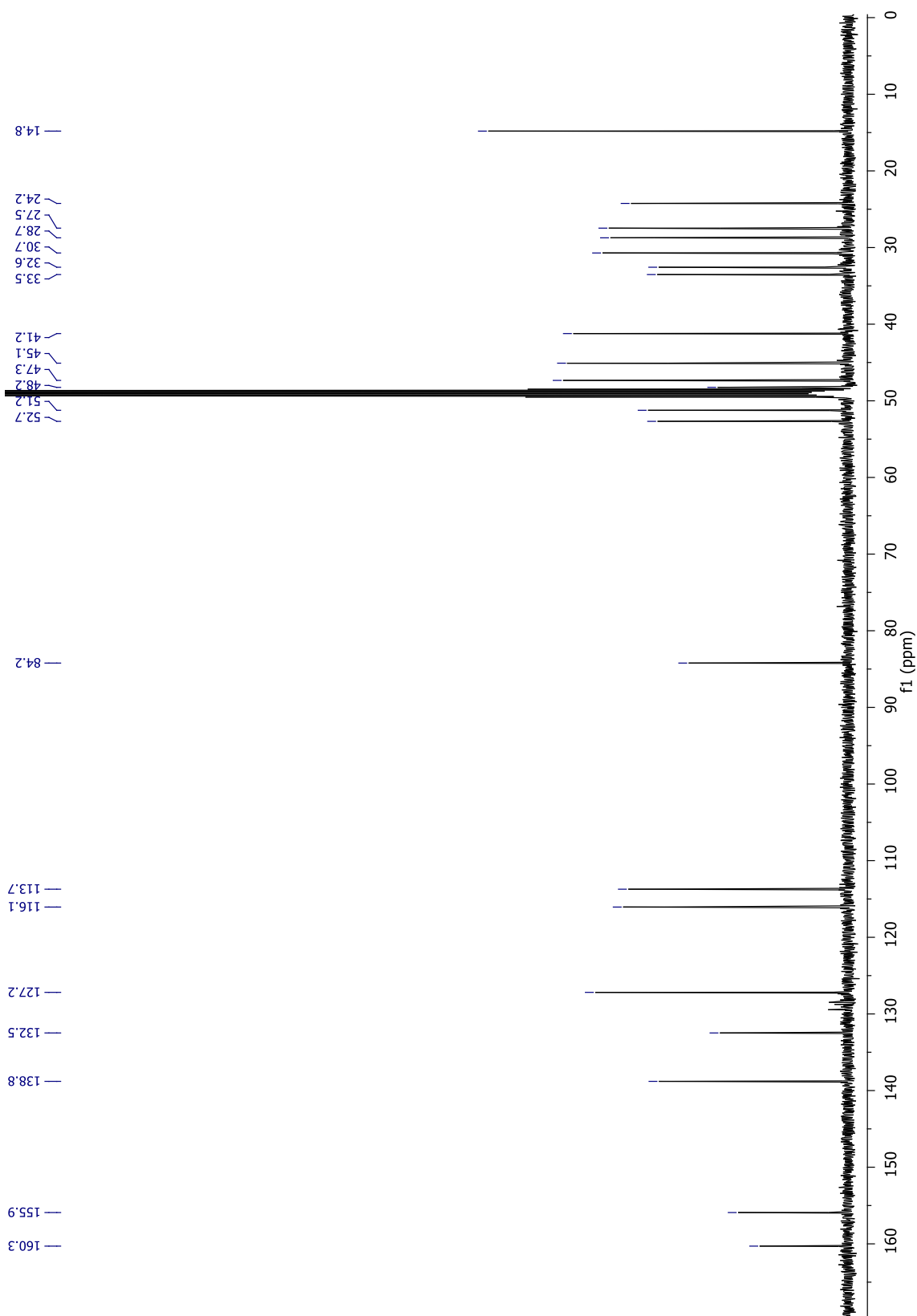
Espectro 6. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado 15.



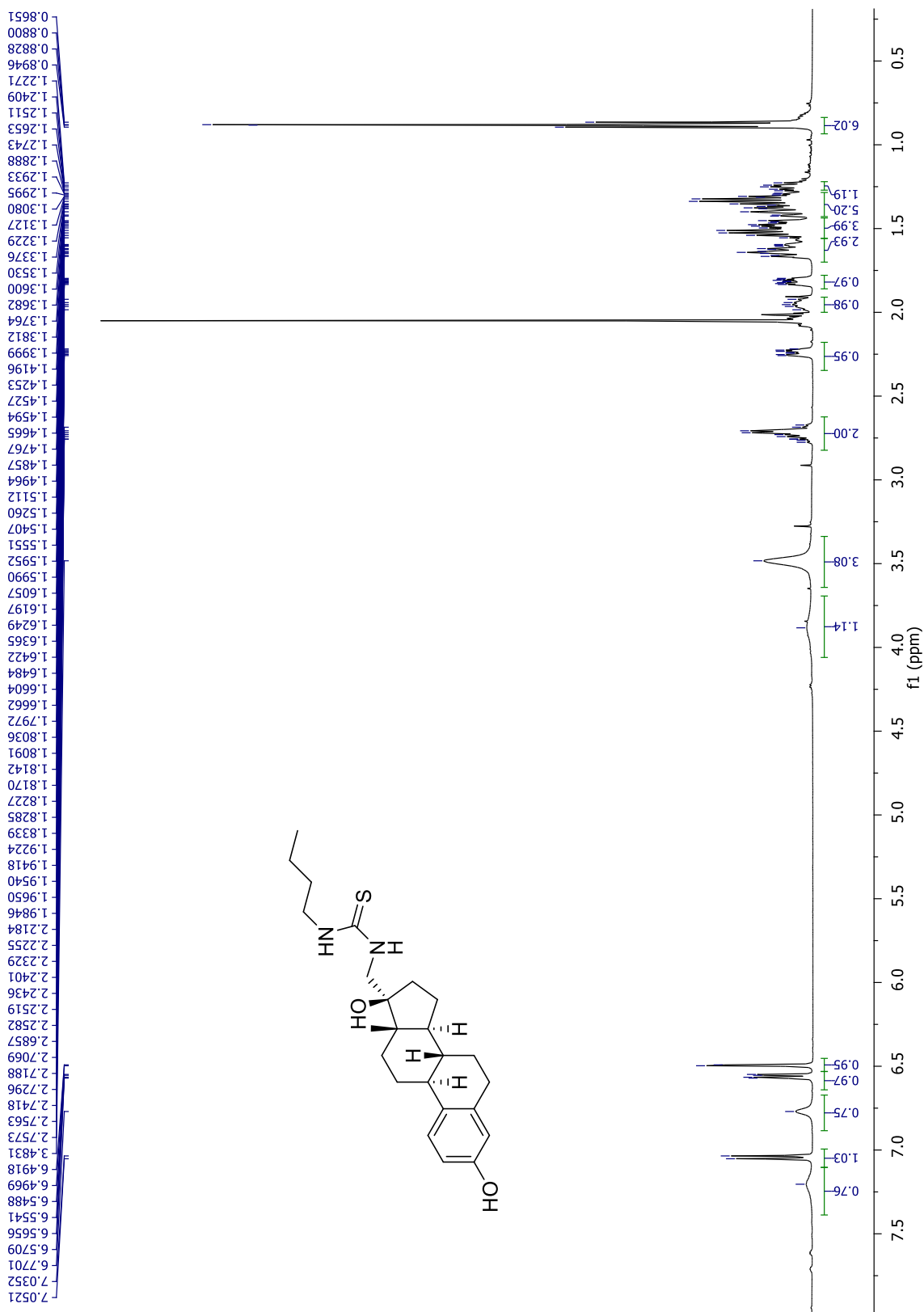


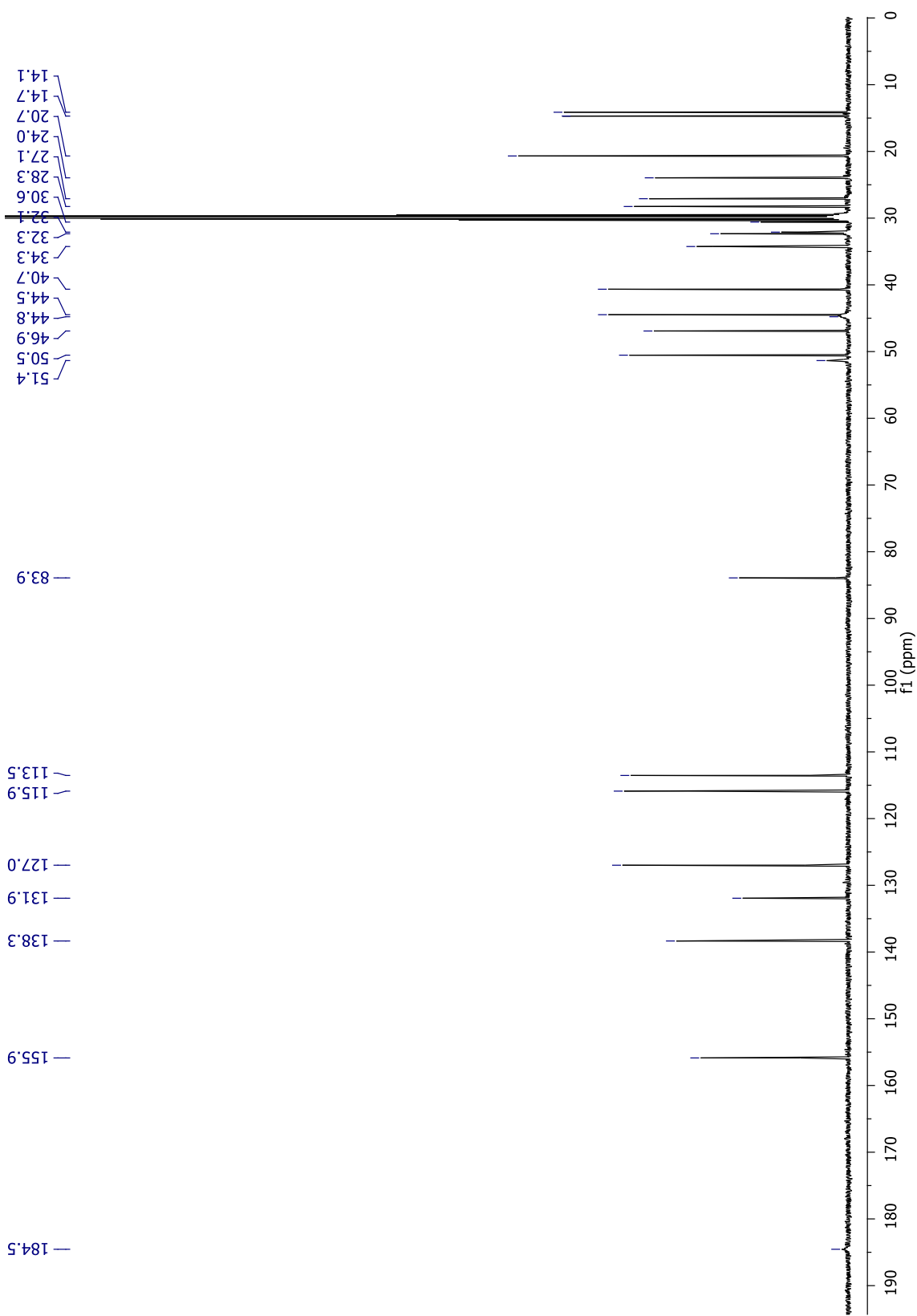
Espectro 8. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$) del derivado **17**.



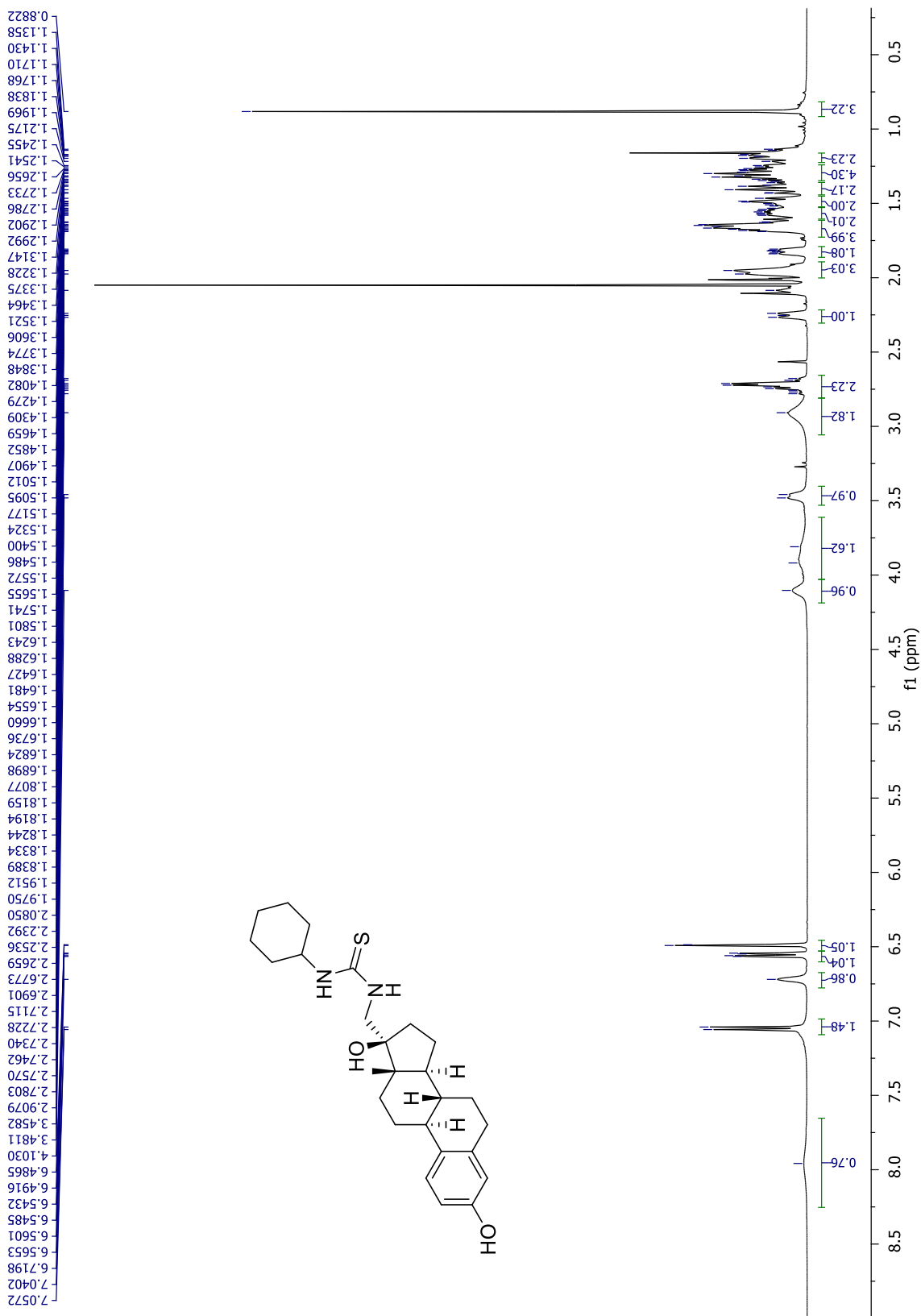


Espectro 10. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado **18**.

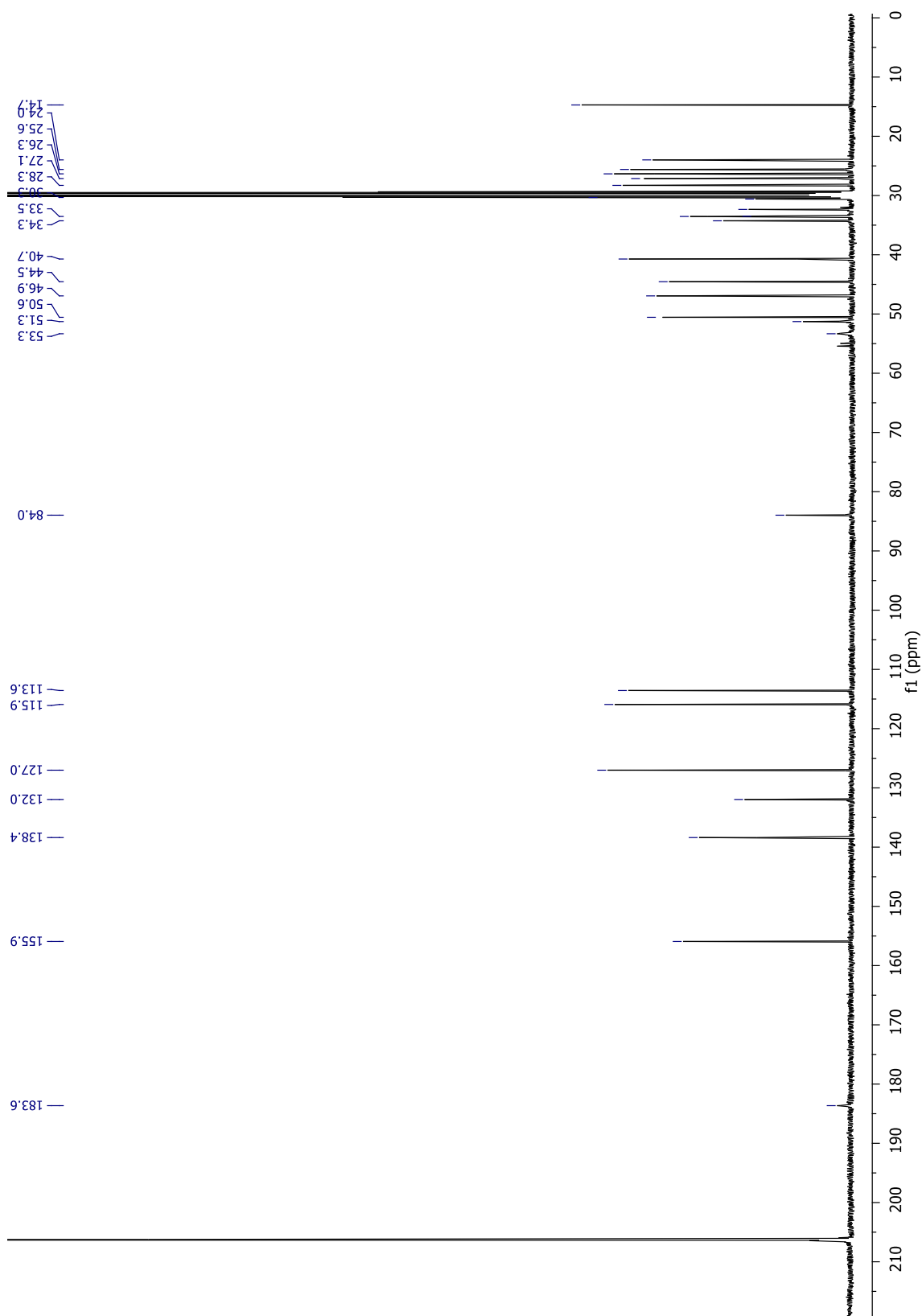




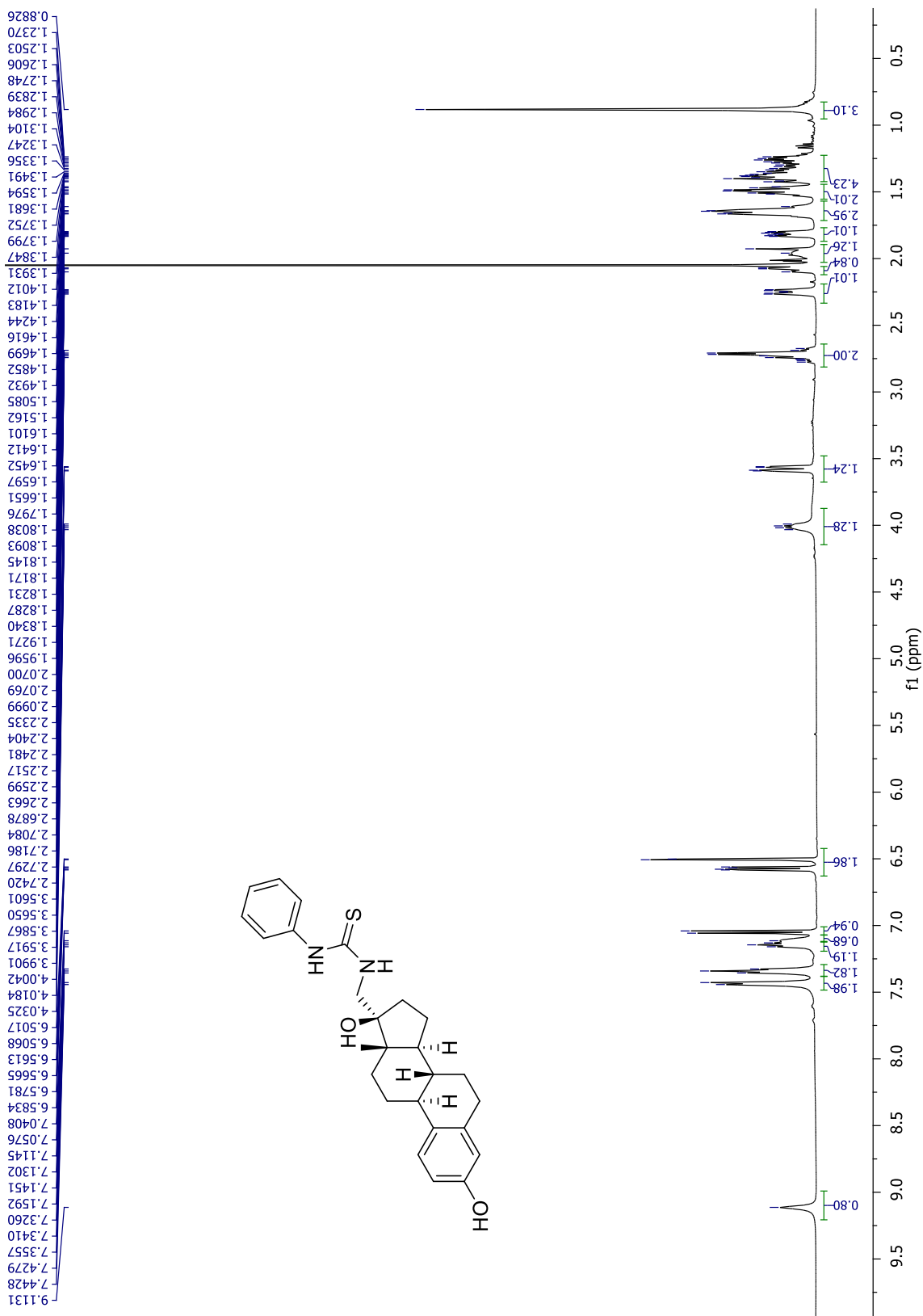
Espectro 12. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, acetona- d_6) del derivado 19a.



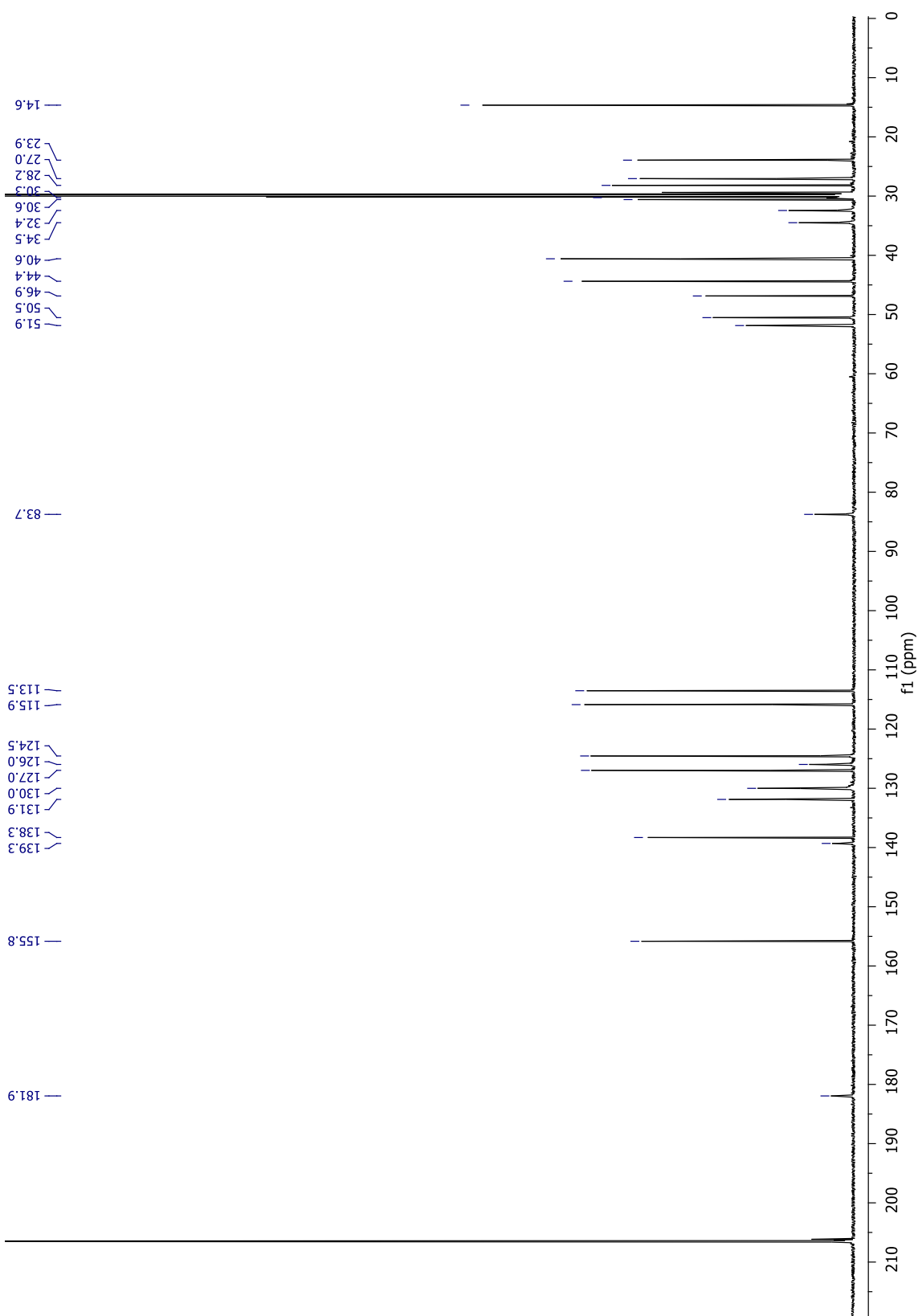
Espectro 13. RMN de ^1H (500 MHz, acetona- d_6) del derivado 19b.



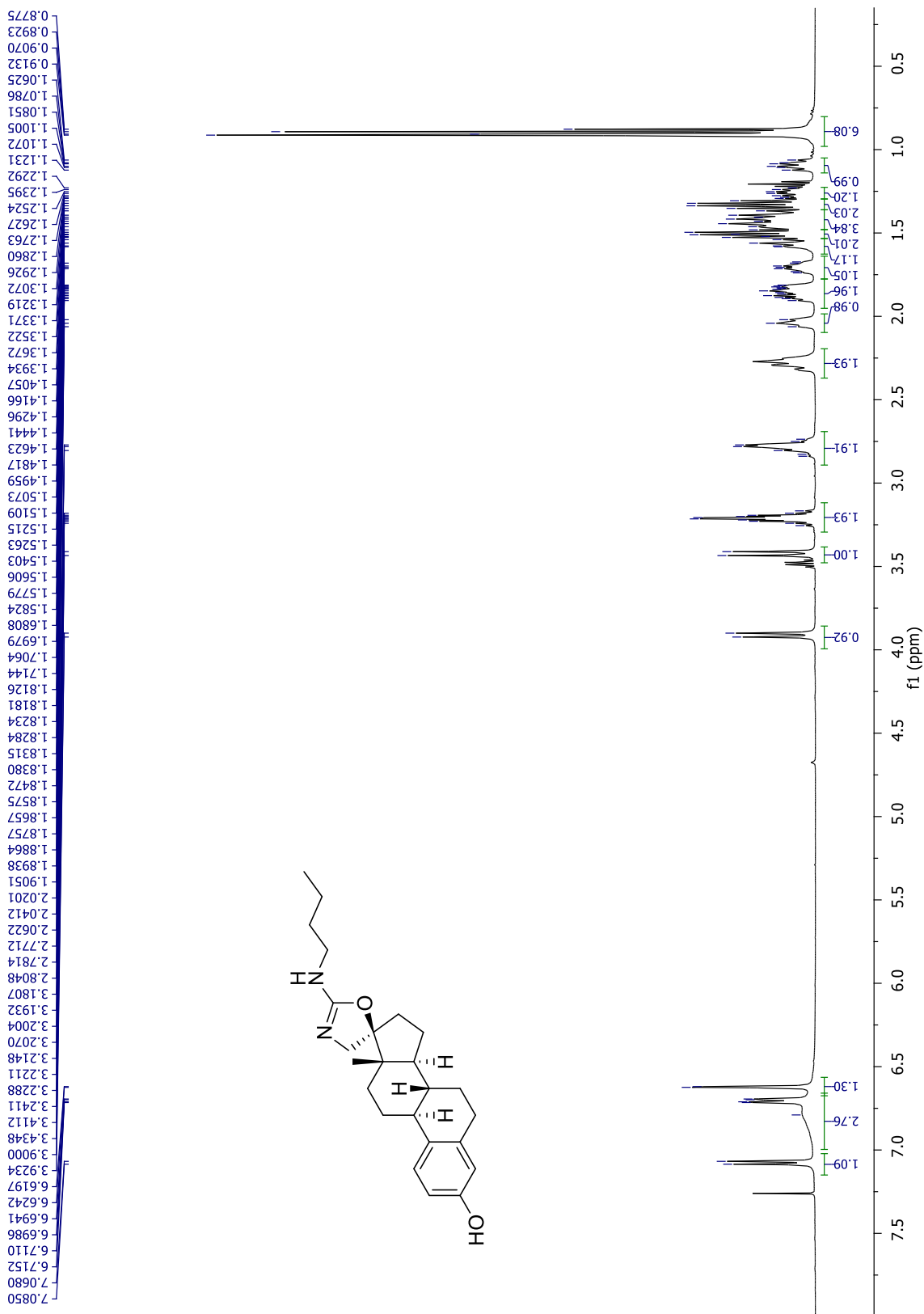
Espectro 14. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, acetona- d_6) del derivado **19b**.

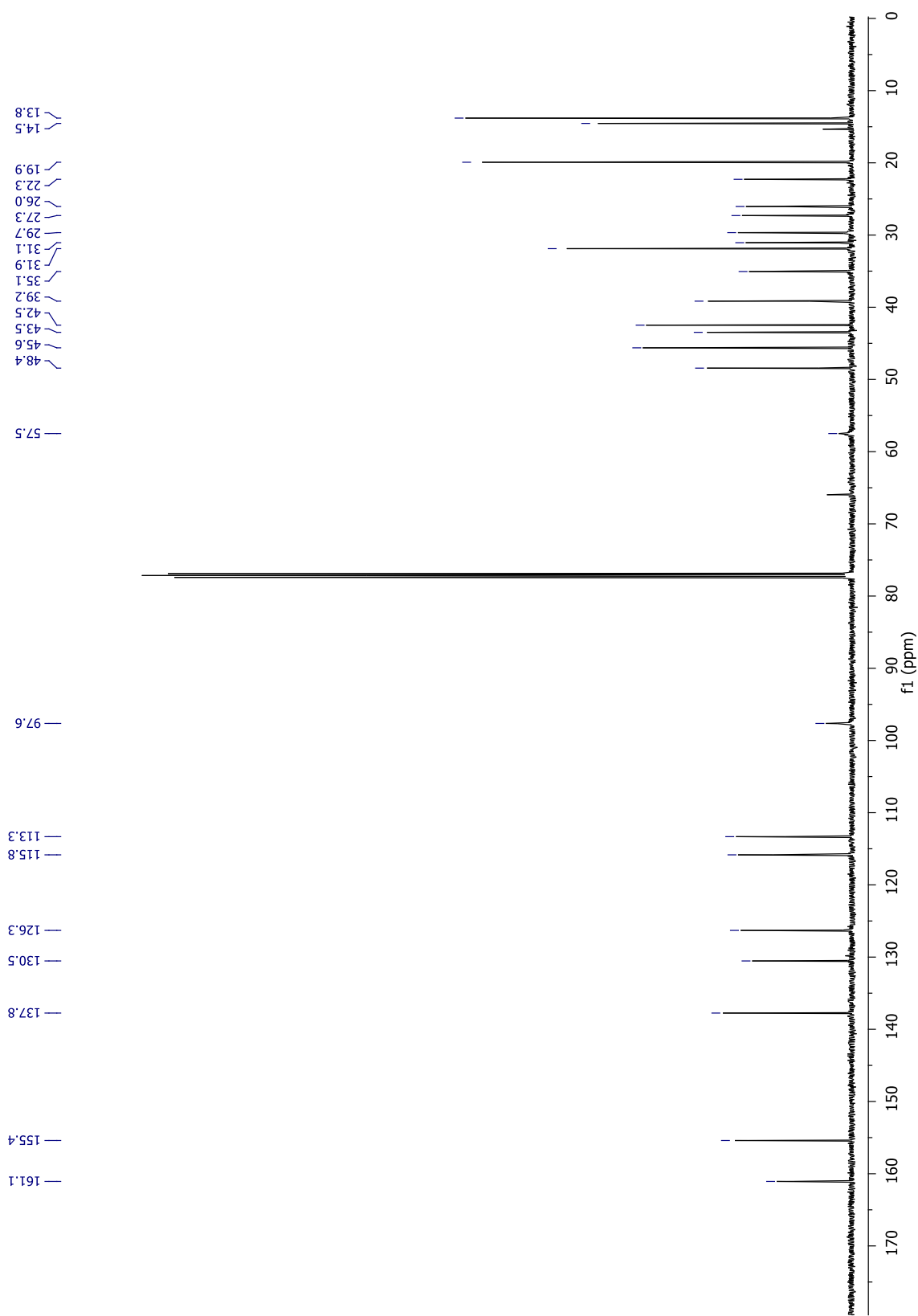


Espectro 15. RMN de ^1H (500 MHz, acetona- d_6) del derivado 19c.

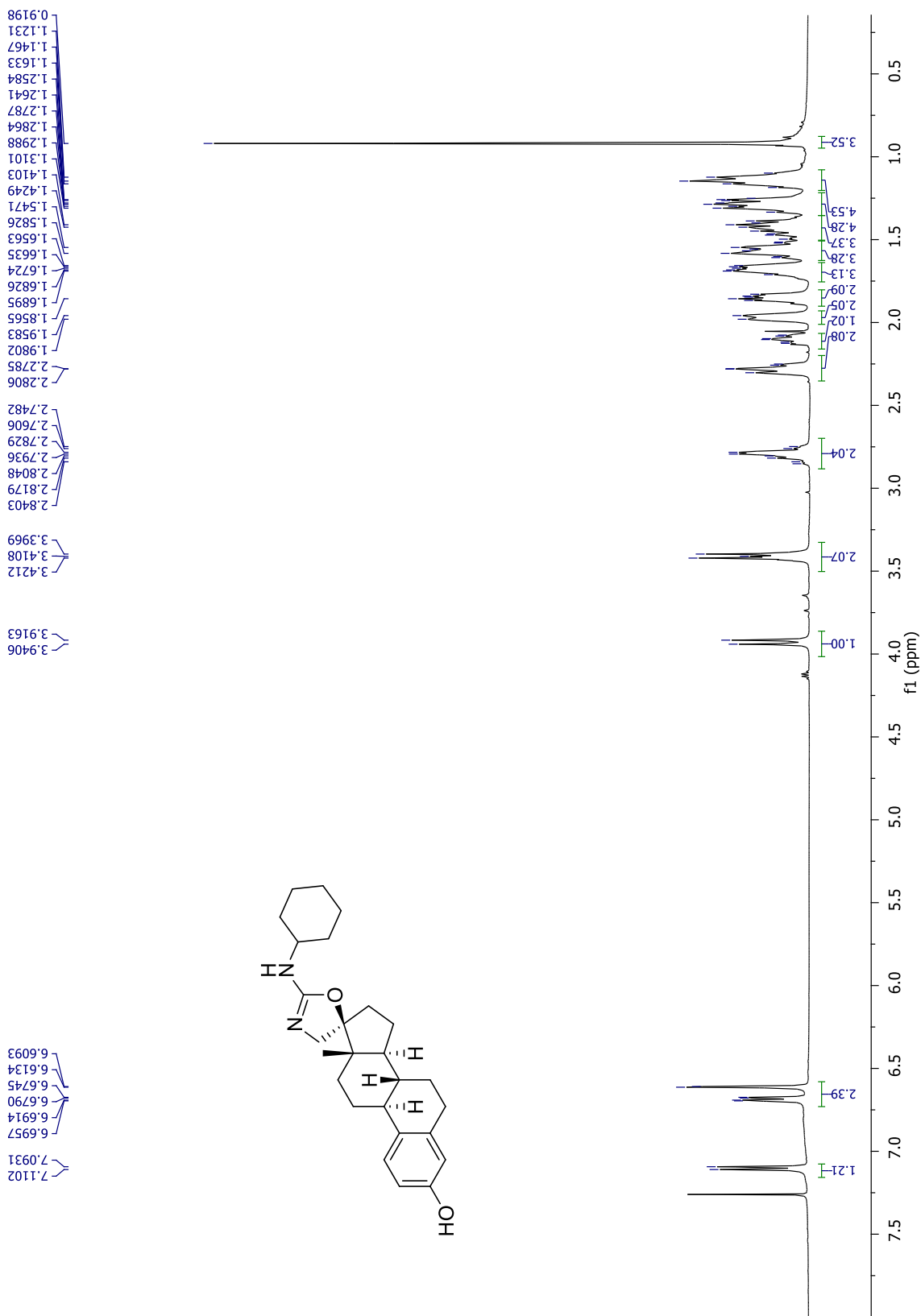


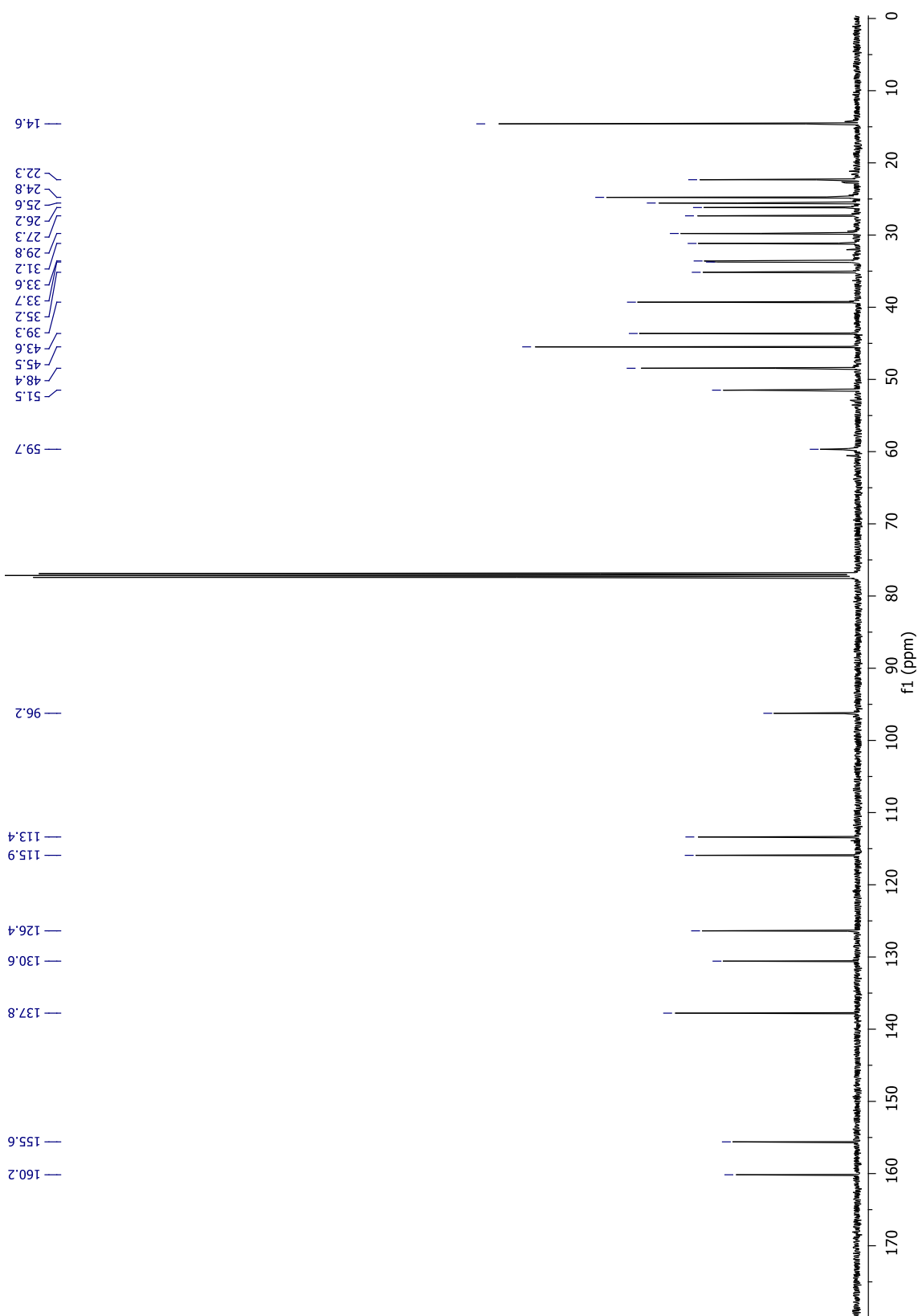
Espectro 16. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, acetona- d_6) del derivado **19c**.



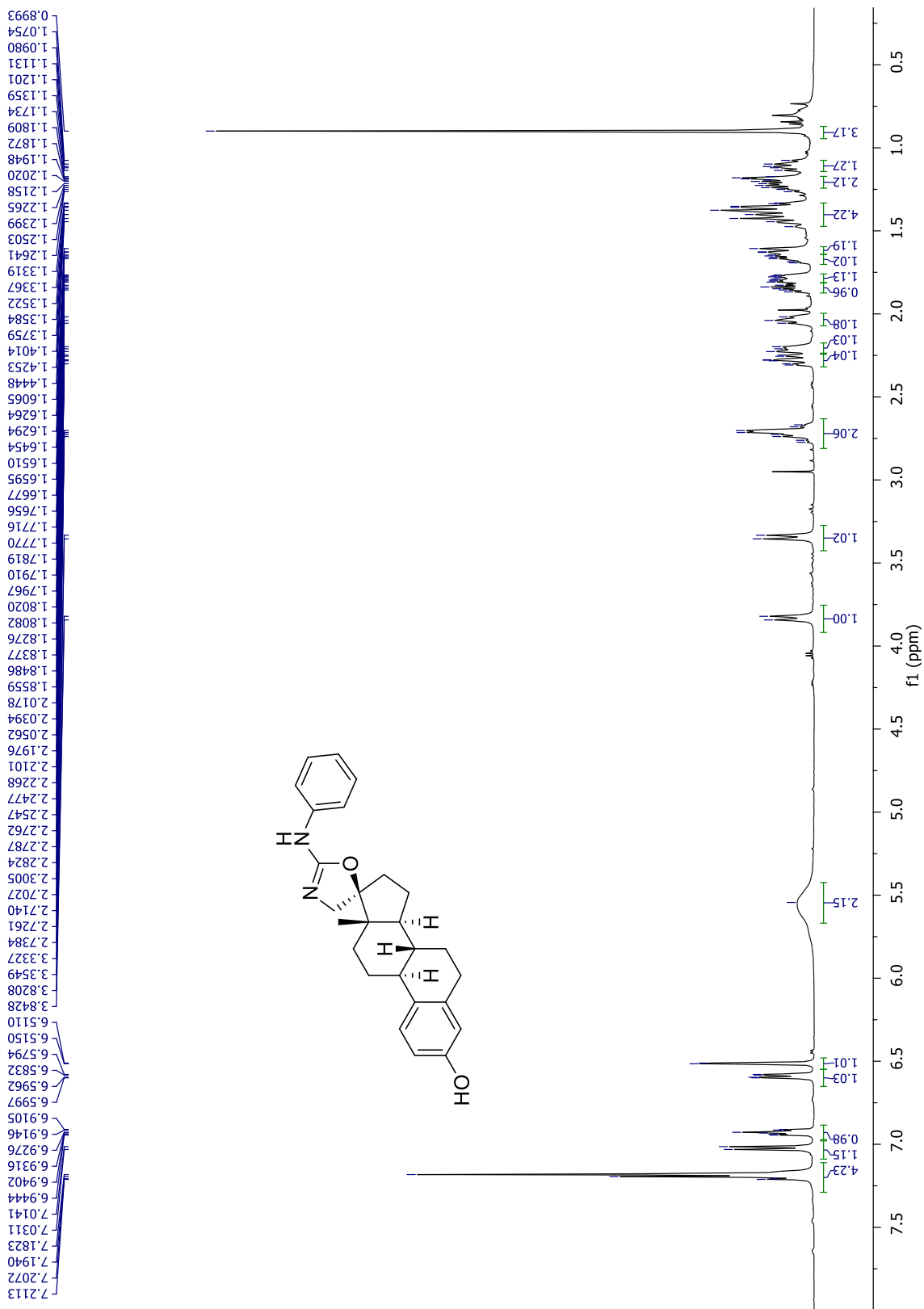


Espectro 18. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl₃) del derivado **20a**.

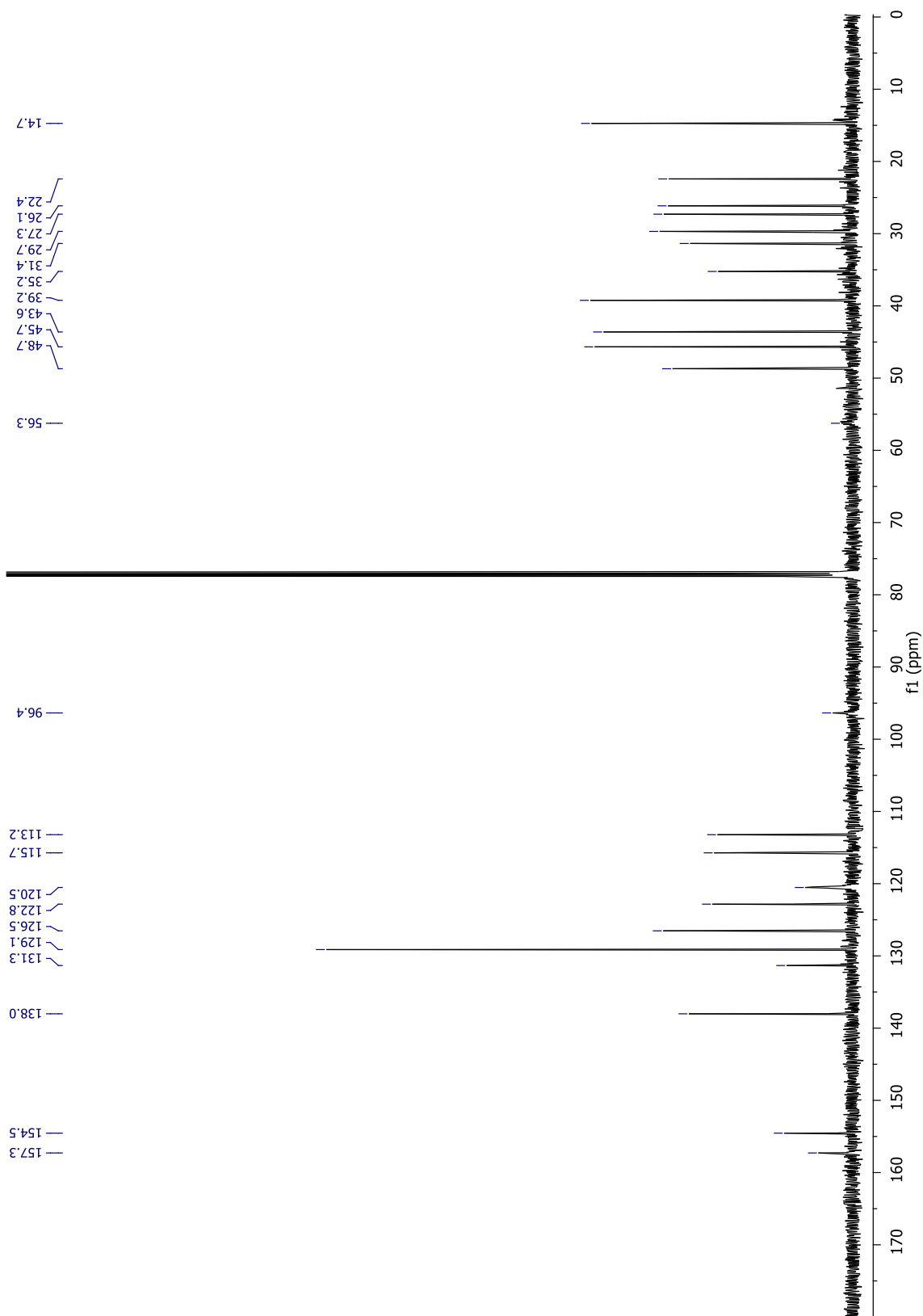




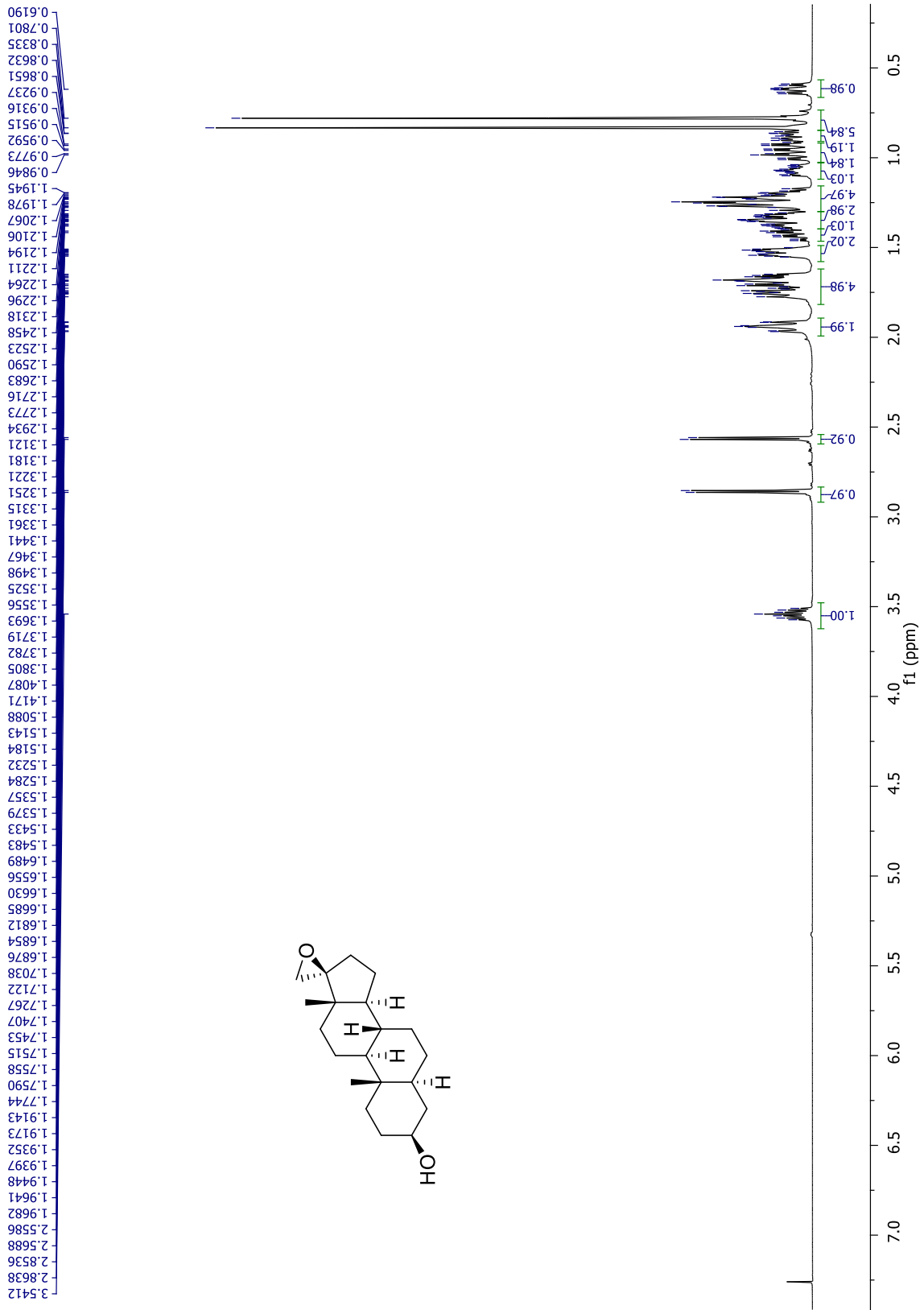
Espectro 20. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl₃) del derivado 20b.



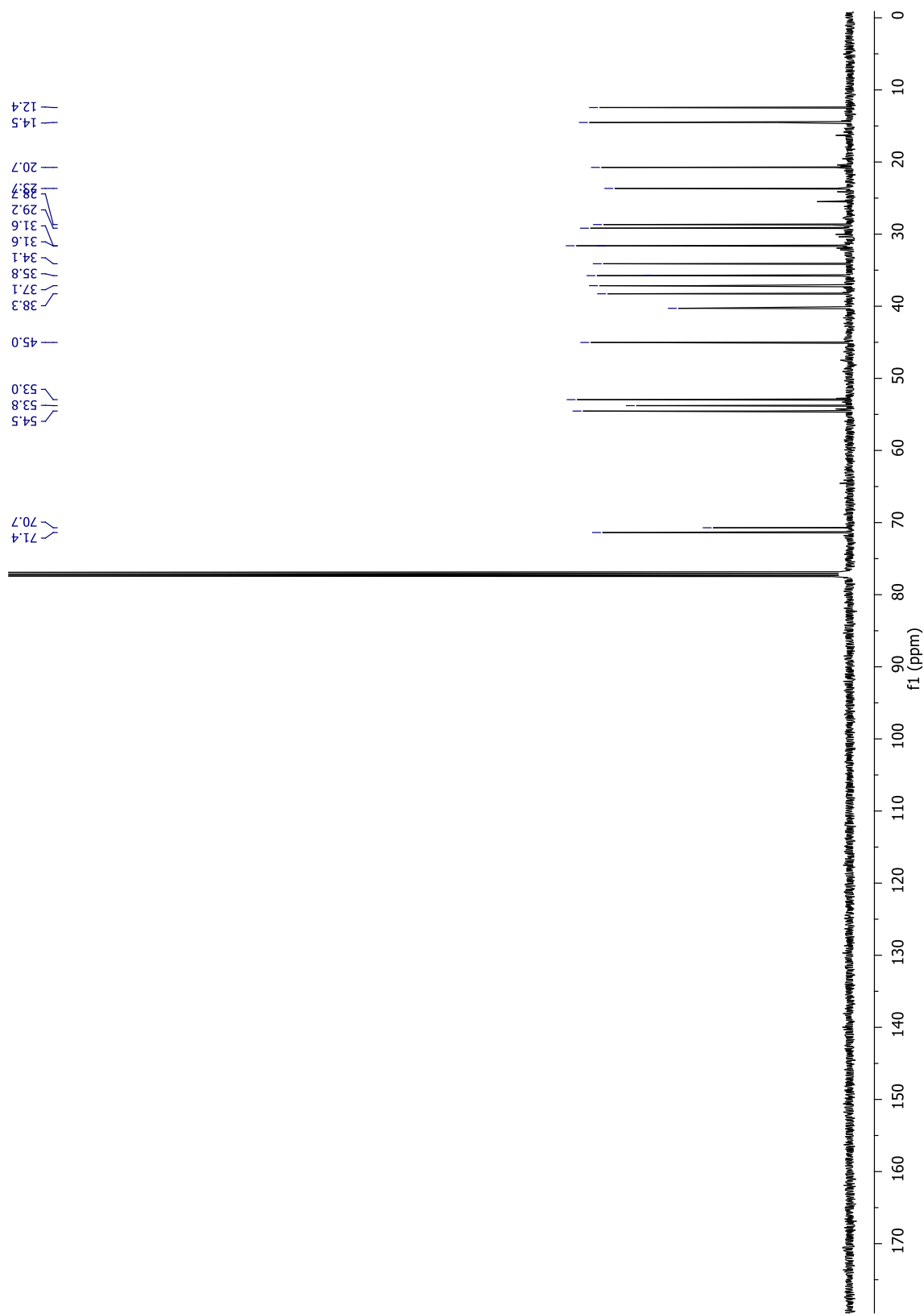
Espectro 21. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 20c.



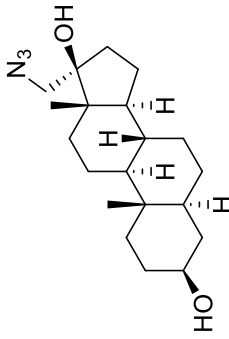
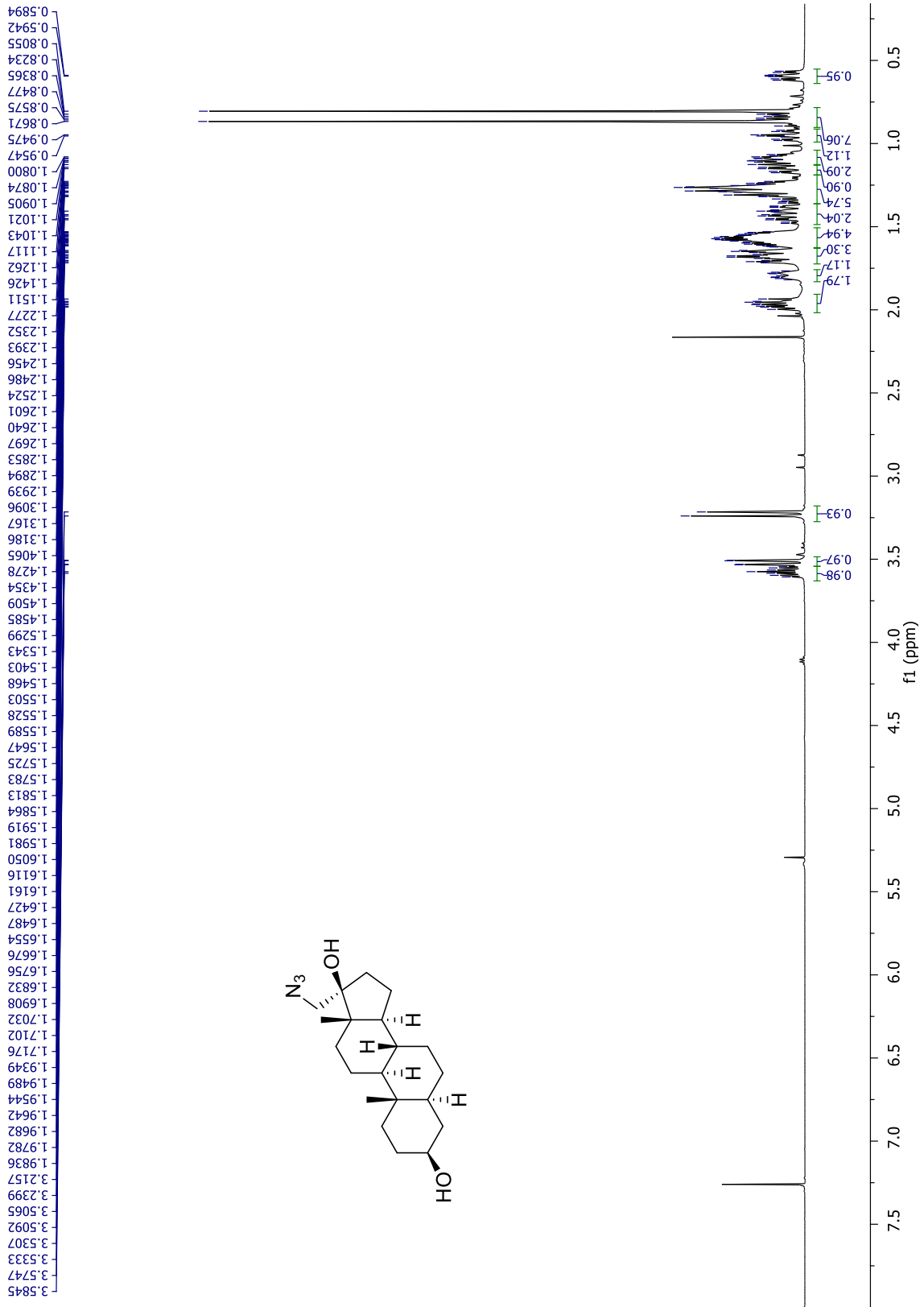
Espectro 22. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 20c.



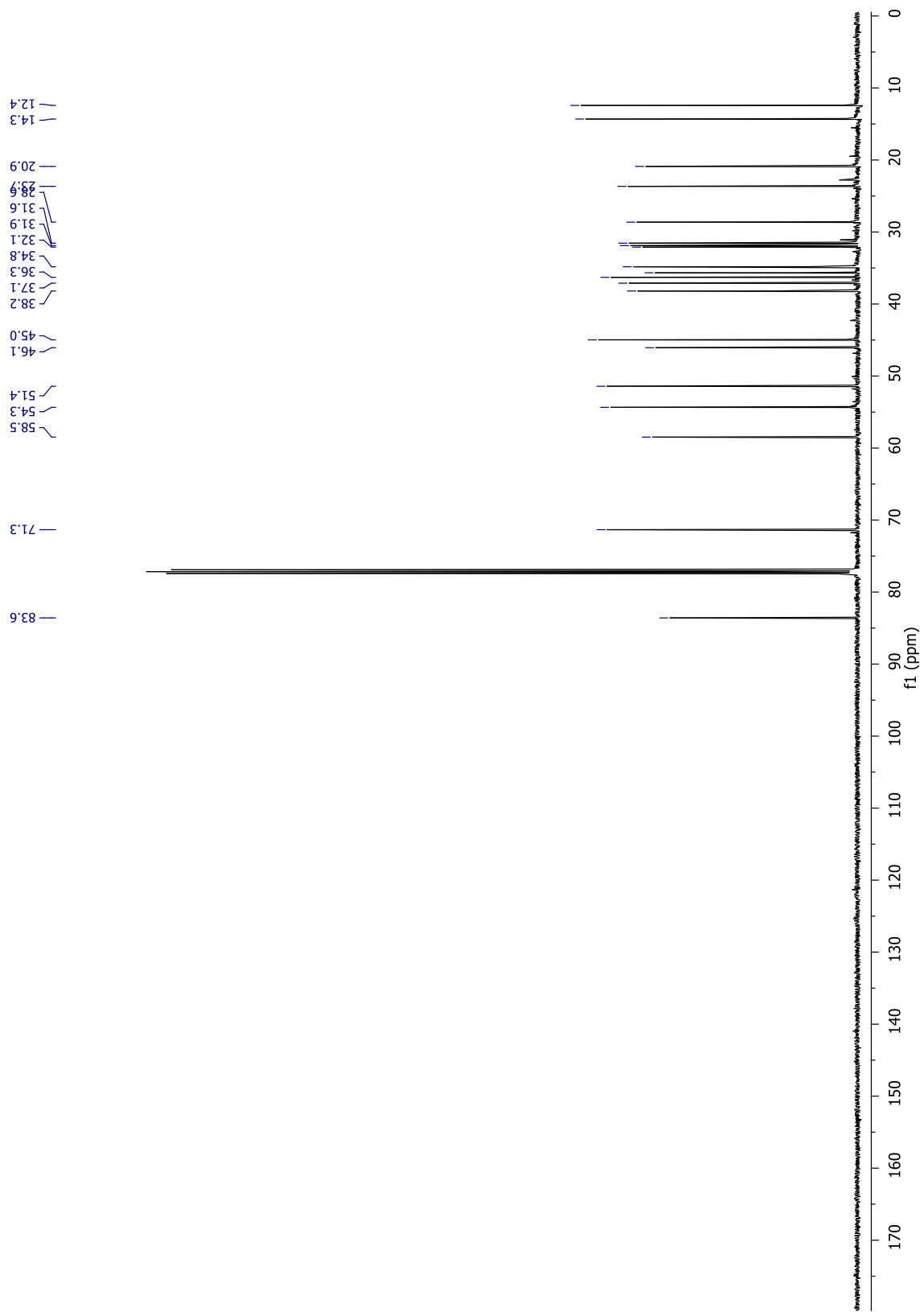
Espectro 23. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 23.



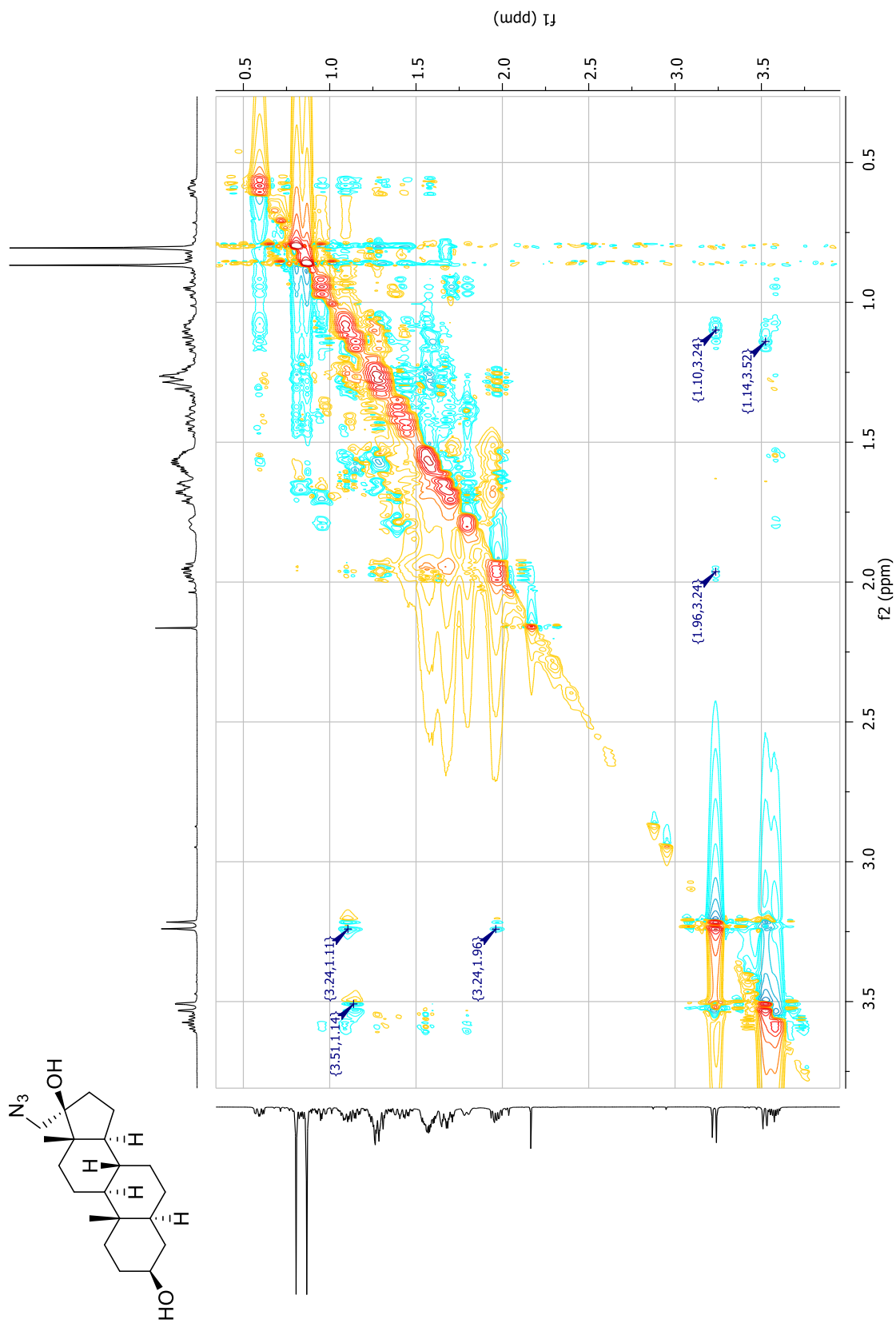
Espectro 24. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **23**.



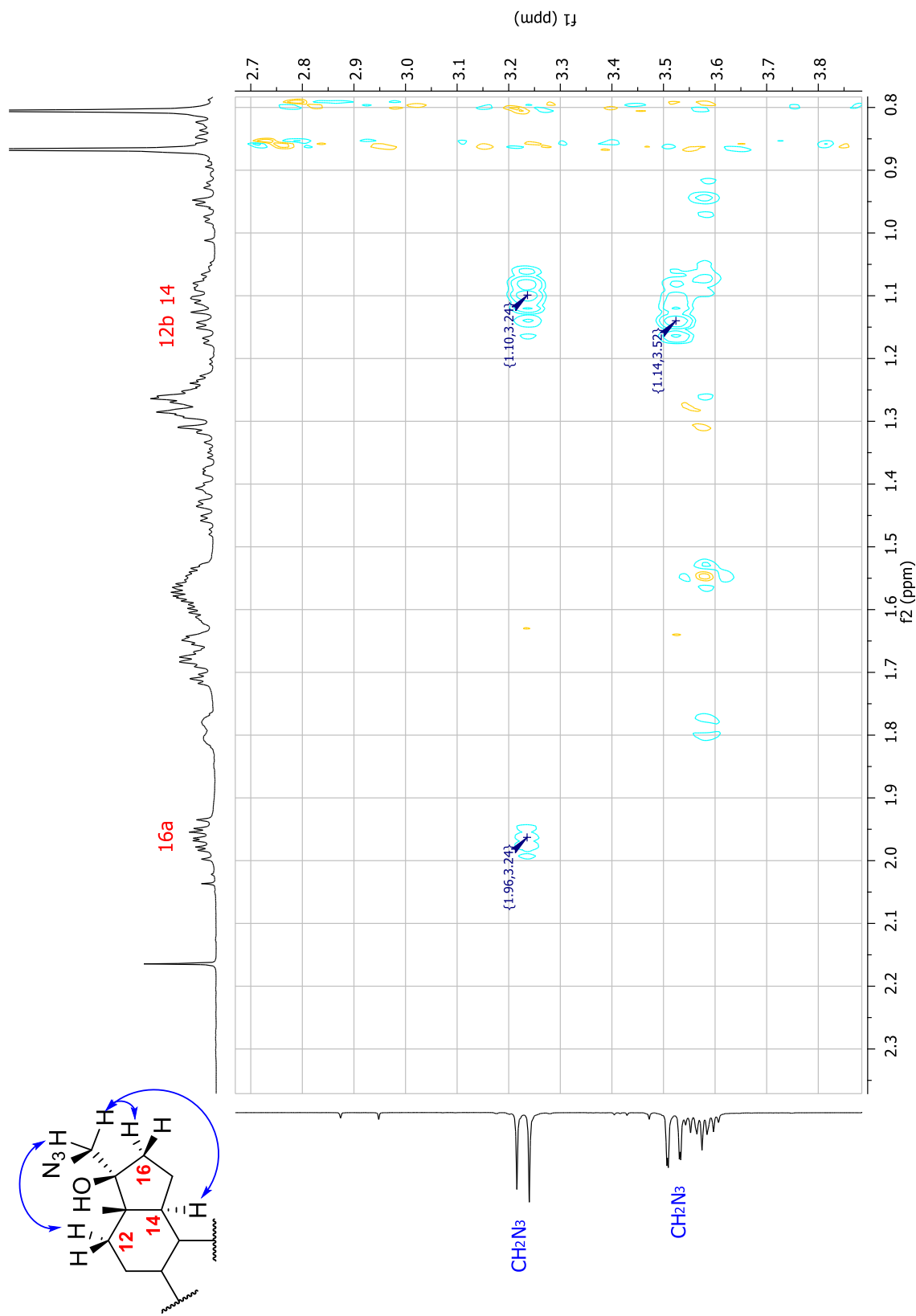
Espectro 25. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 24.



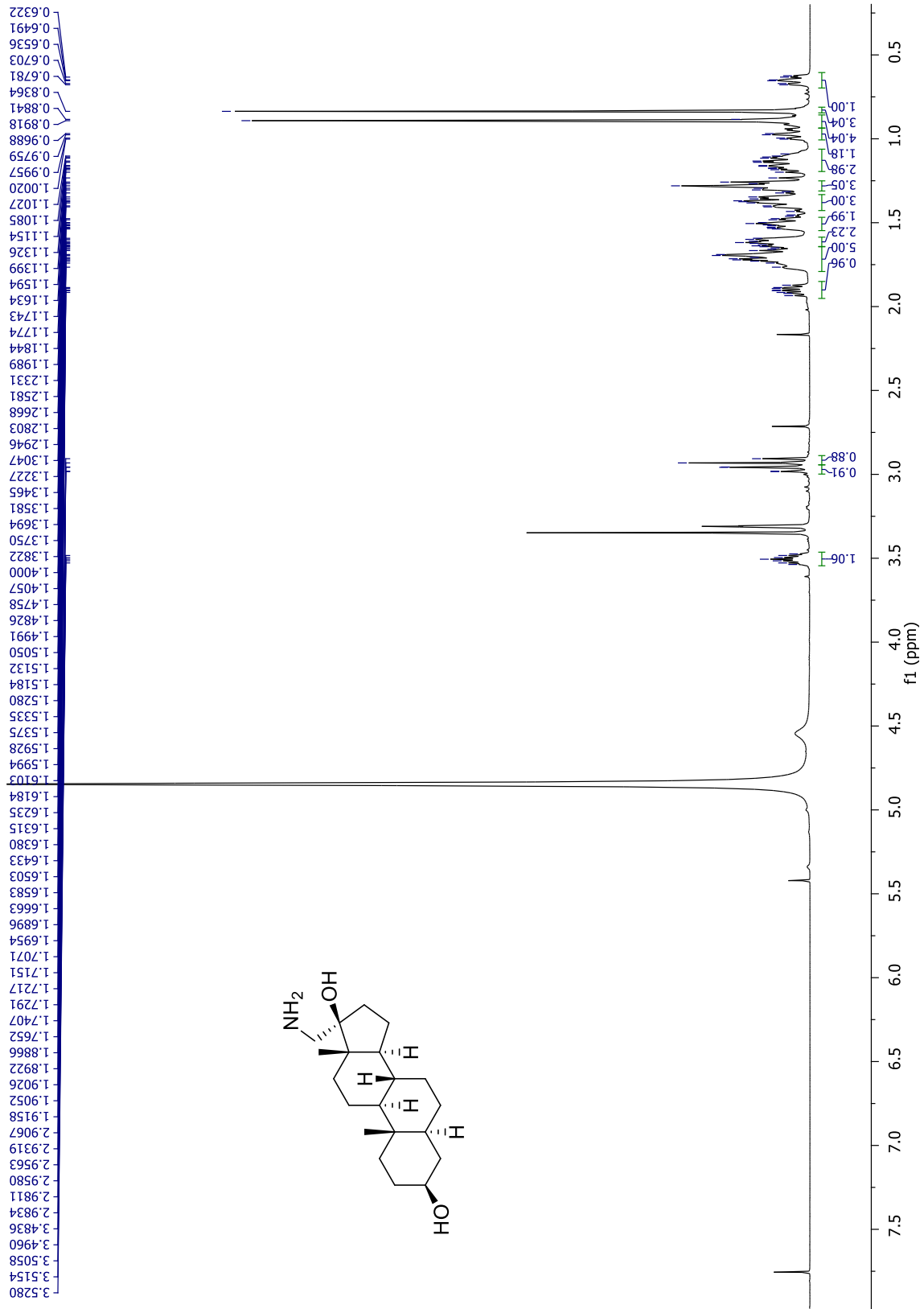
Espectro 26. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 24.



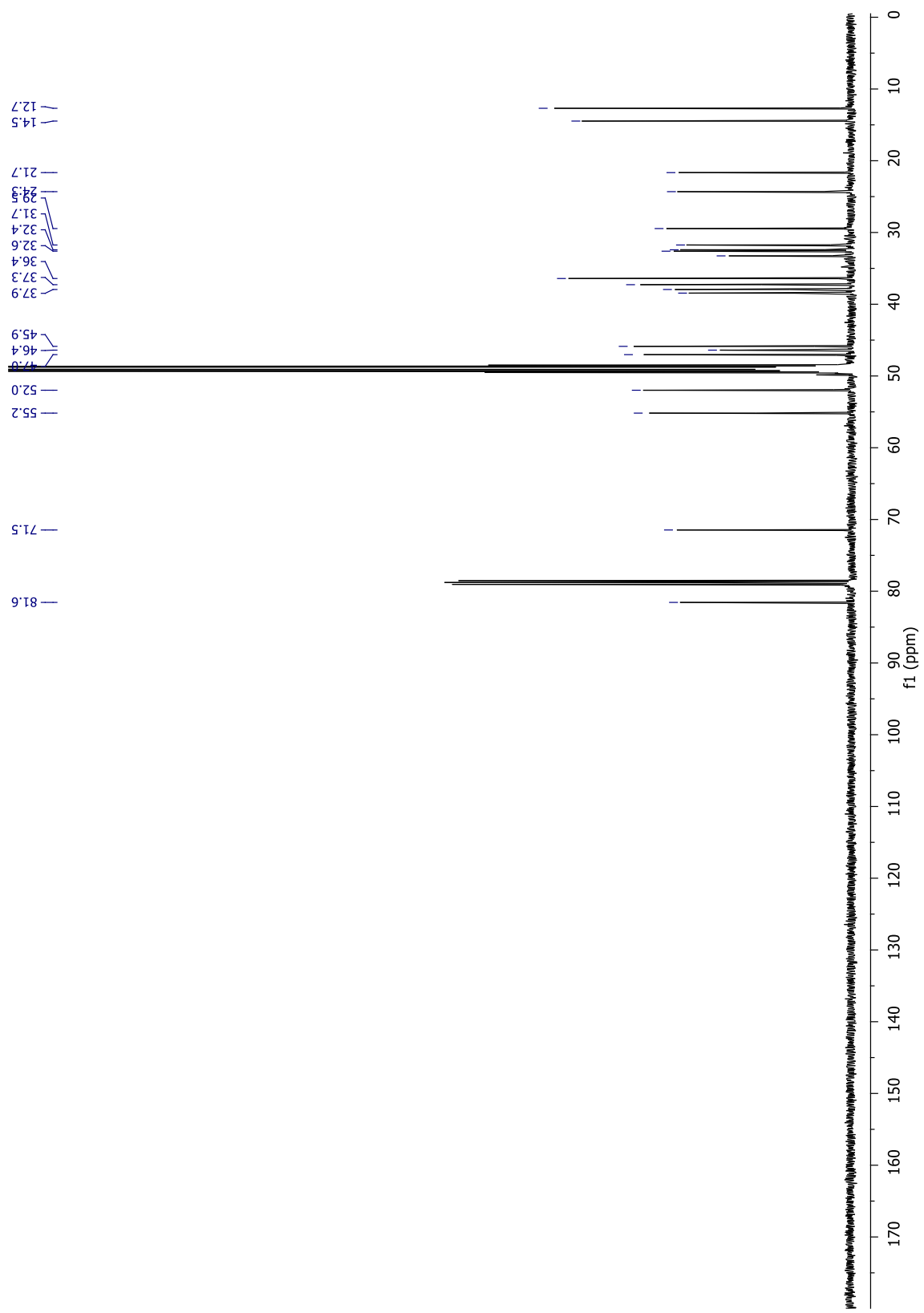
Espectro 27a. NOESY del compuesto 24.



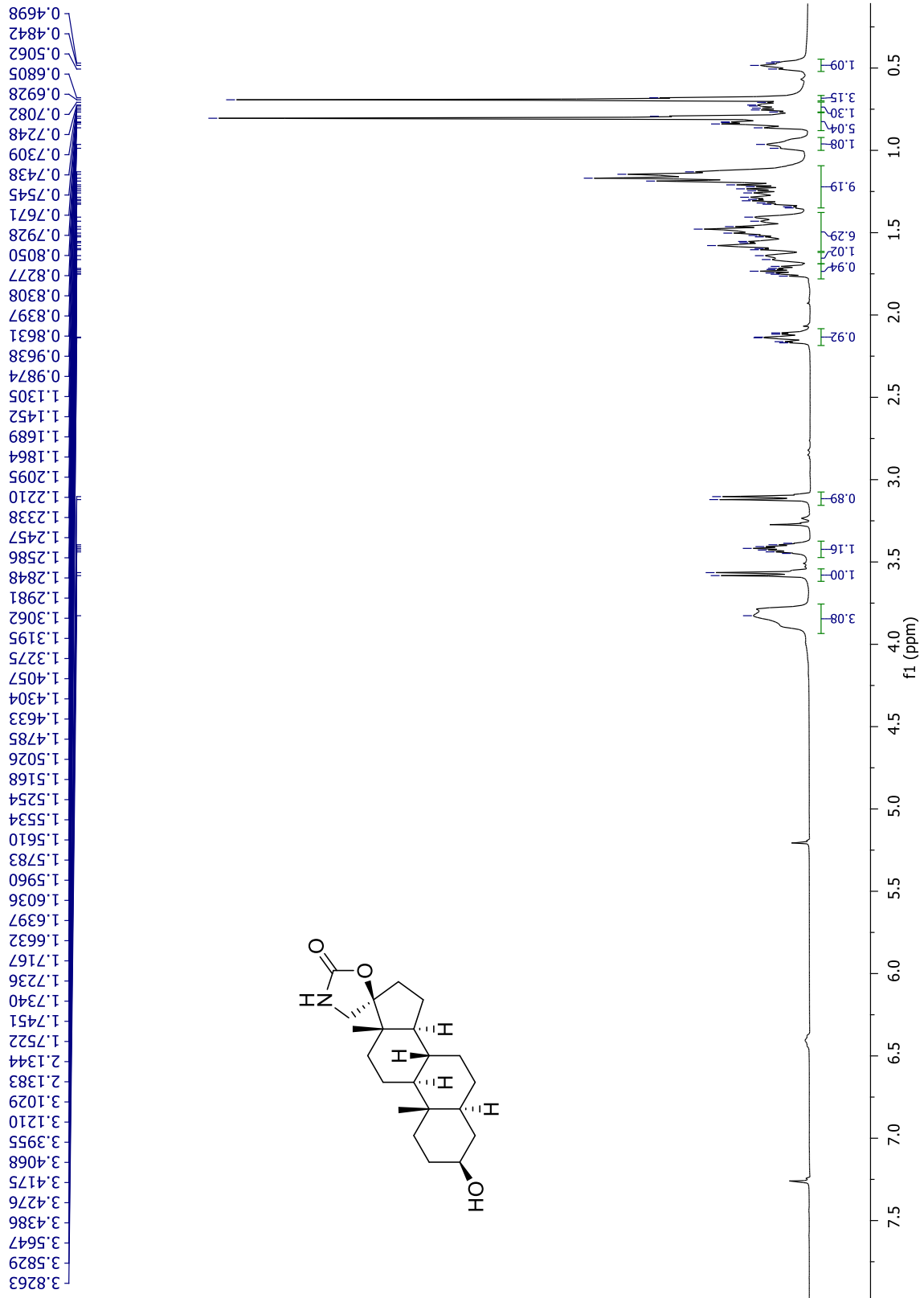
Espectro 27b. NOESY del compuesto 24.



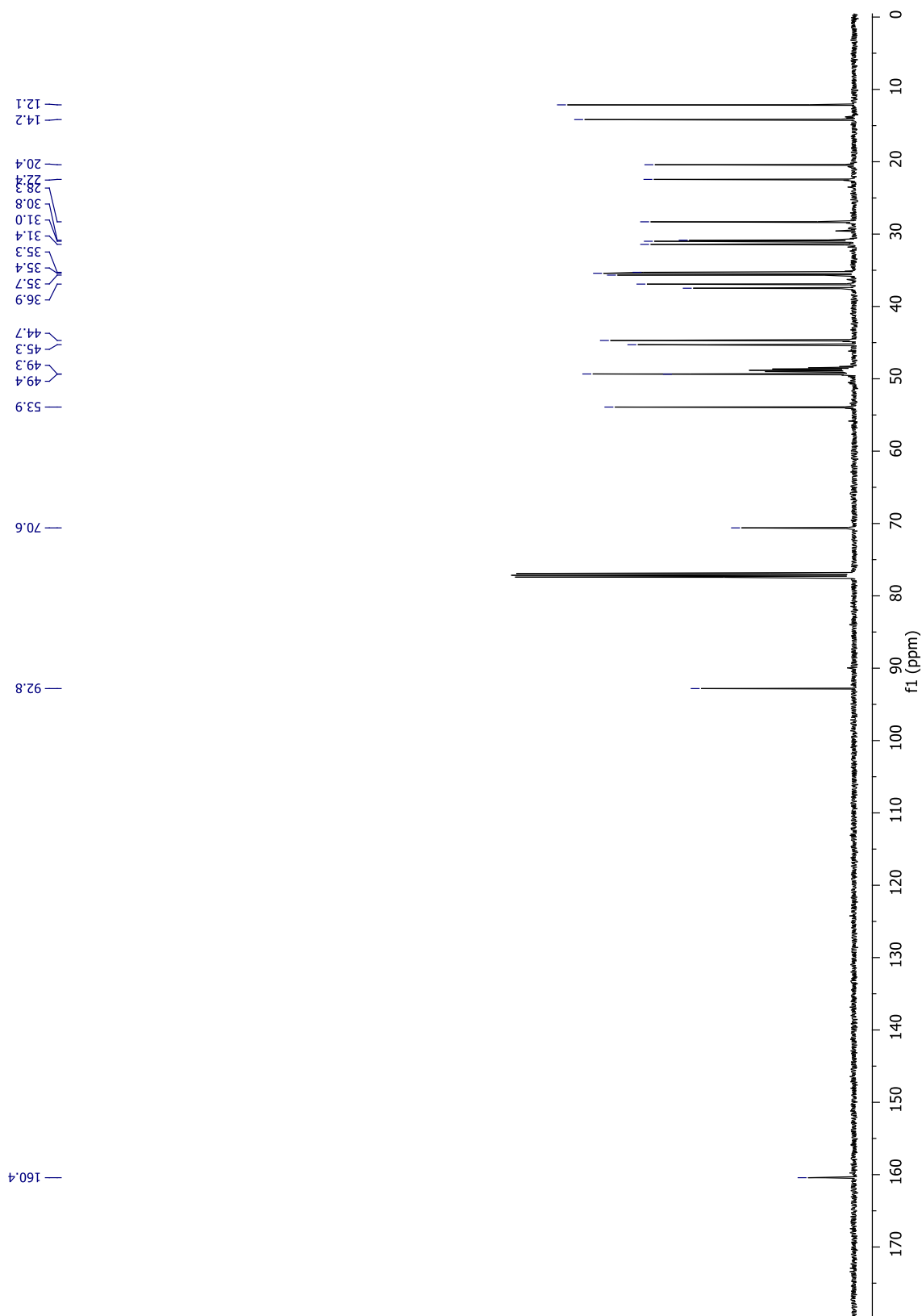
Espectro 28. RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$) del derivado 25.



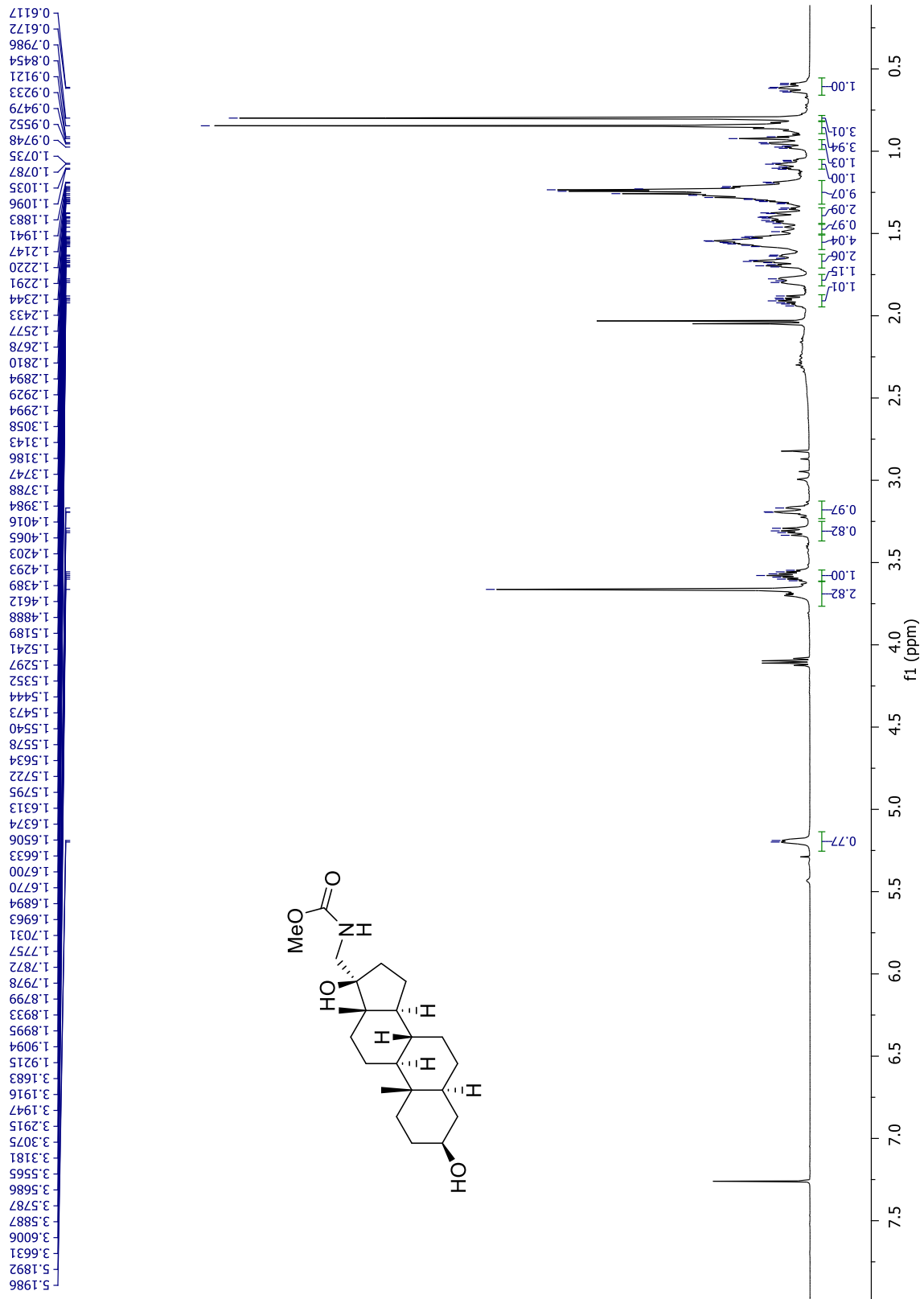
Espectro 29. RMN de ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD-CDCl₃) del derivado 25.

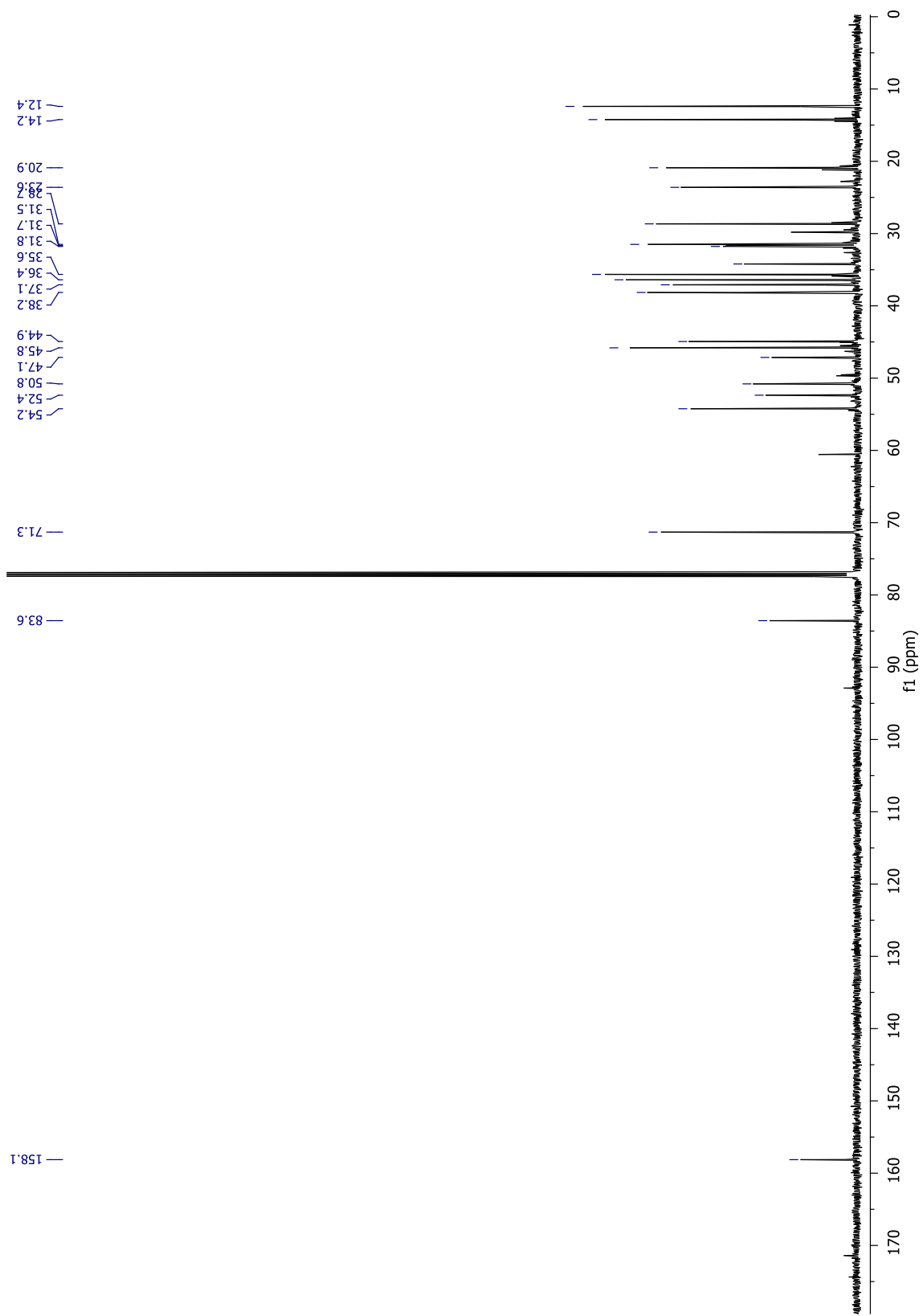


Espectro 30. RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$) del derivado 27.

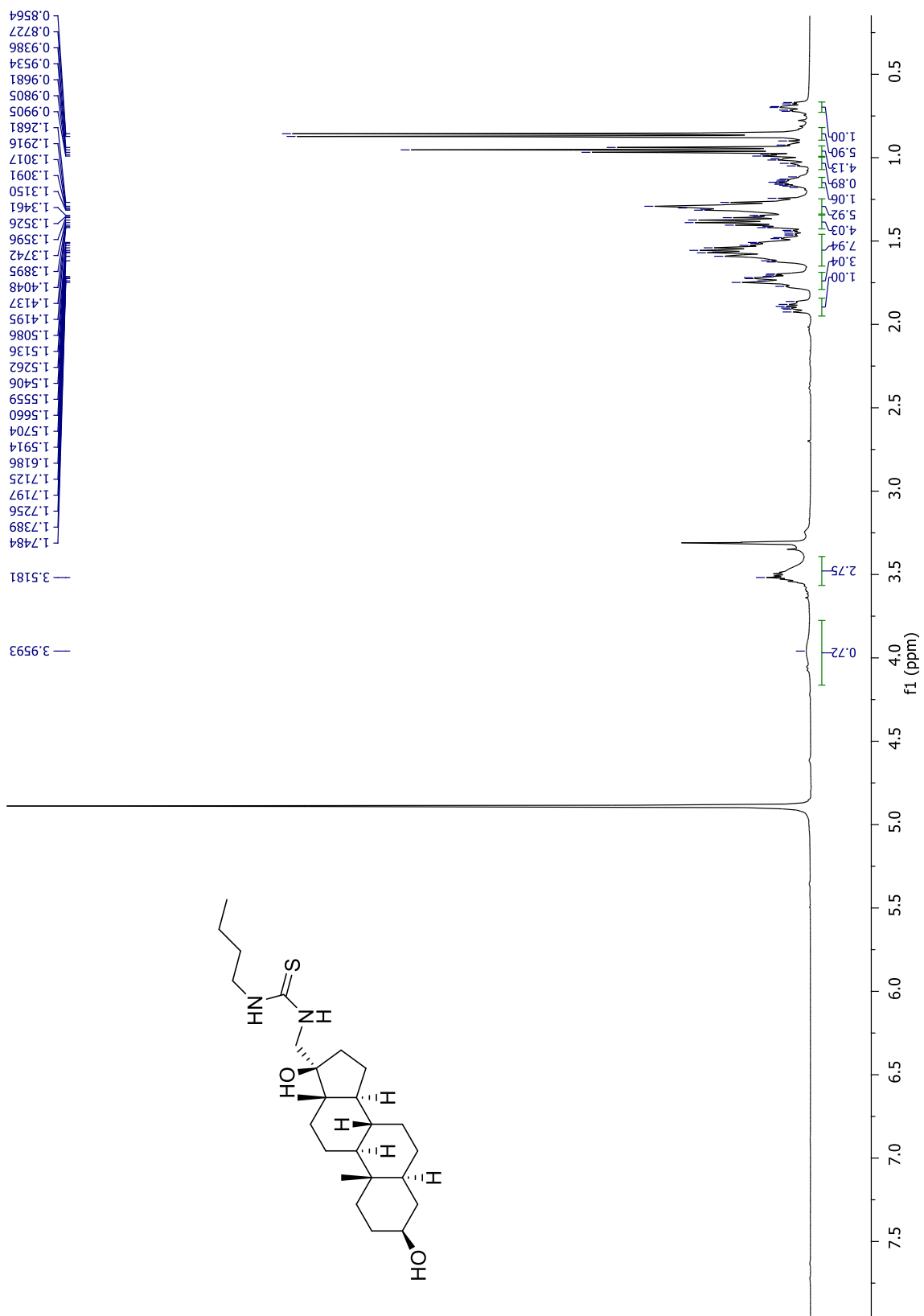


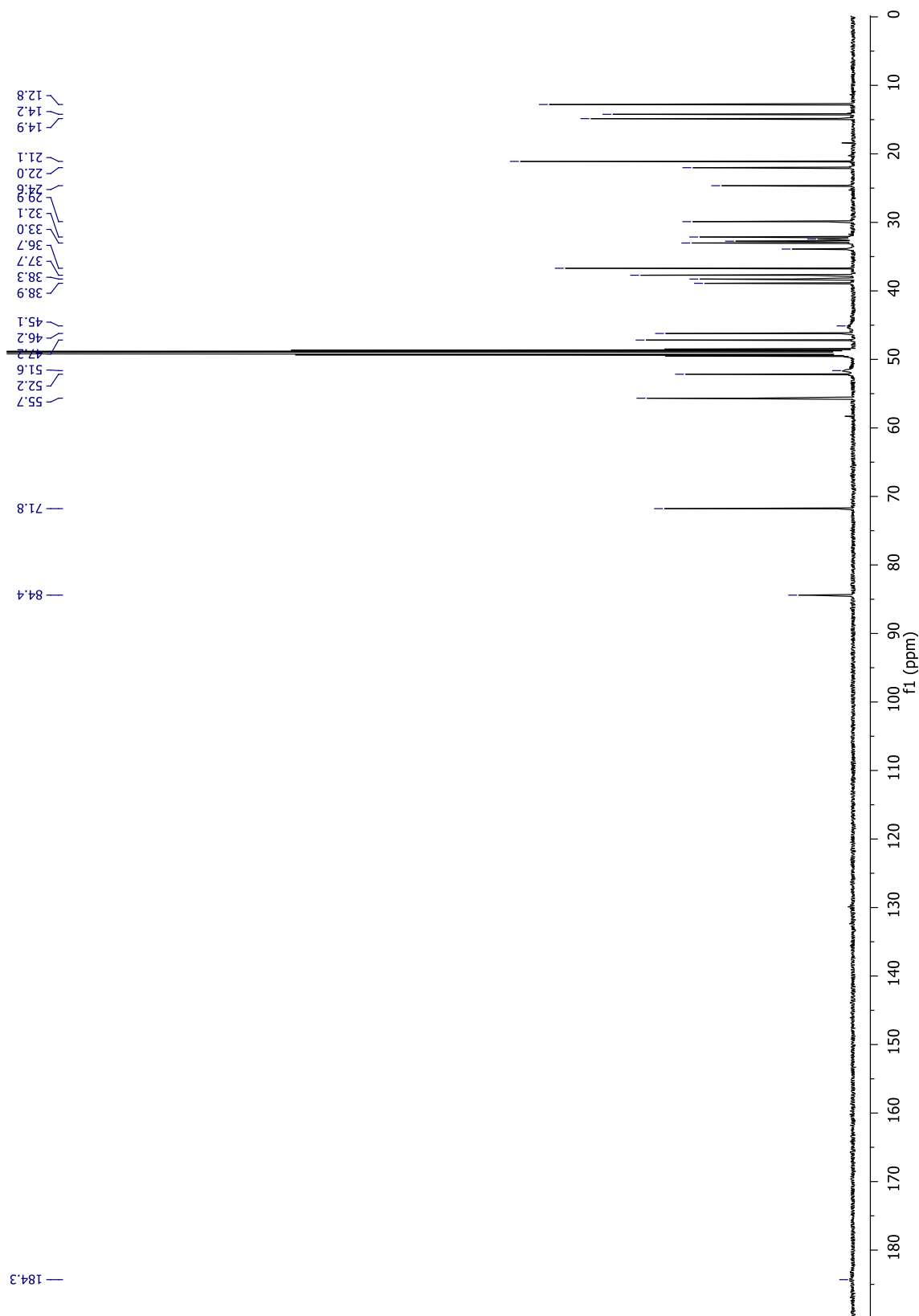
Espectro 31. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$) del derivado 27.



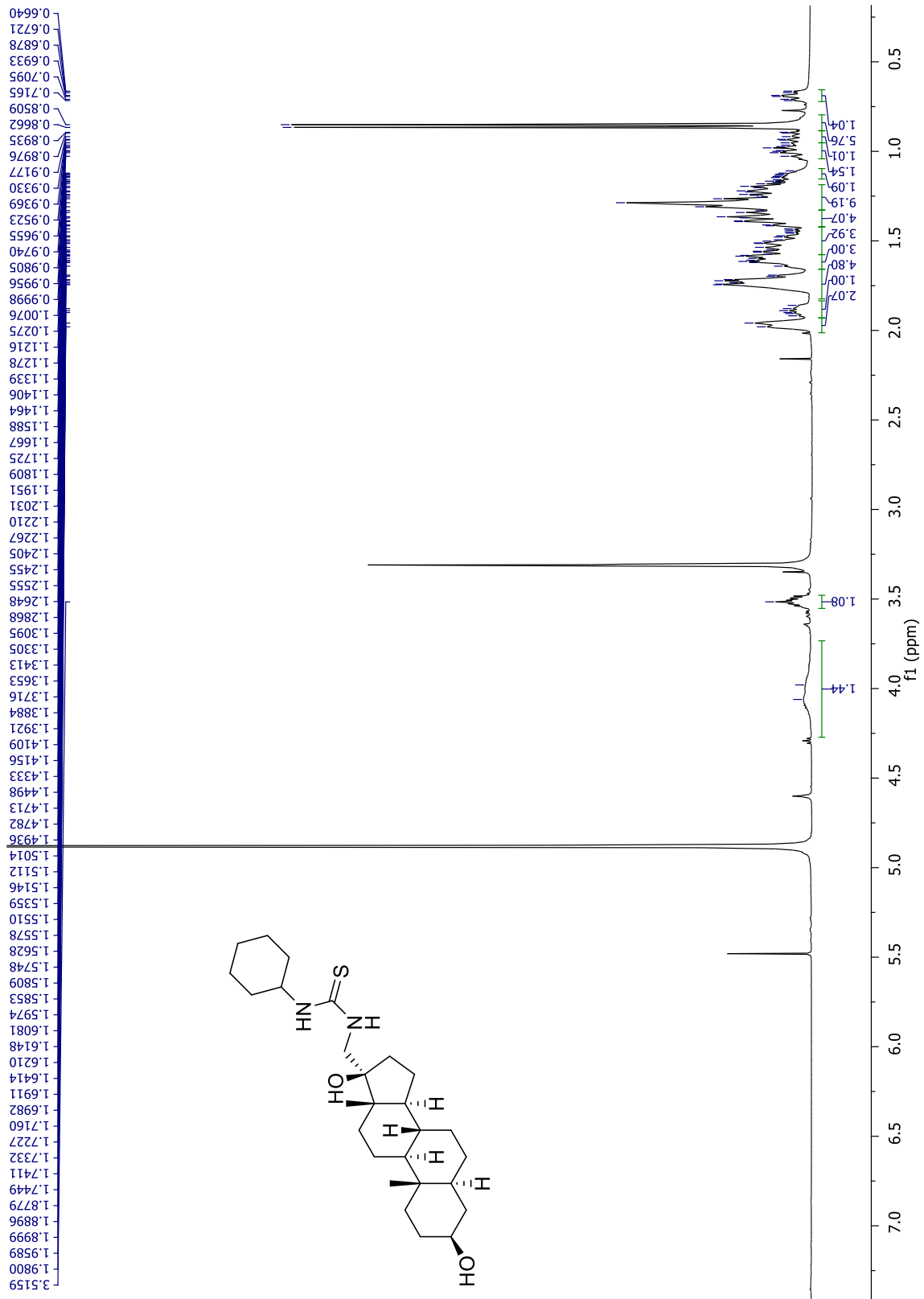


Espectro 33. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 28.

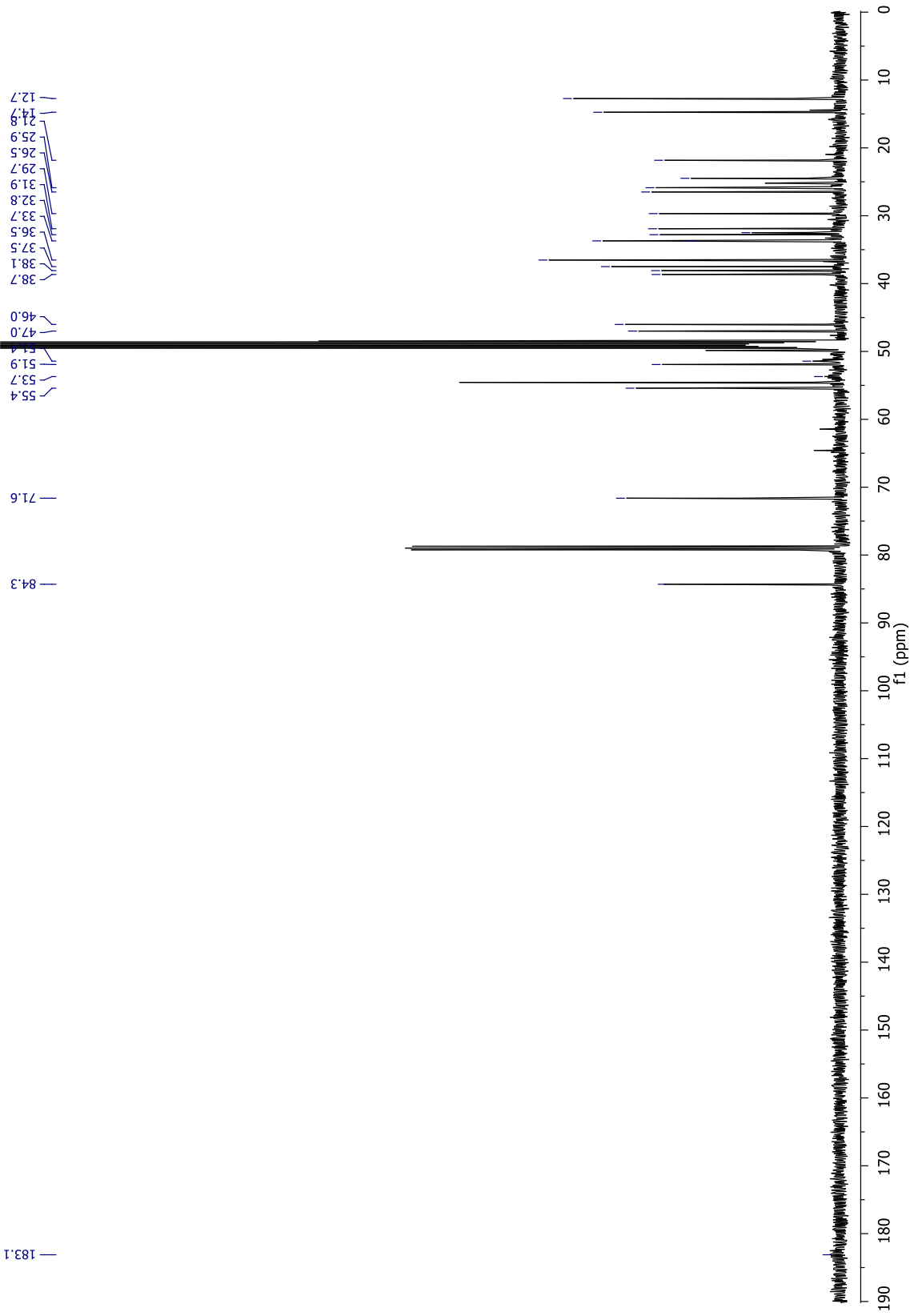




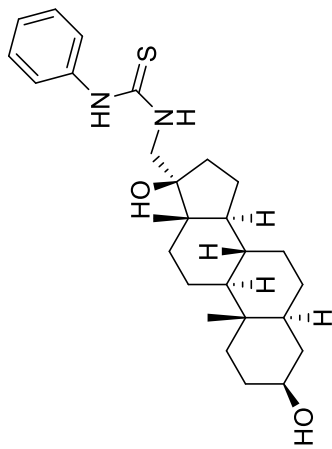
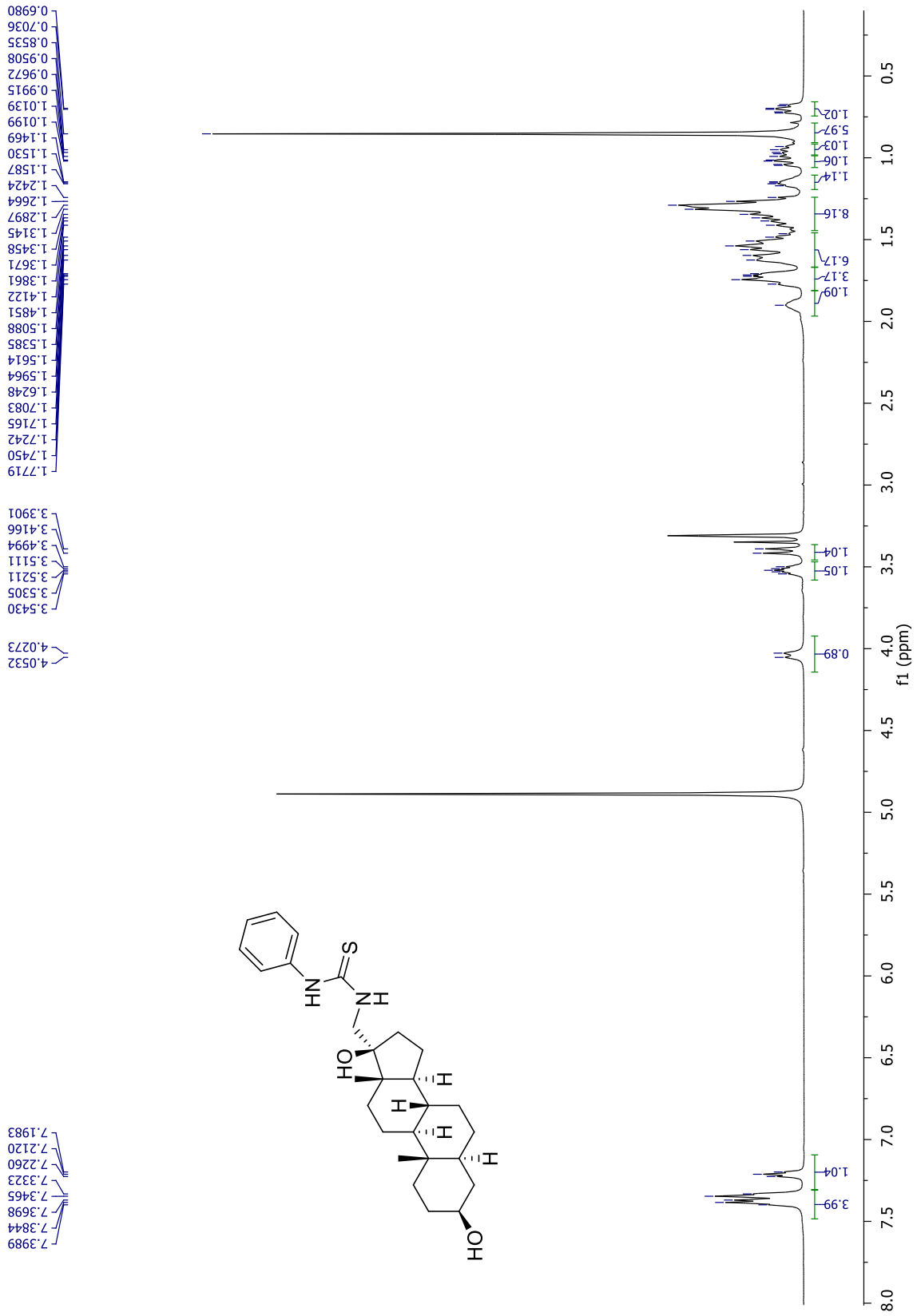
Espectro 35. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado 29a.

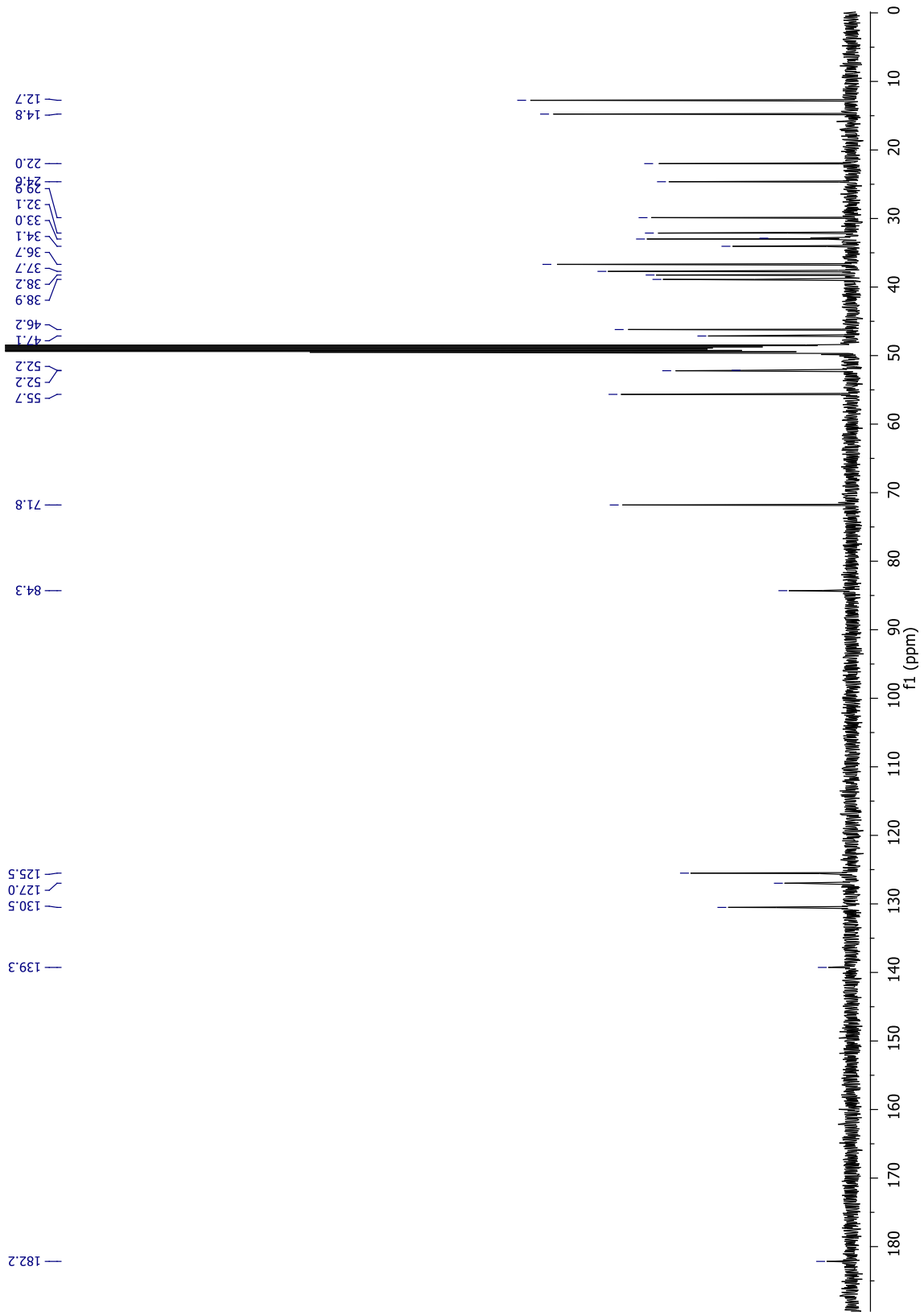


Espectro 36. RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) del derivado 29b.

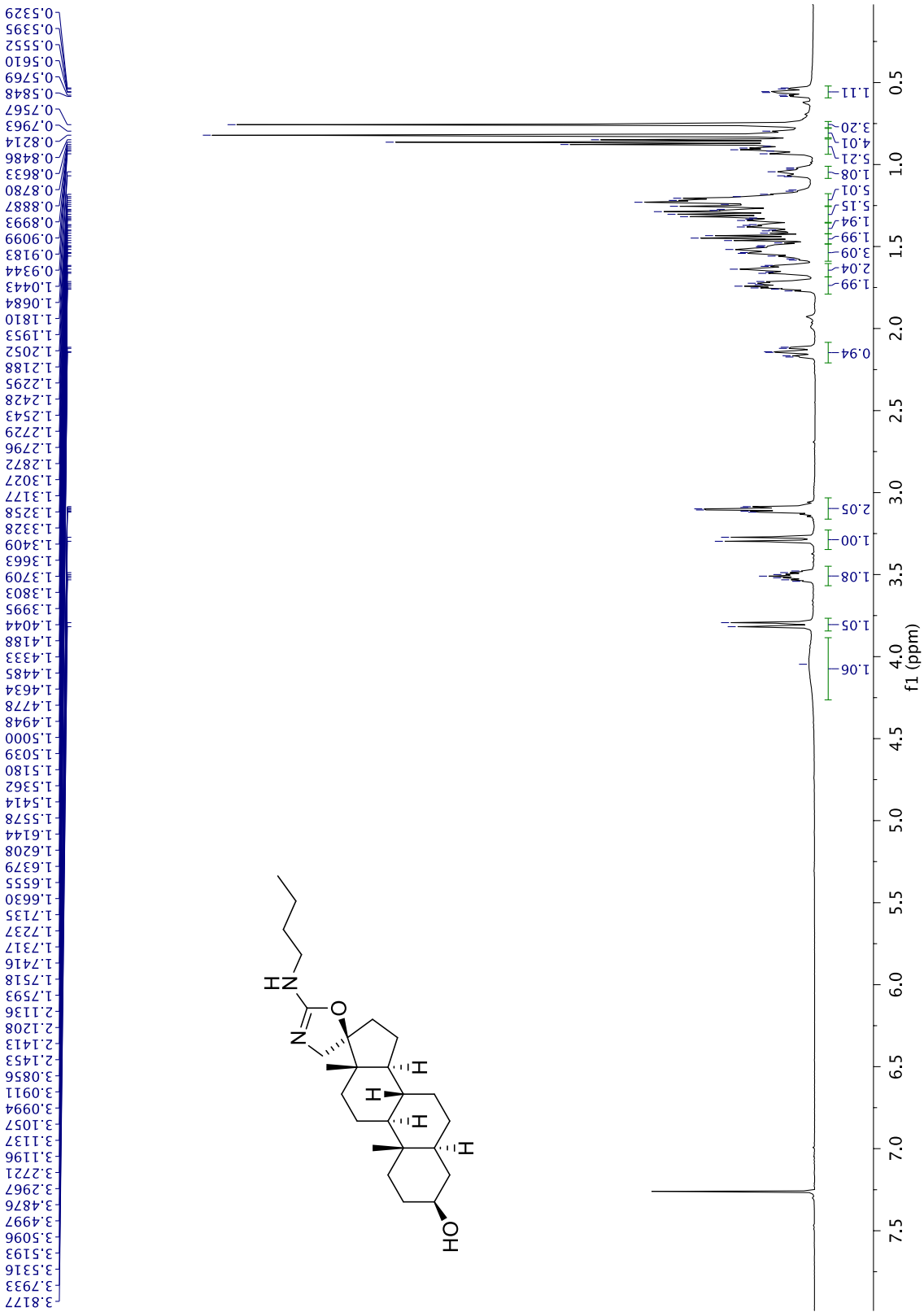


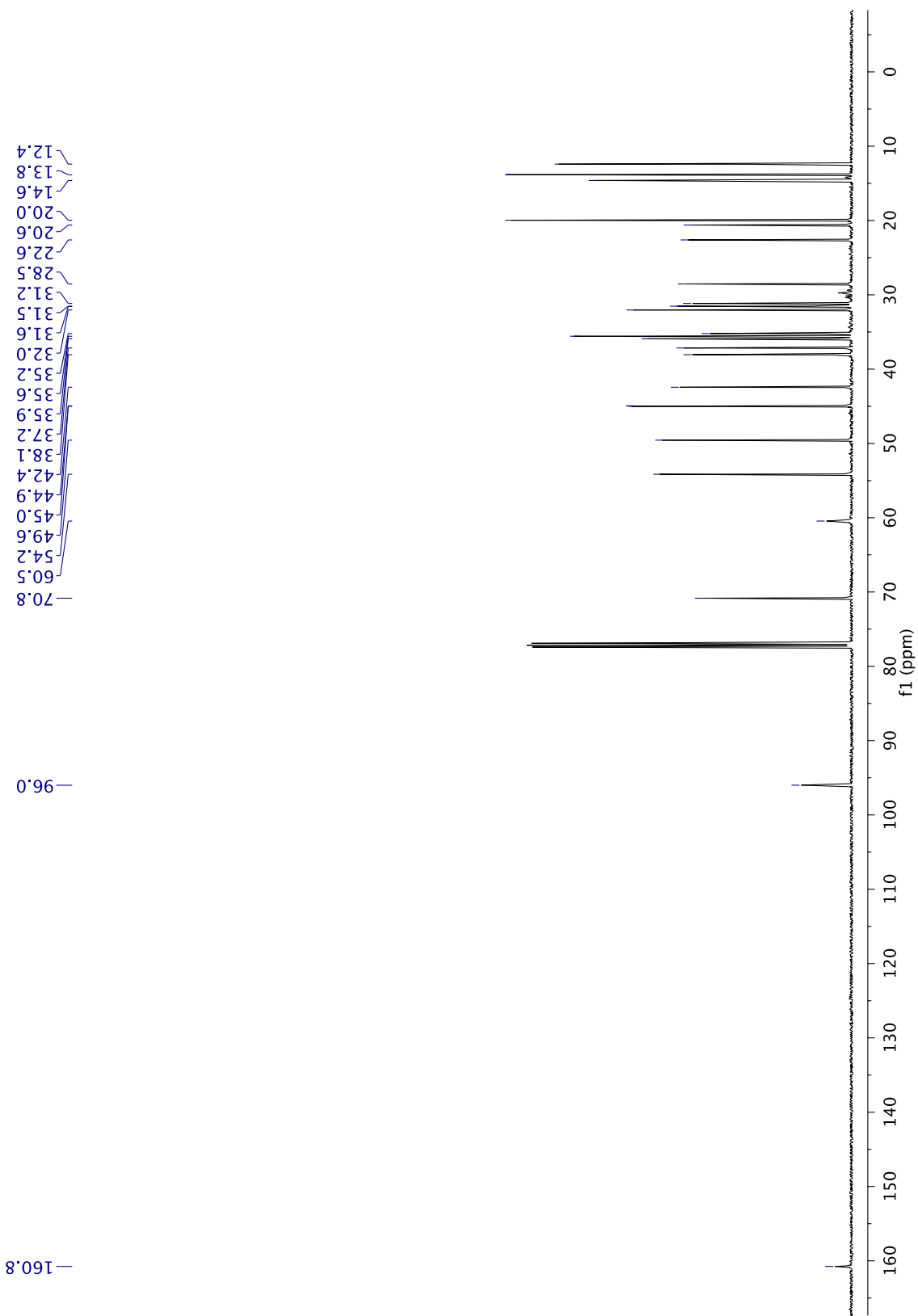
Espectro 37. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado **29b**.



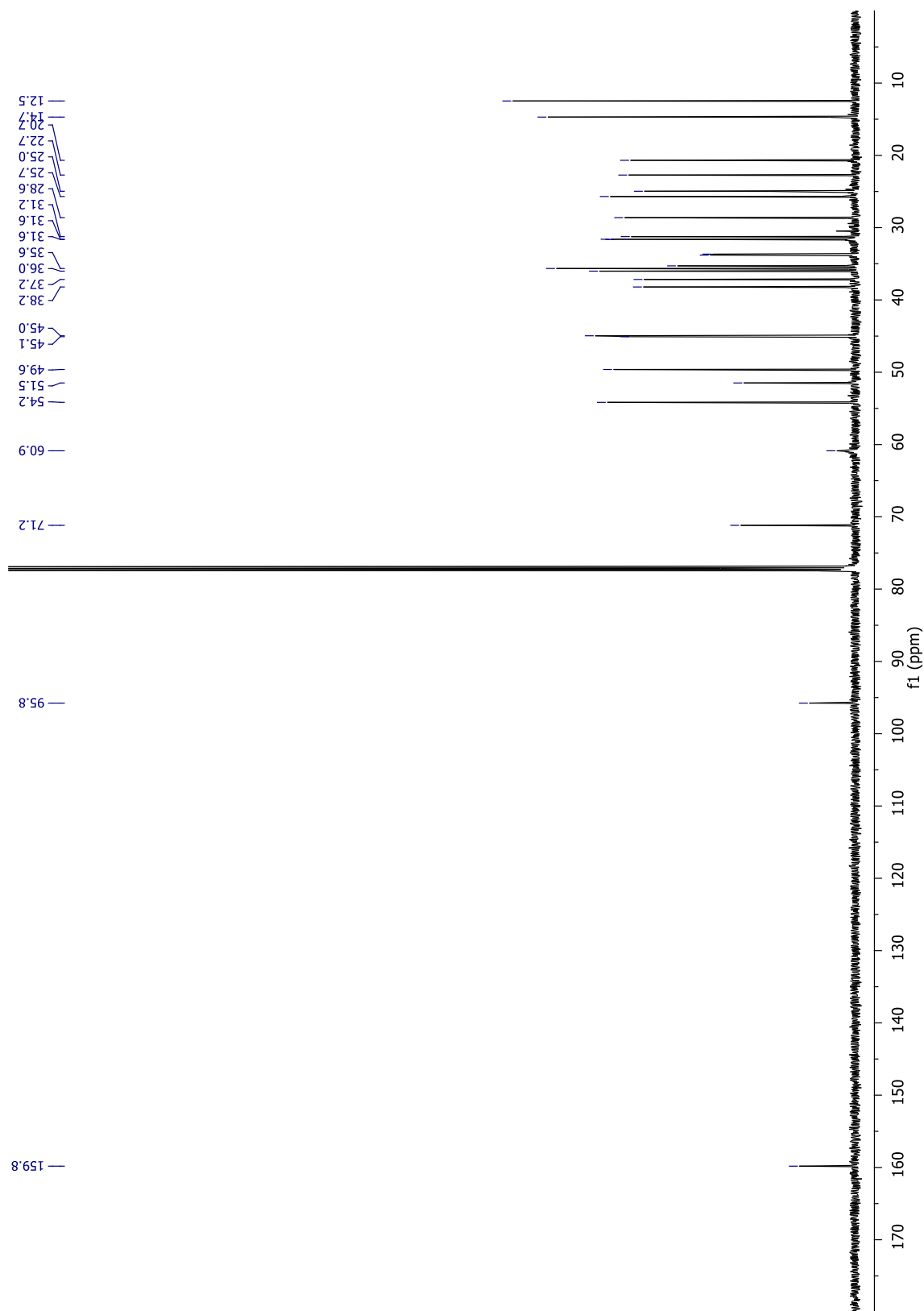


Espectro 39. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado 29c.

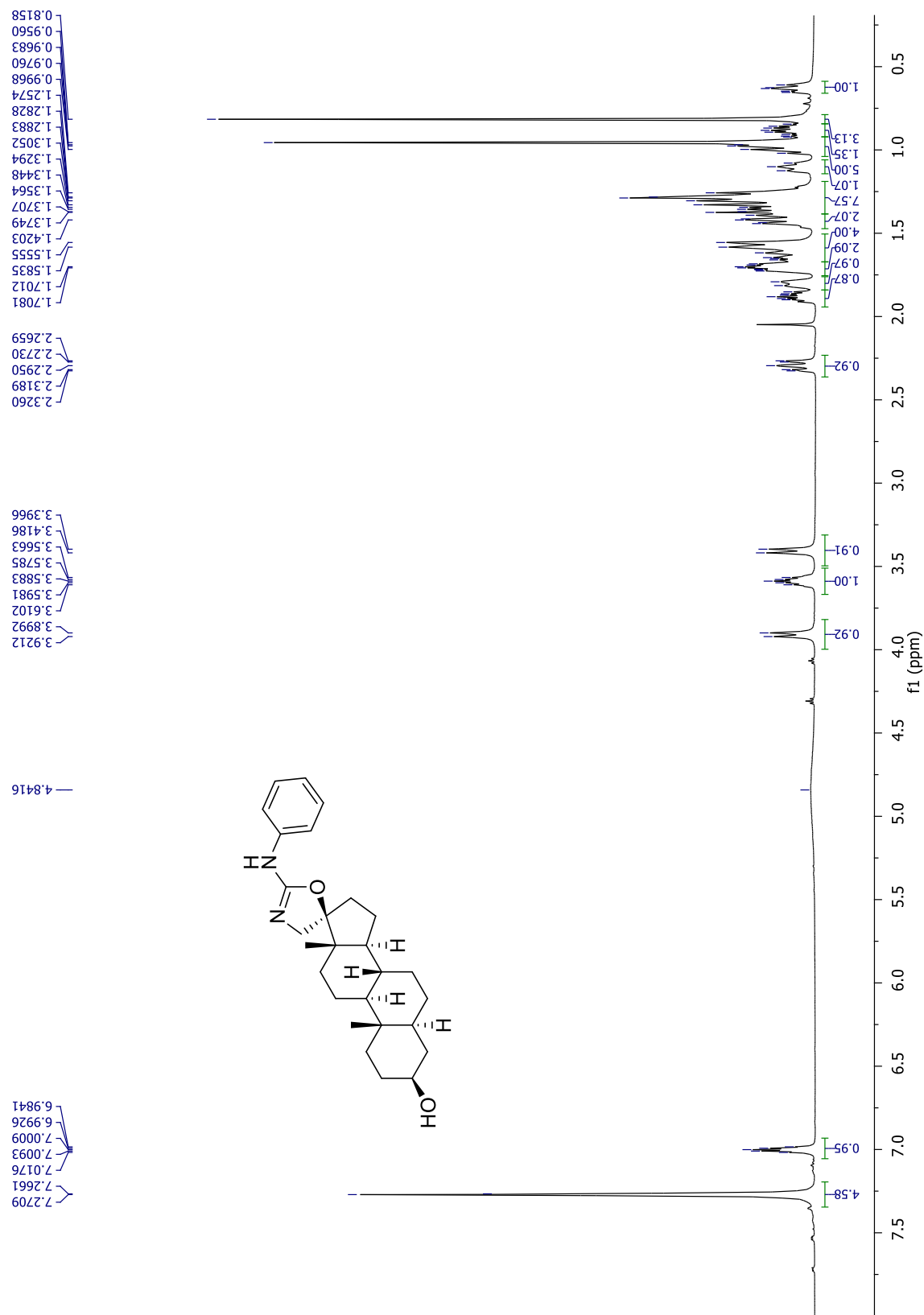


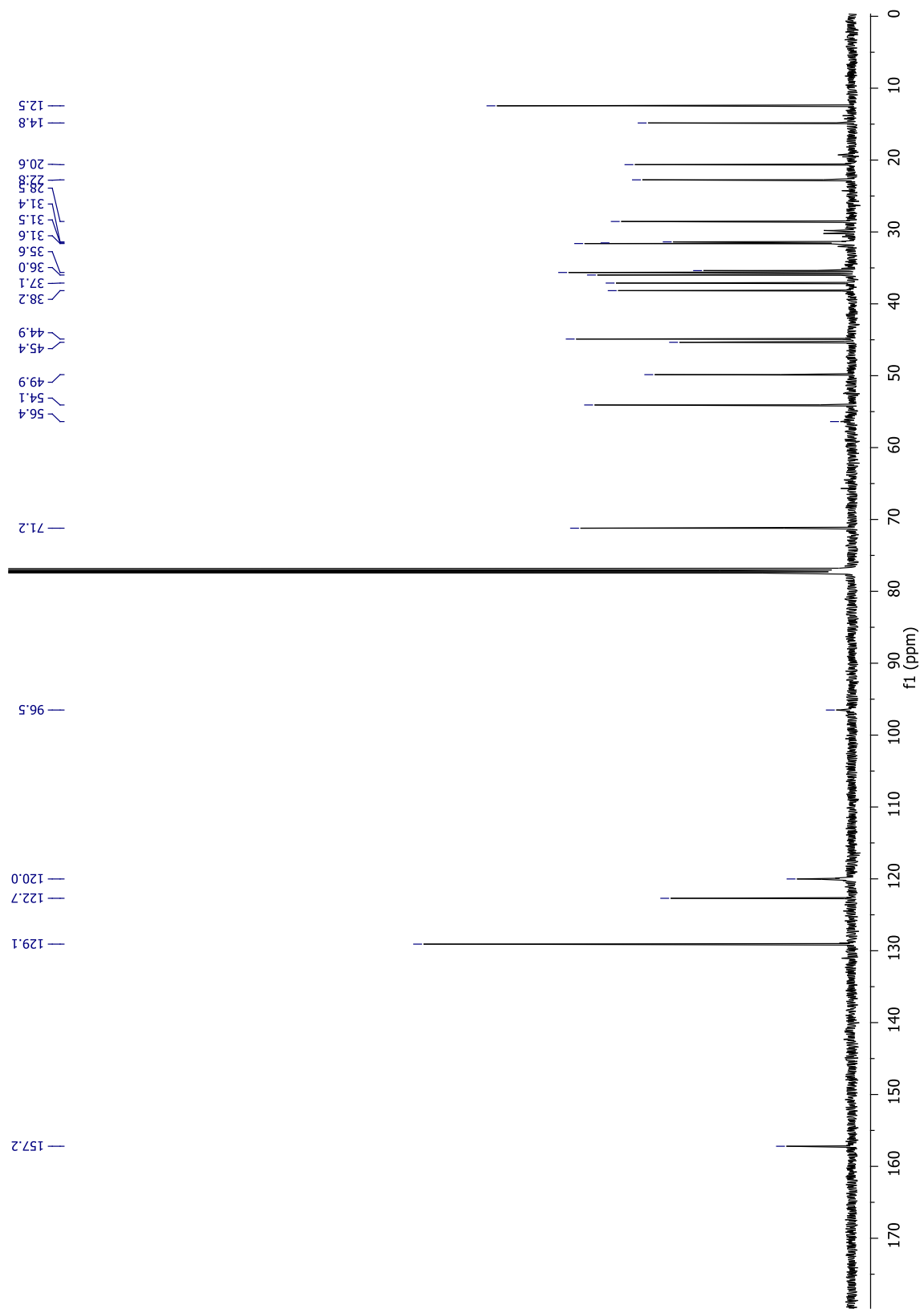


Espectro 41. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 30a.

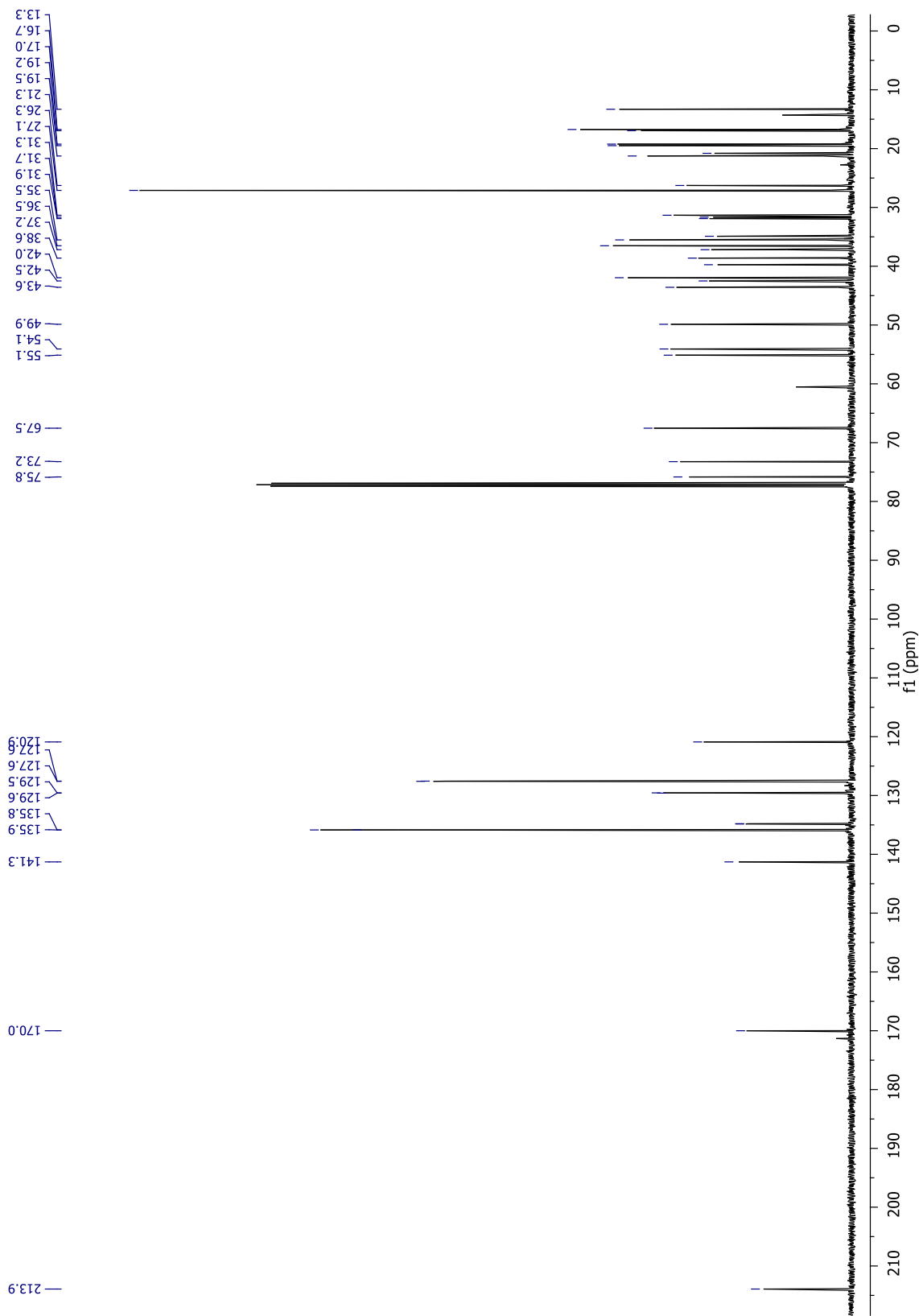


Espectro 43. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **30b**.

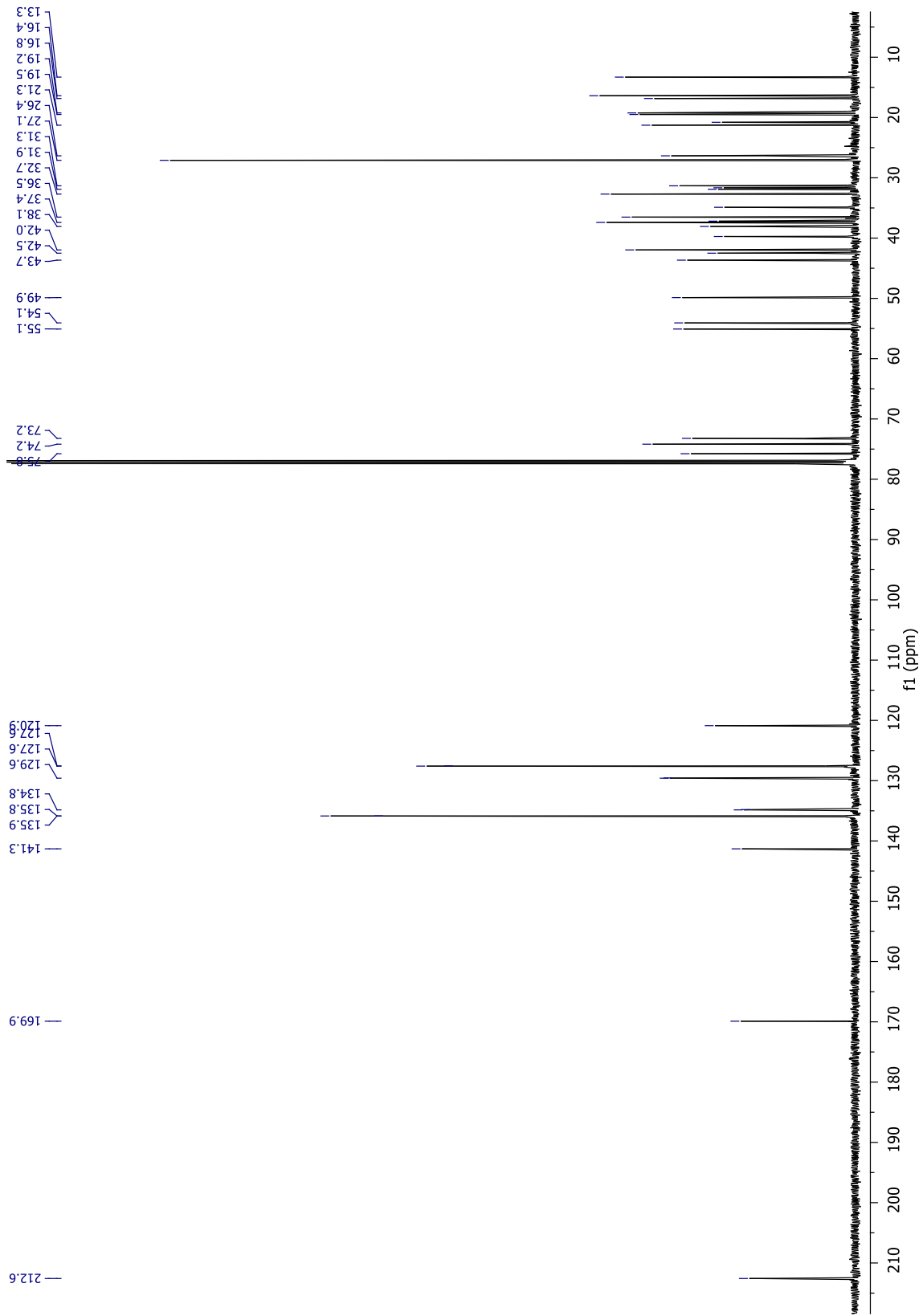




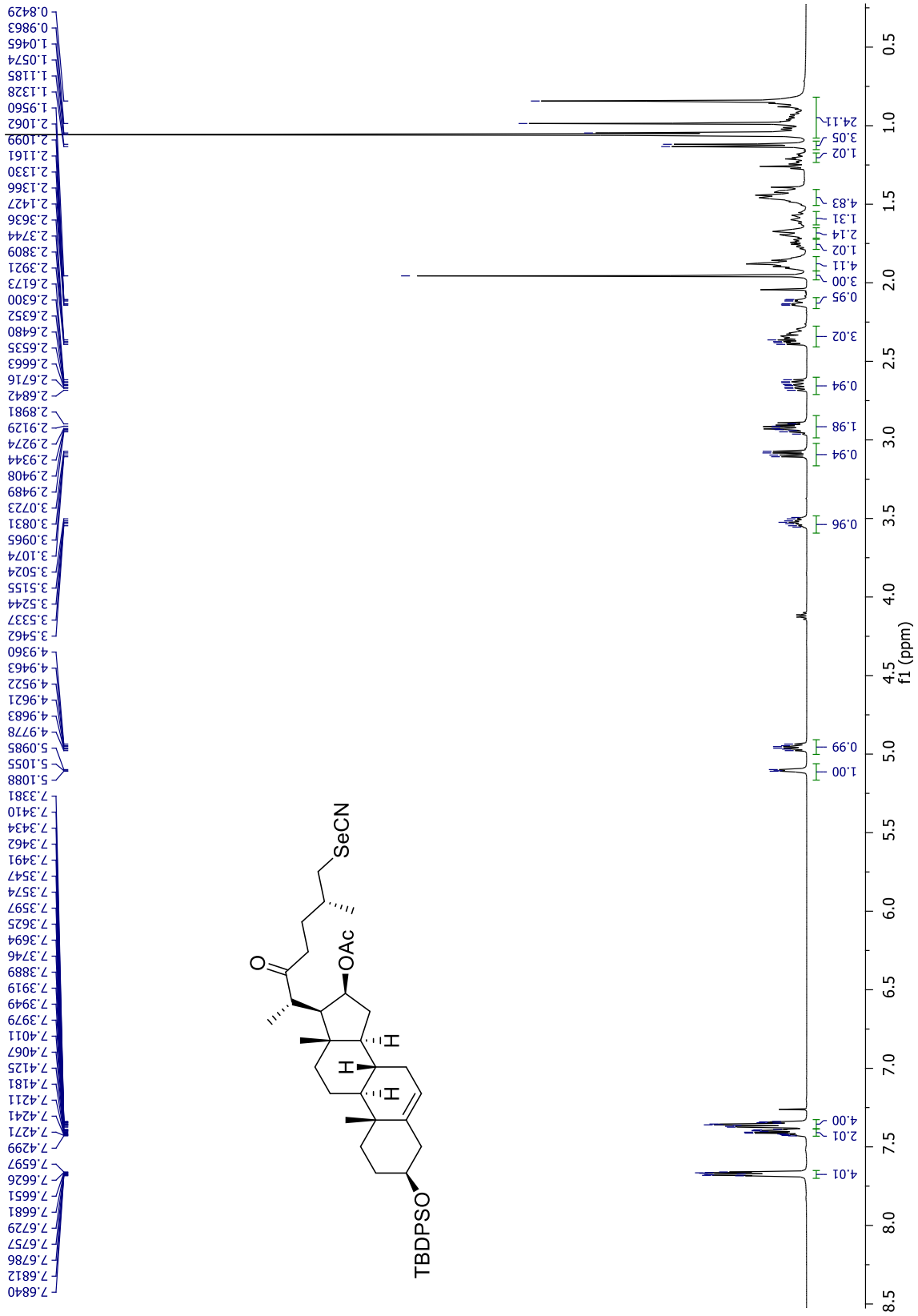
Espectro 45. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **30c**.



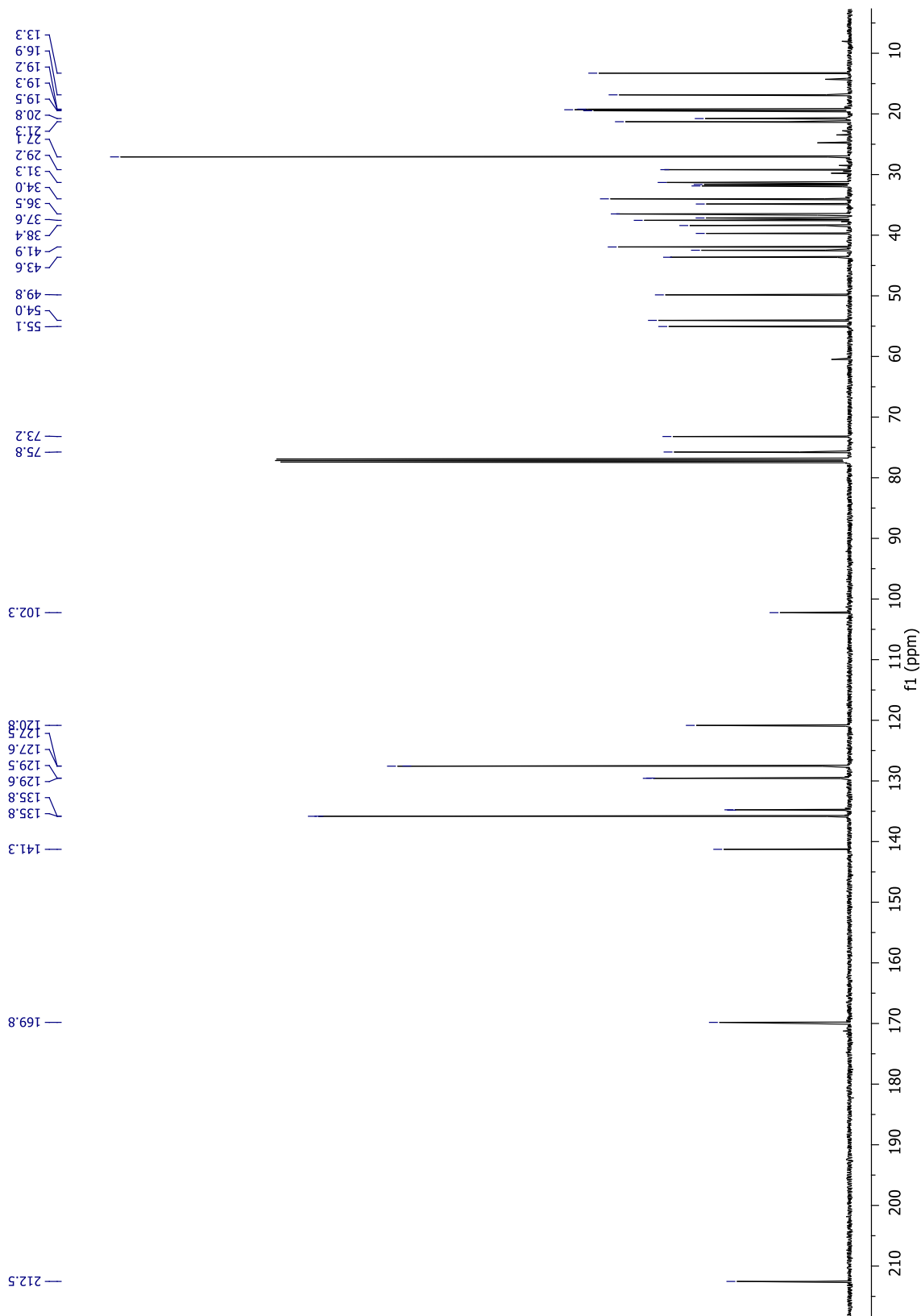
Espectro 47. RMN de ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) del derivado 33.



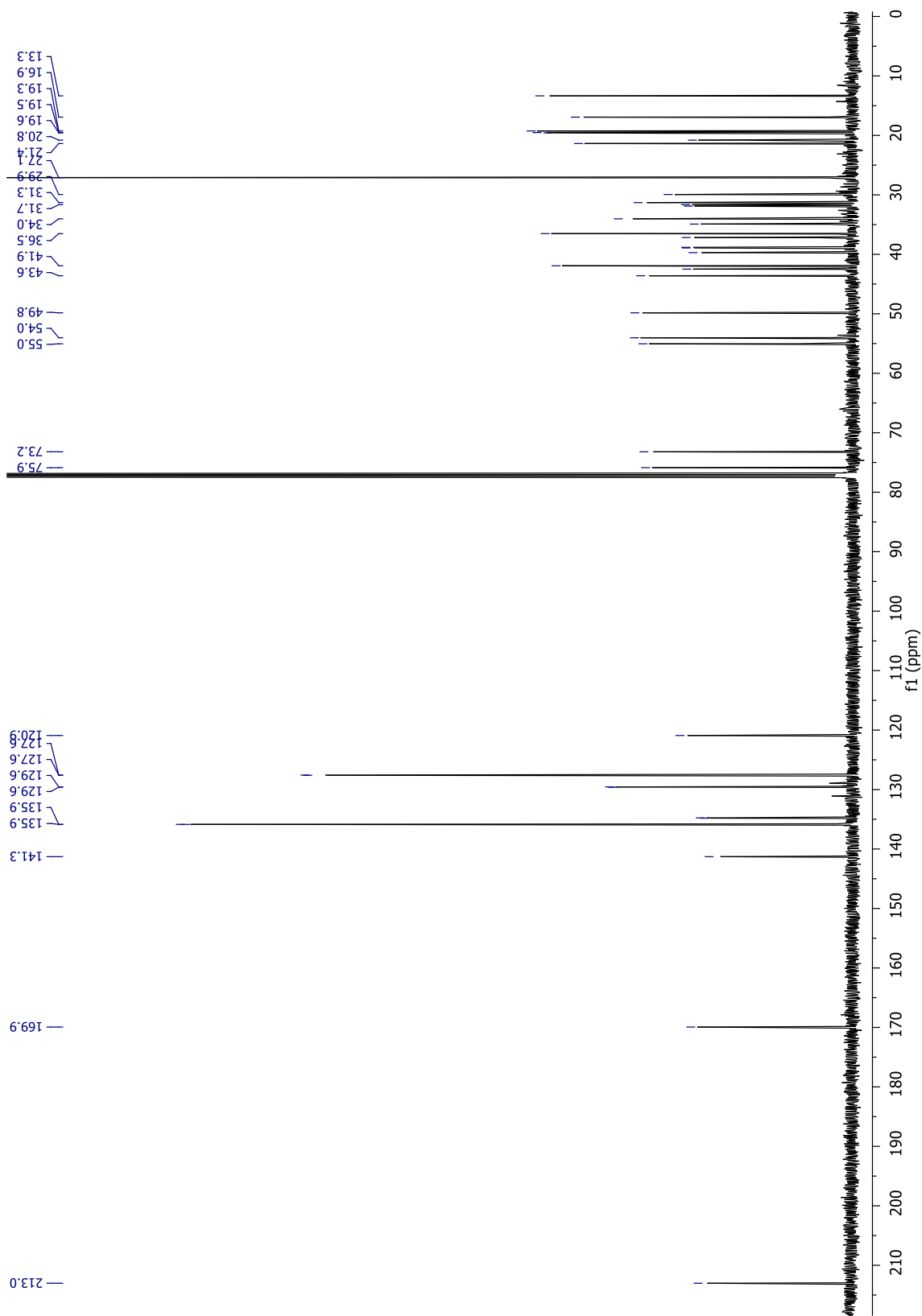
Espectro 49. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **34**.



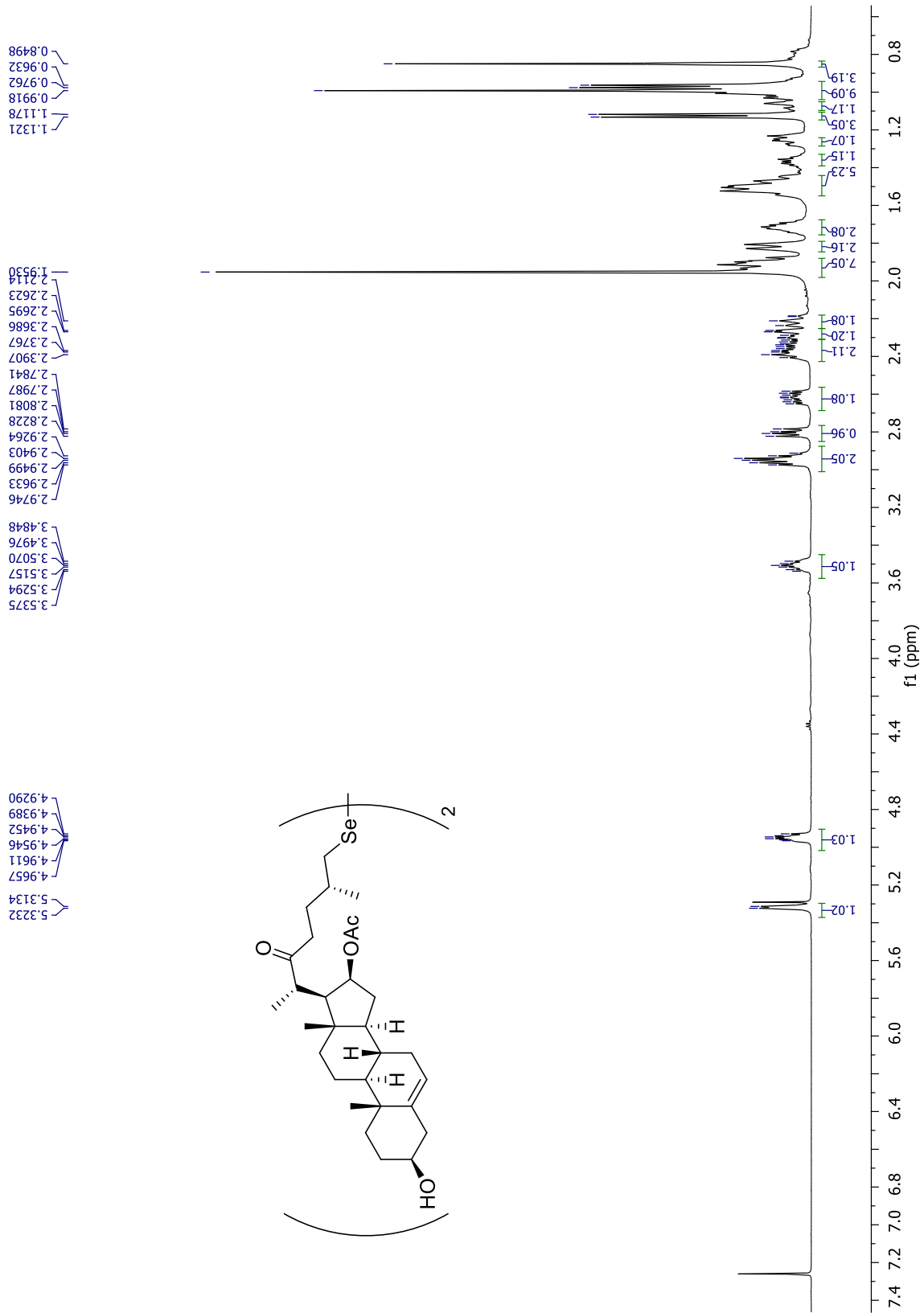
Espectro 50. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 35.



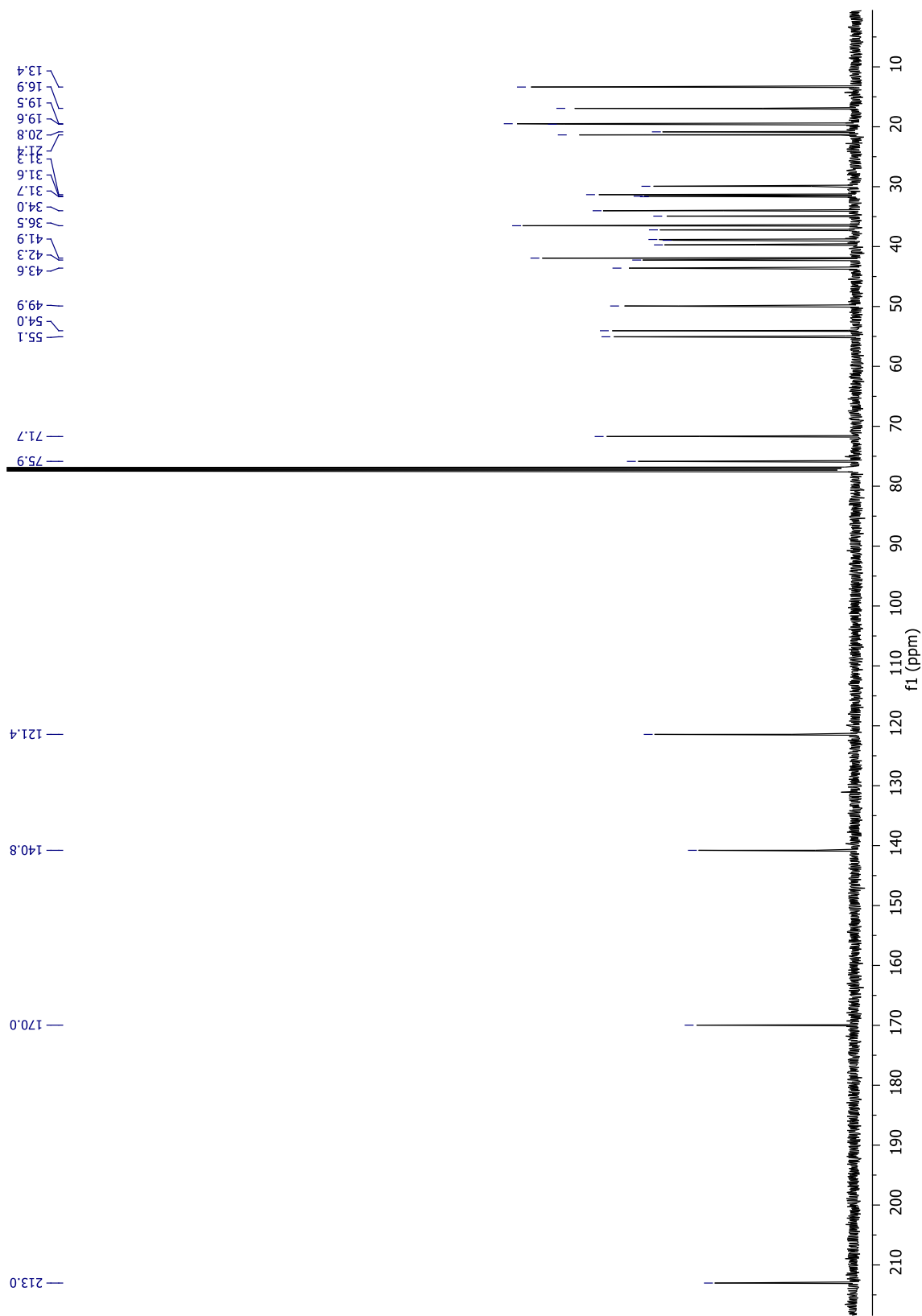
Espectro 51. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 35.



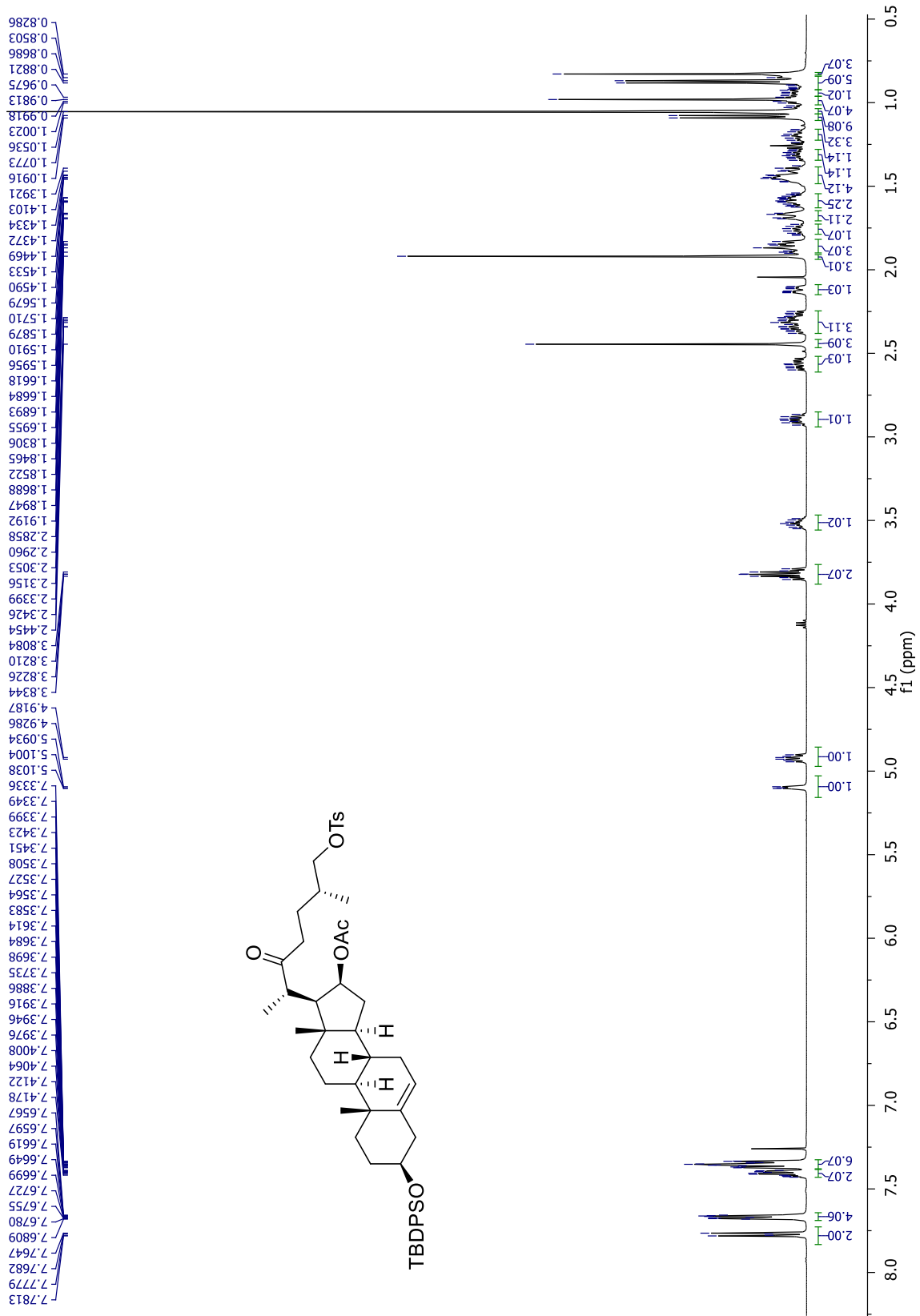
Espectro 53. RMN de ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) del derivado 36.



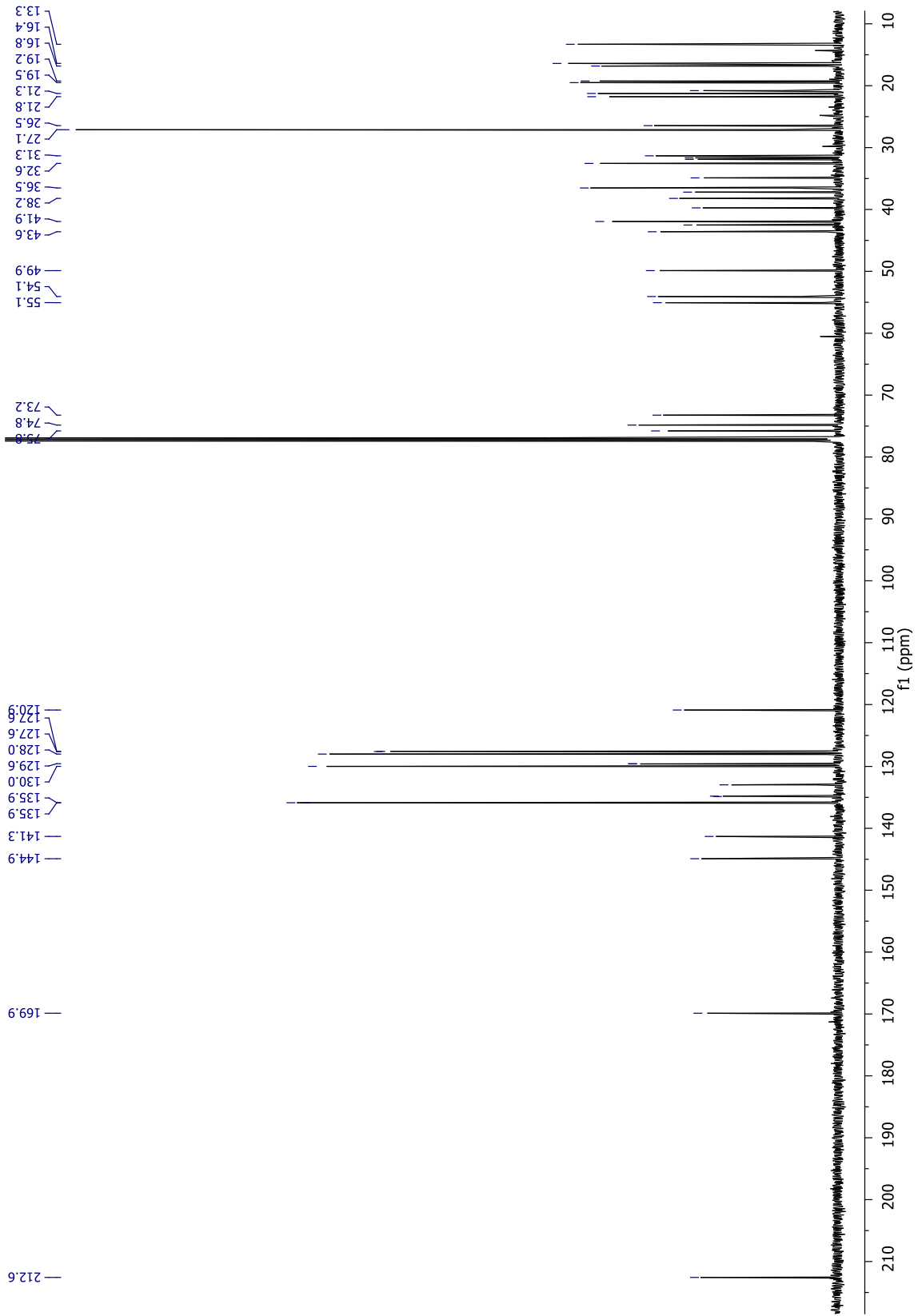
Espectro 54. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 37.



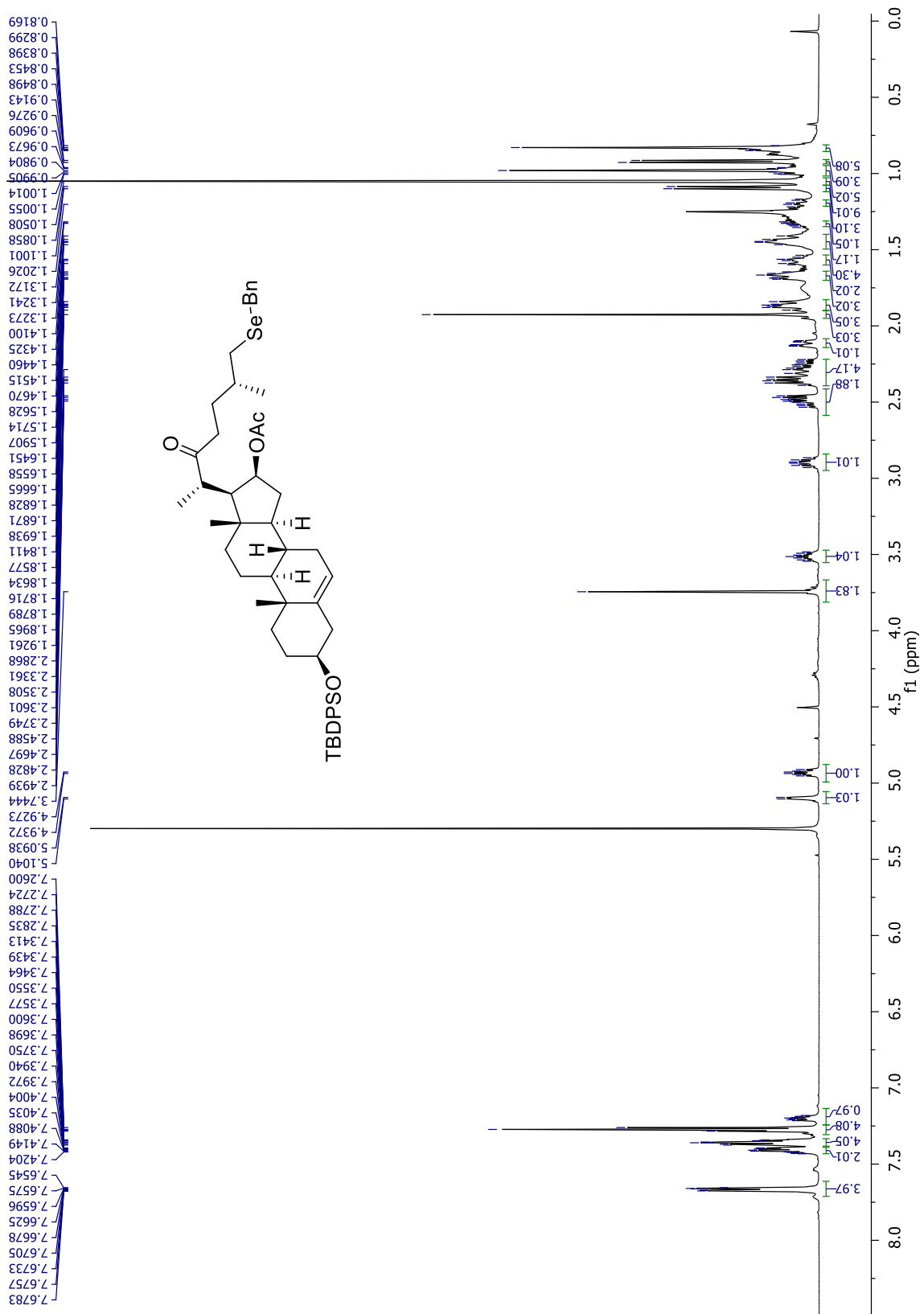
Espectro 55. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 37.



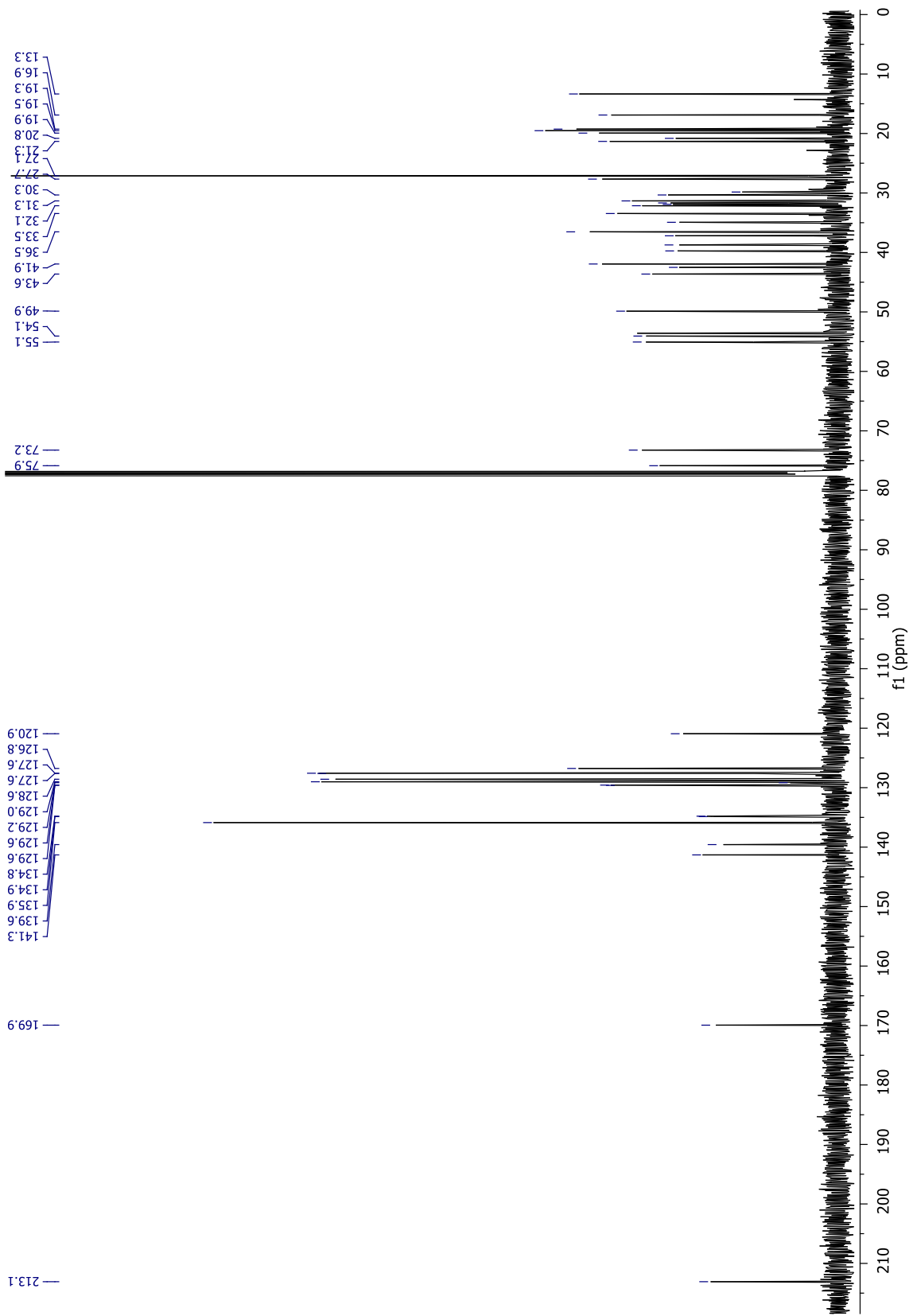
Espectro 56. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 38.



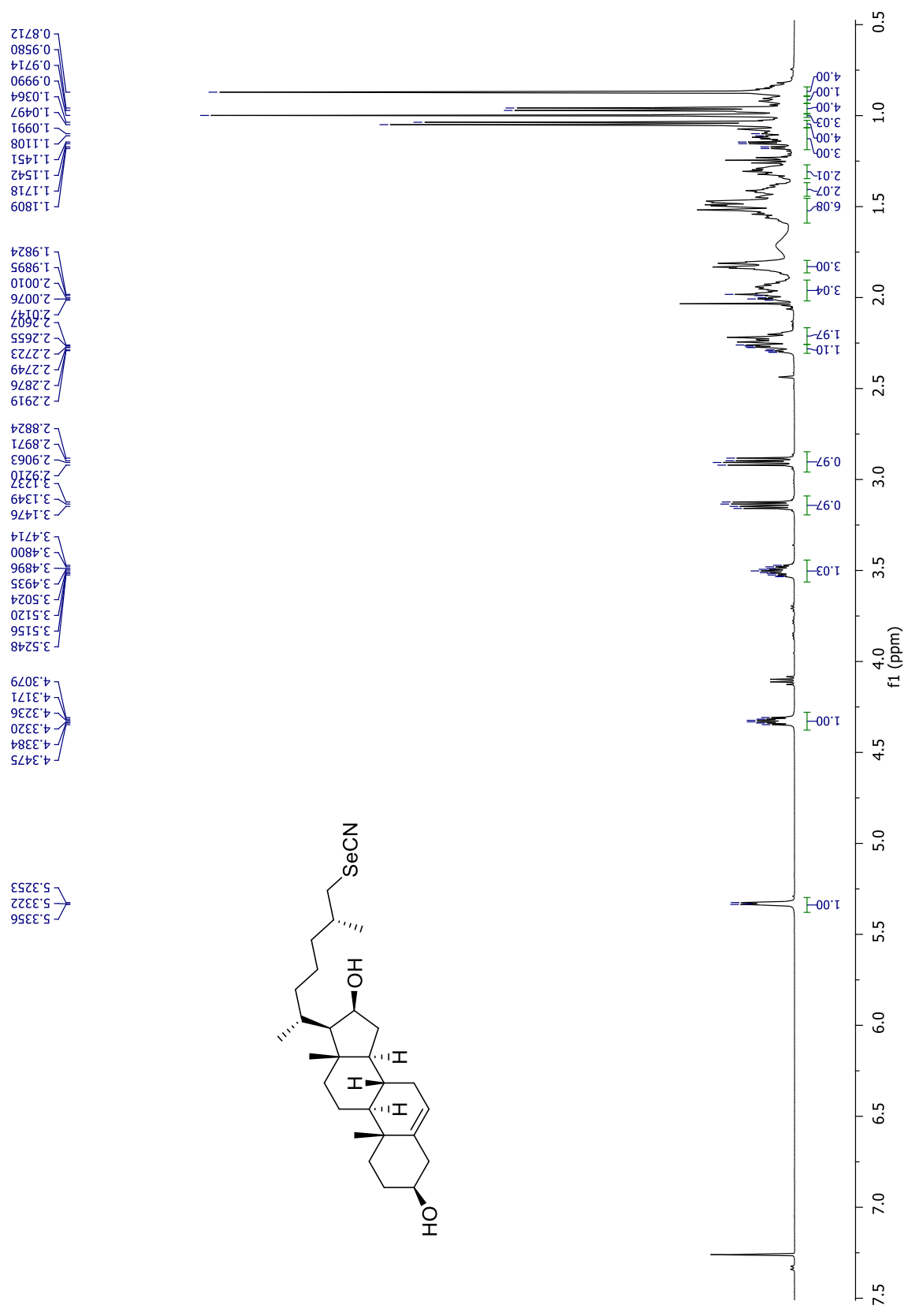
Espectro 57. RMN de ¹³C (125.7 MHz, CDCl₃) del derivado 38.



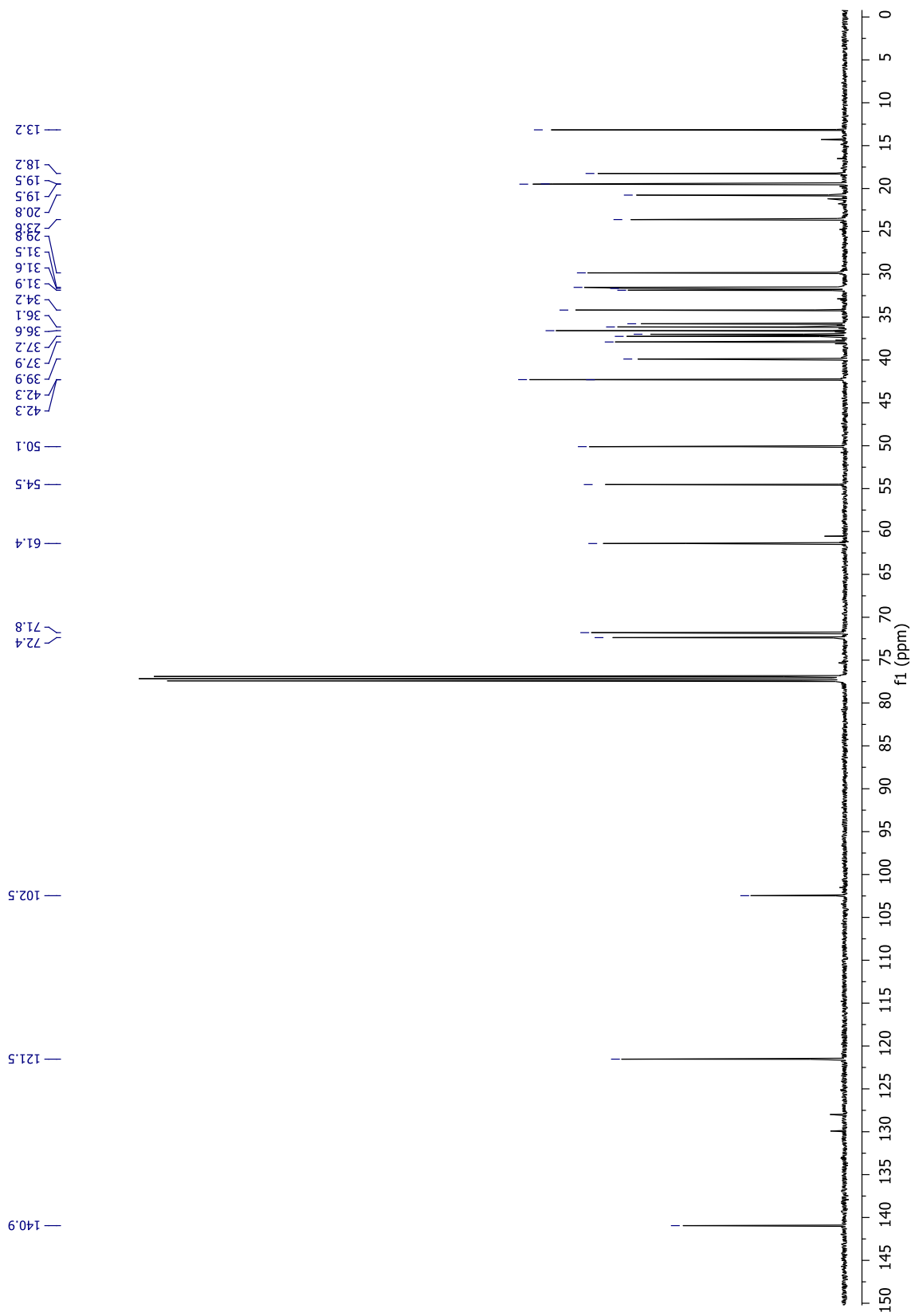
Espectro 58. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 39.



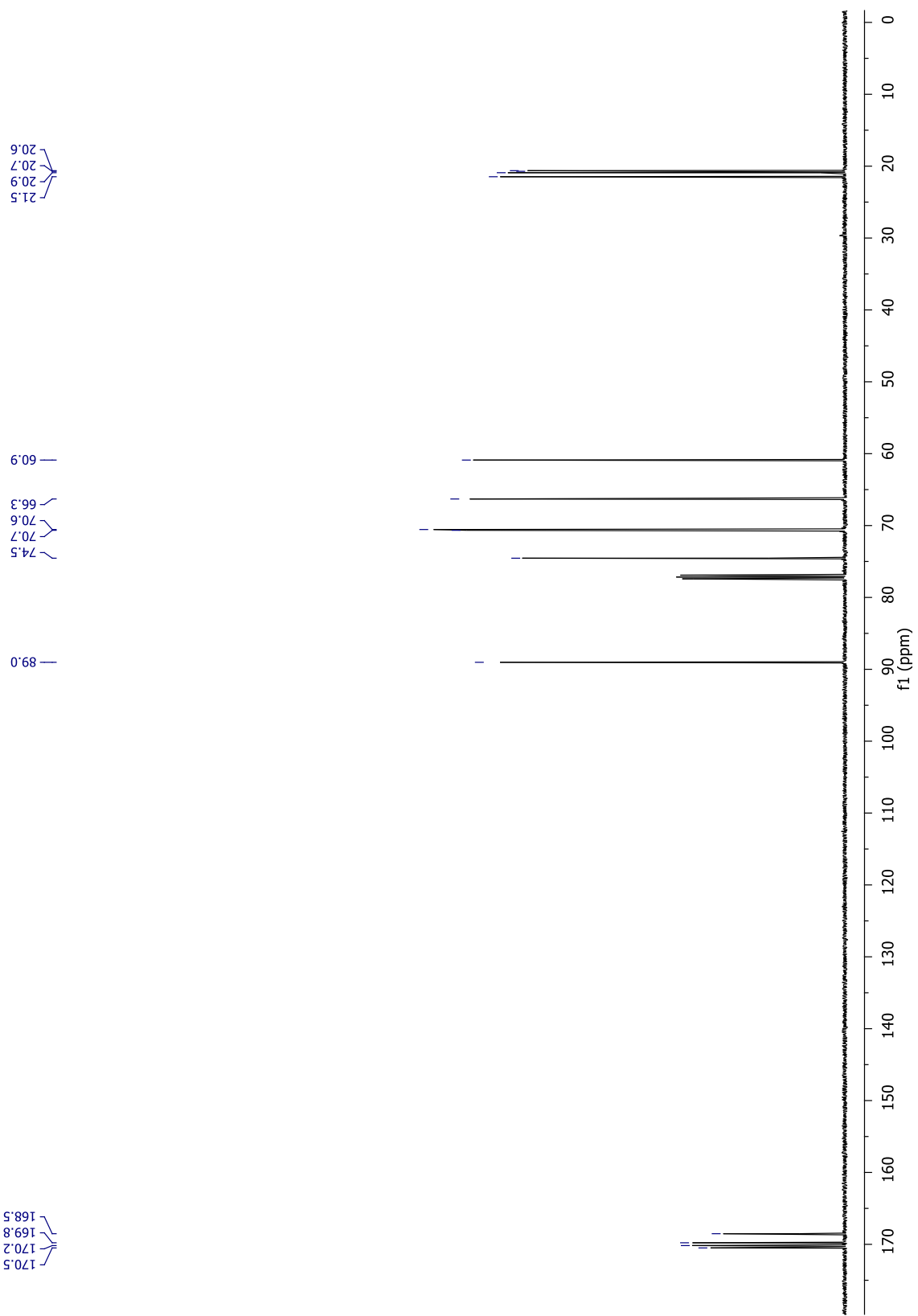
Espectro 59. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 39.



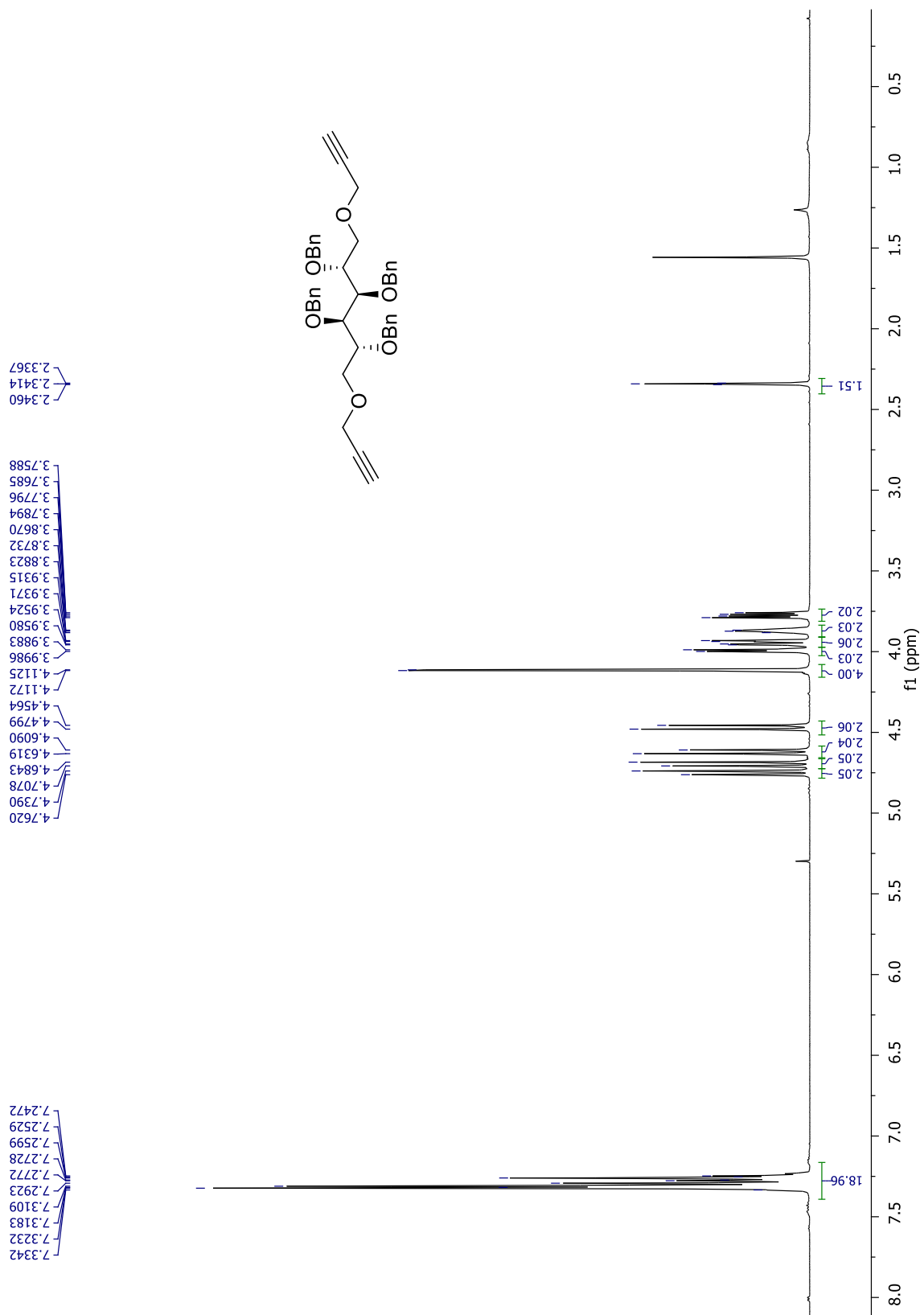
Espectro 60. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 42.



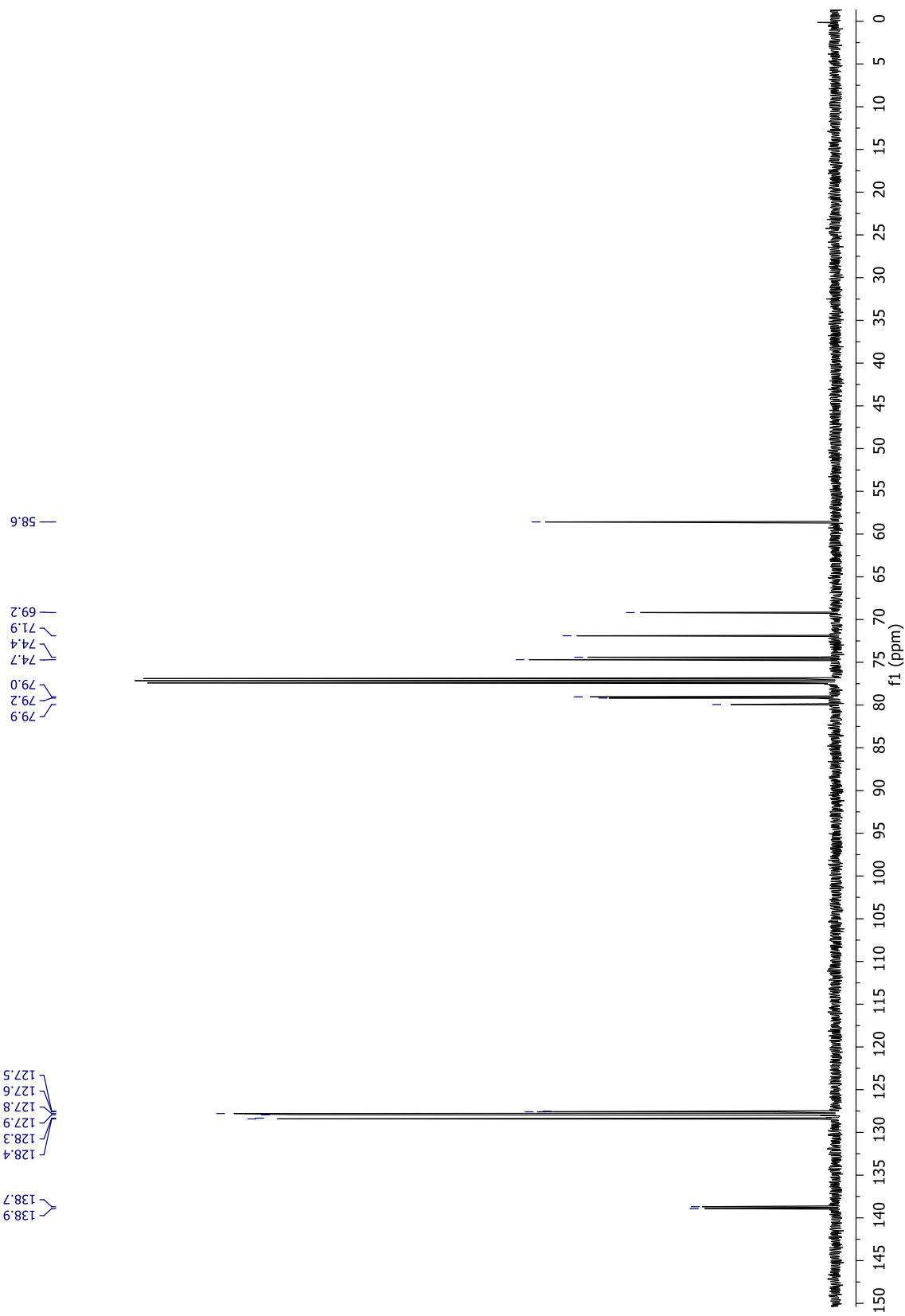
Espectro 61. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 42.



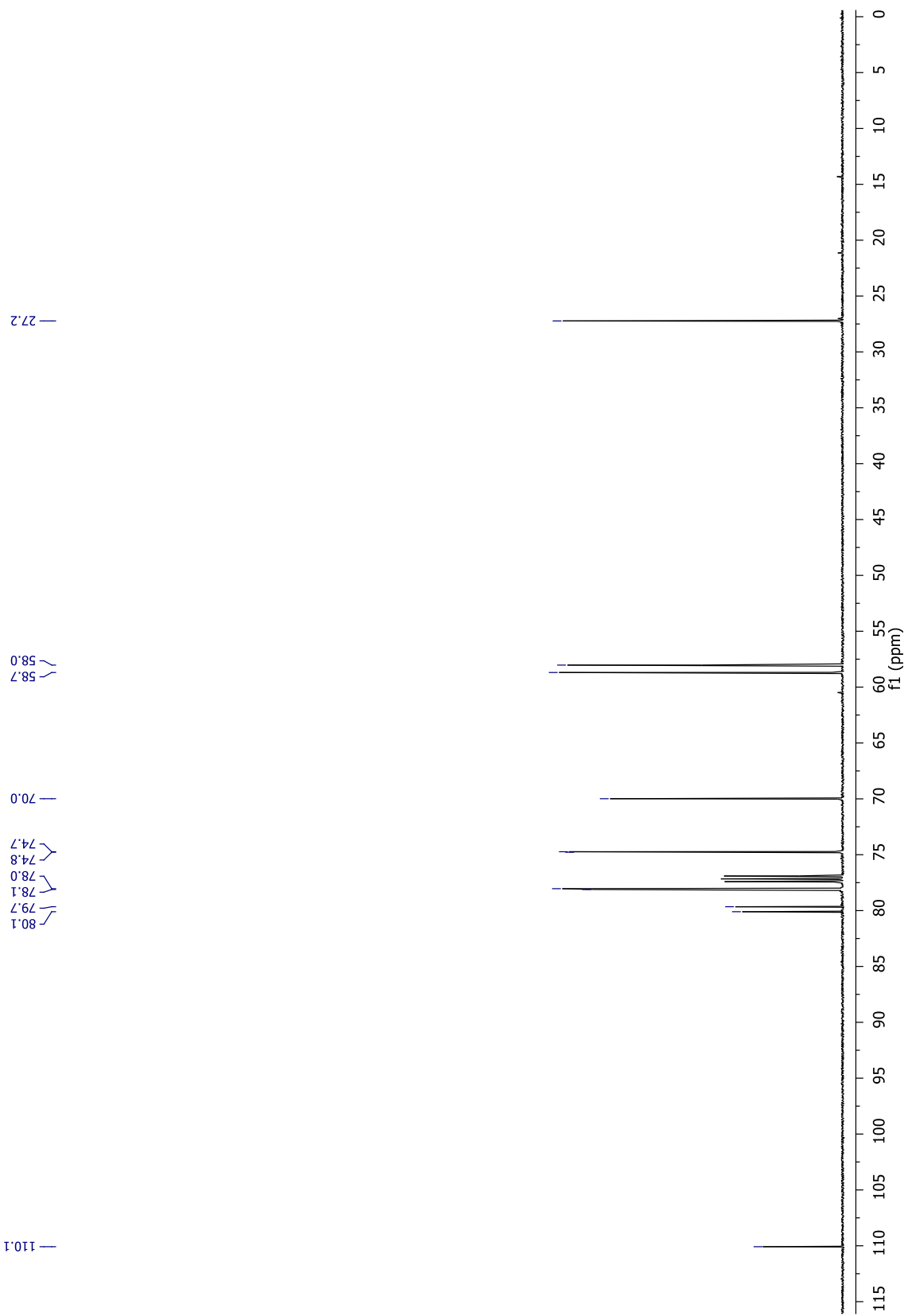
Espectro 63. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 49.



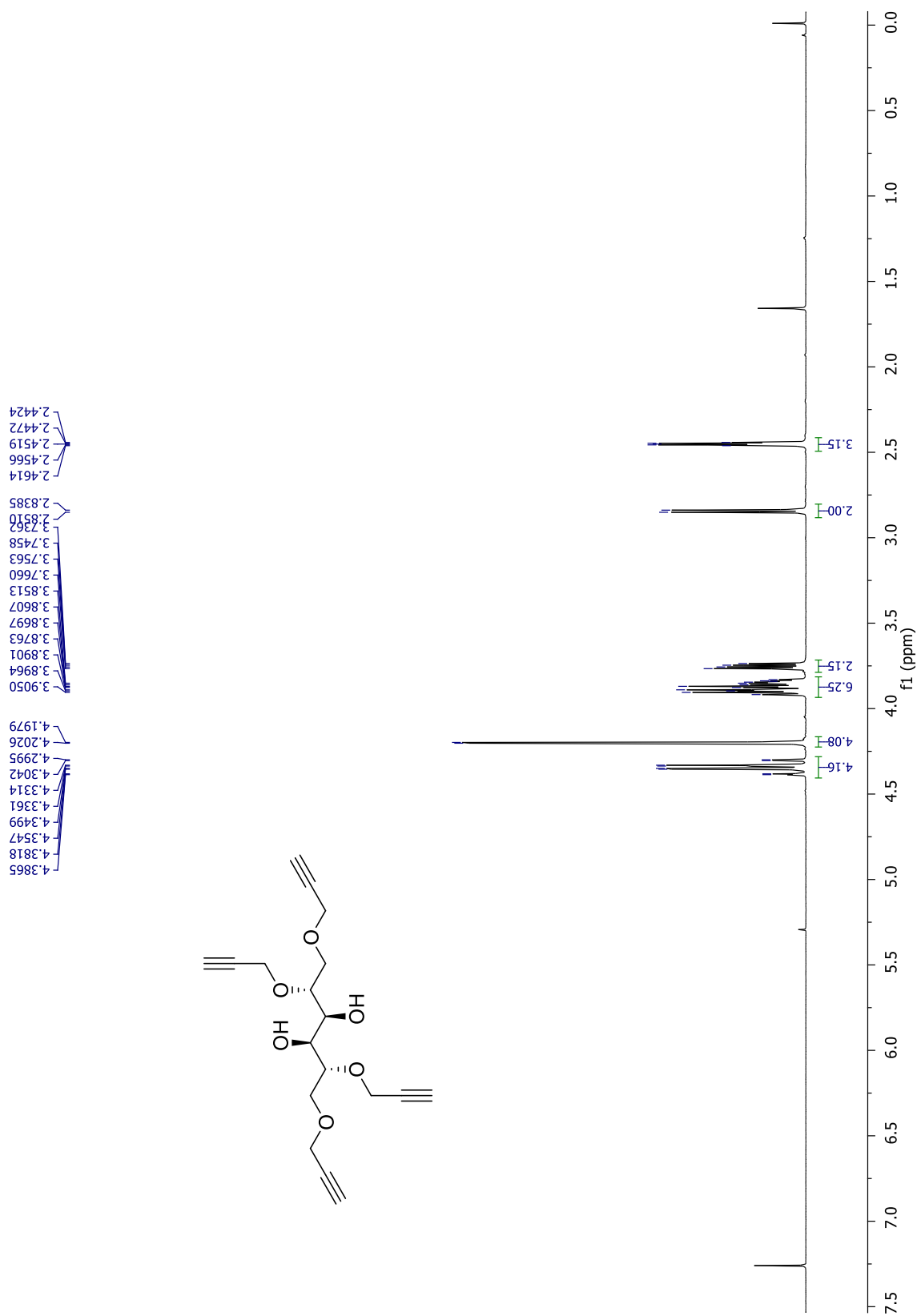
Espectro 64. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 57.



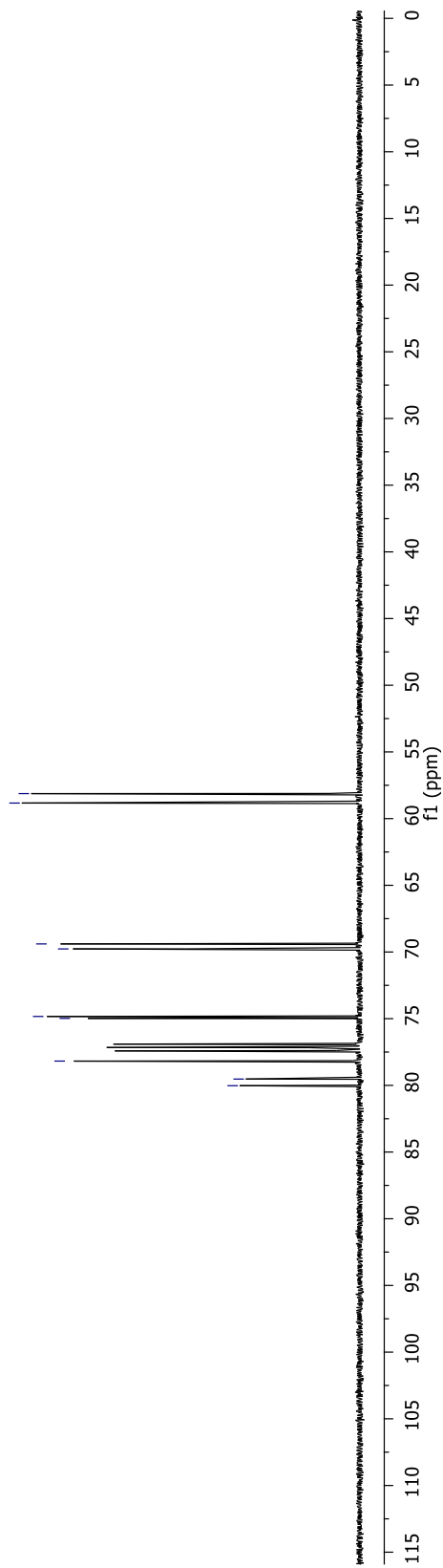
Espectro 65. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 57.



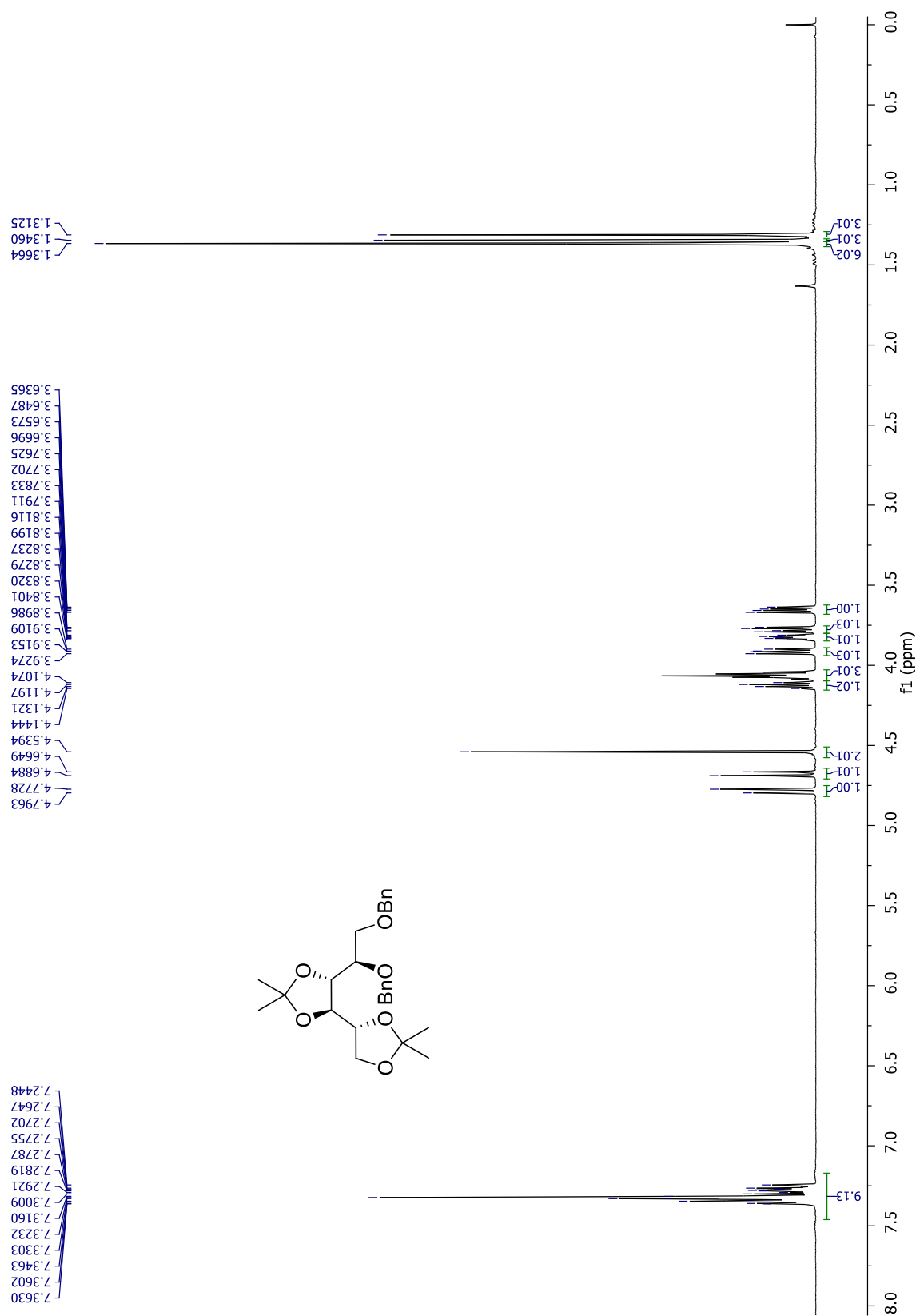
Espectro 67. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **61**.

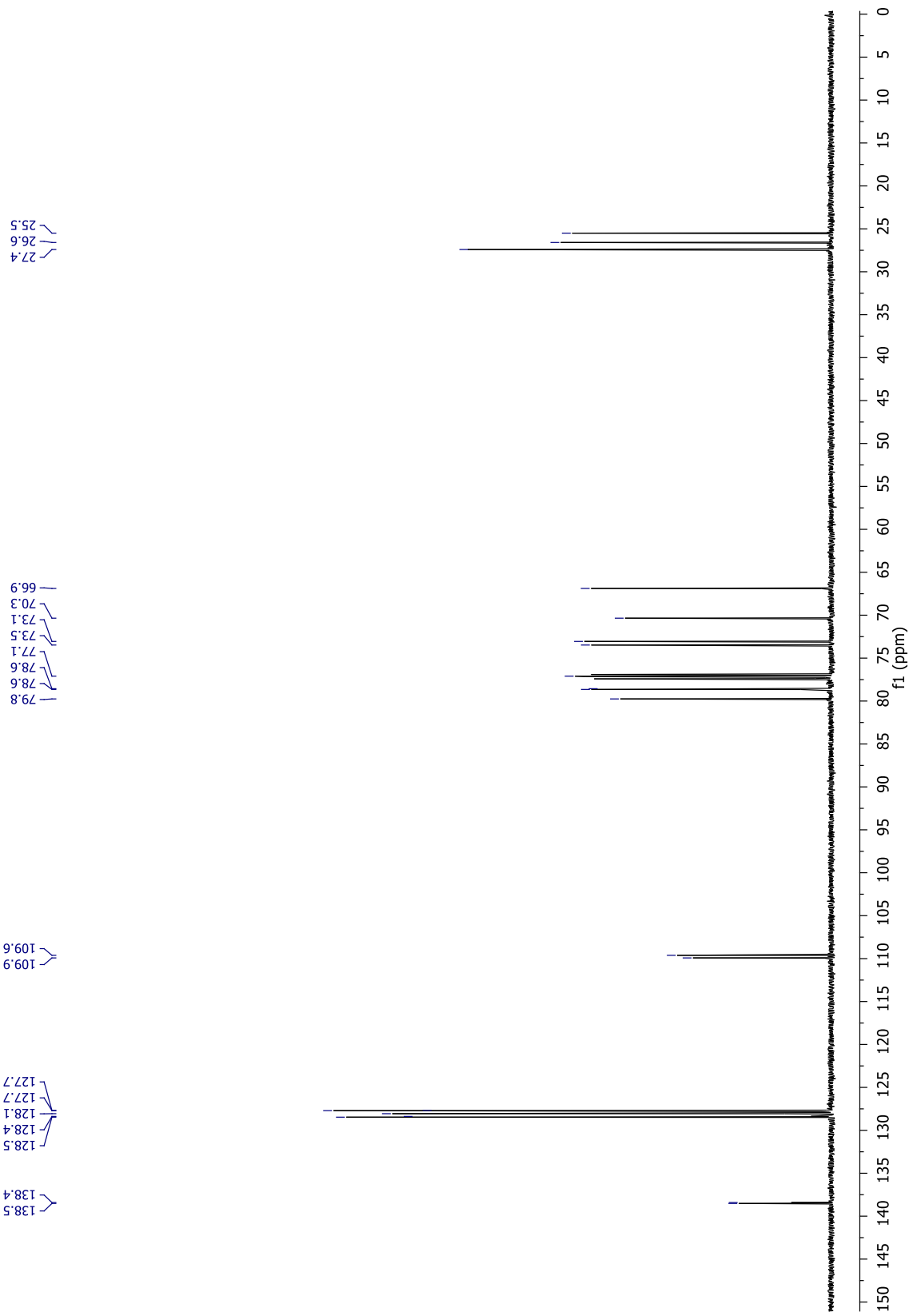


58.1
58.8
69.4
69.8
74.8
75.0
78.2
79.5
80.0

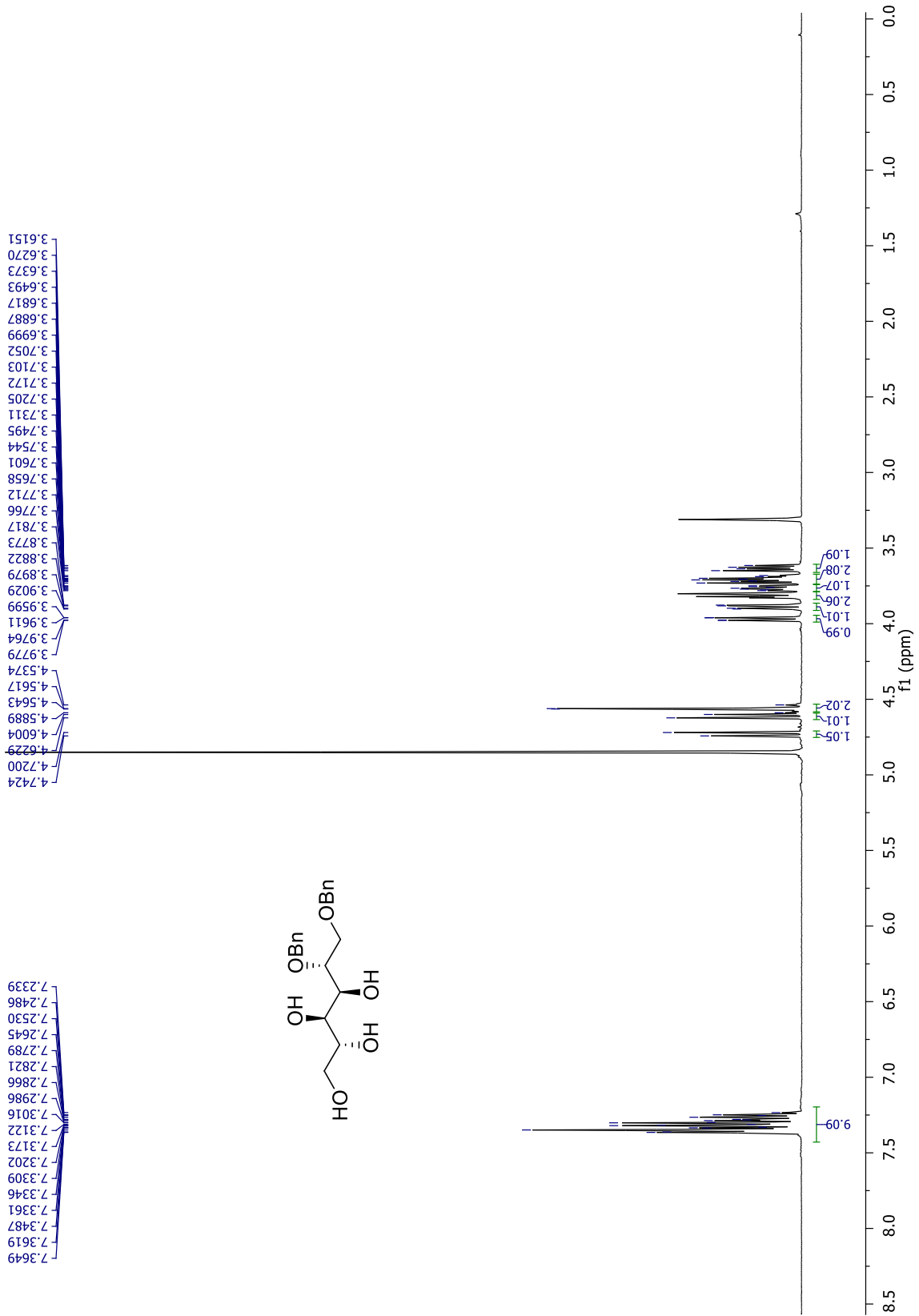


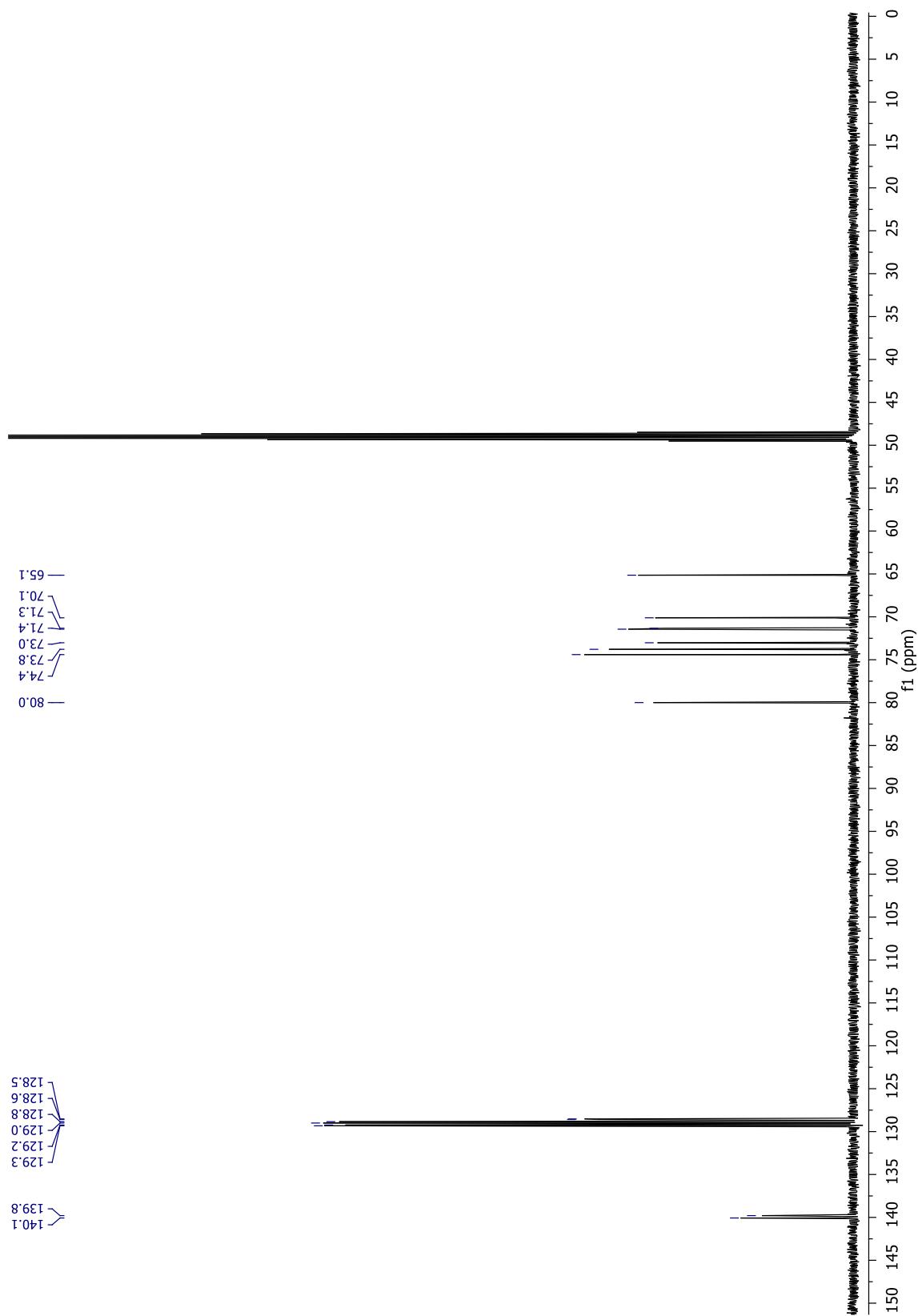
Espectro 69. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **62**.



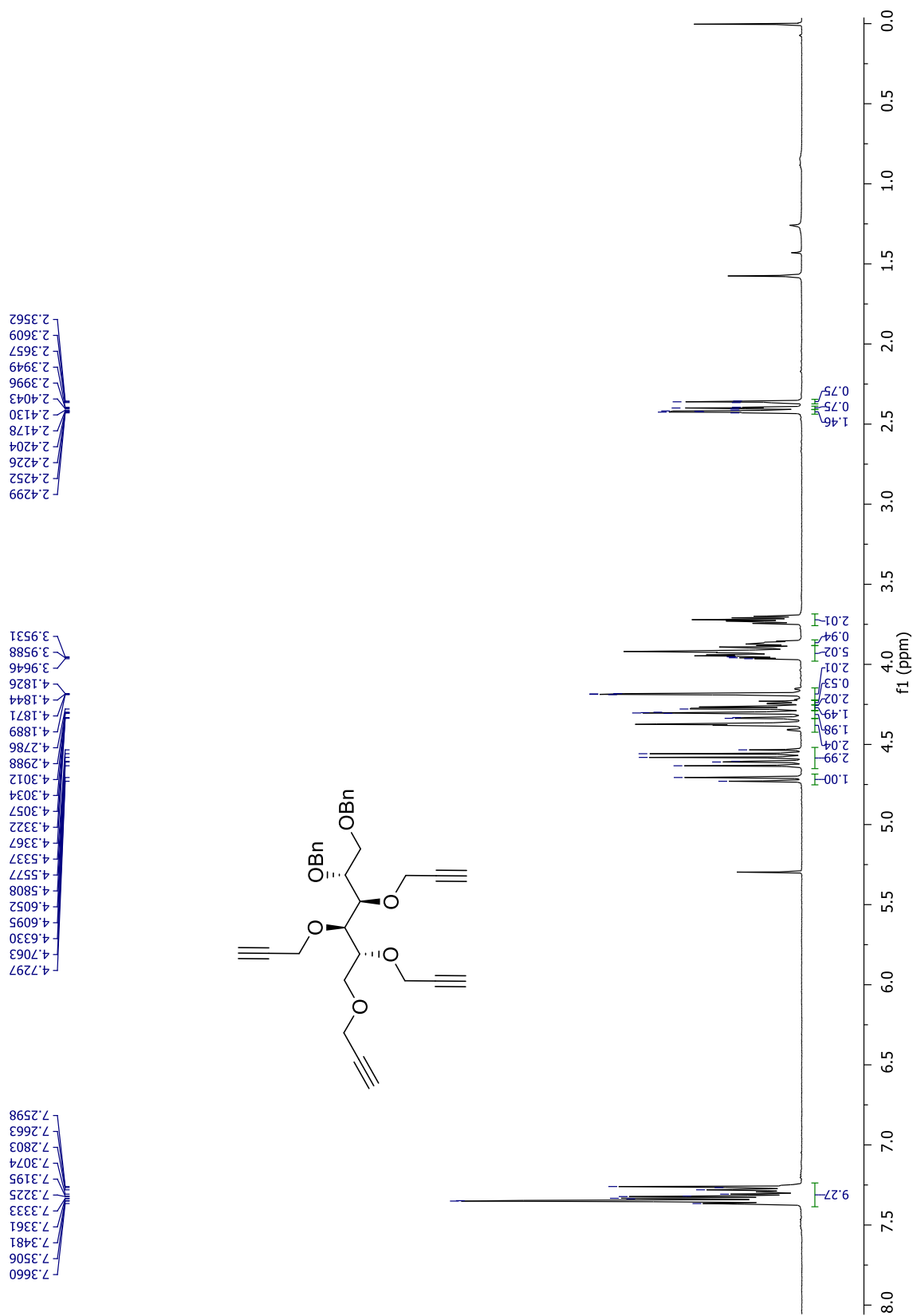


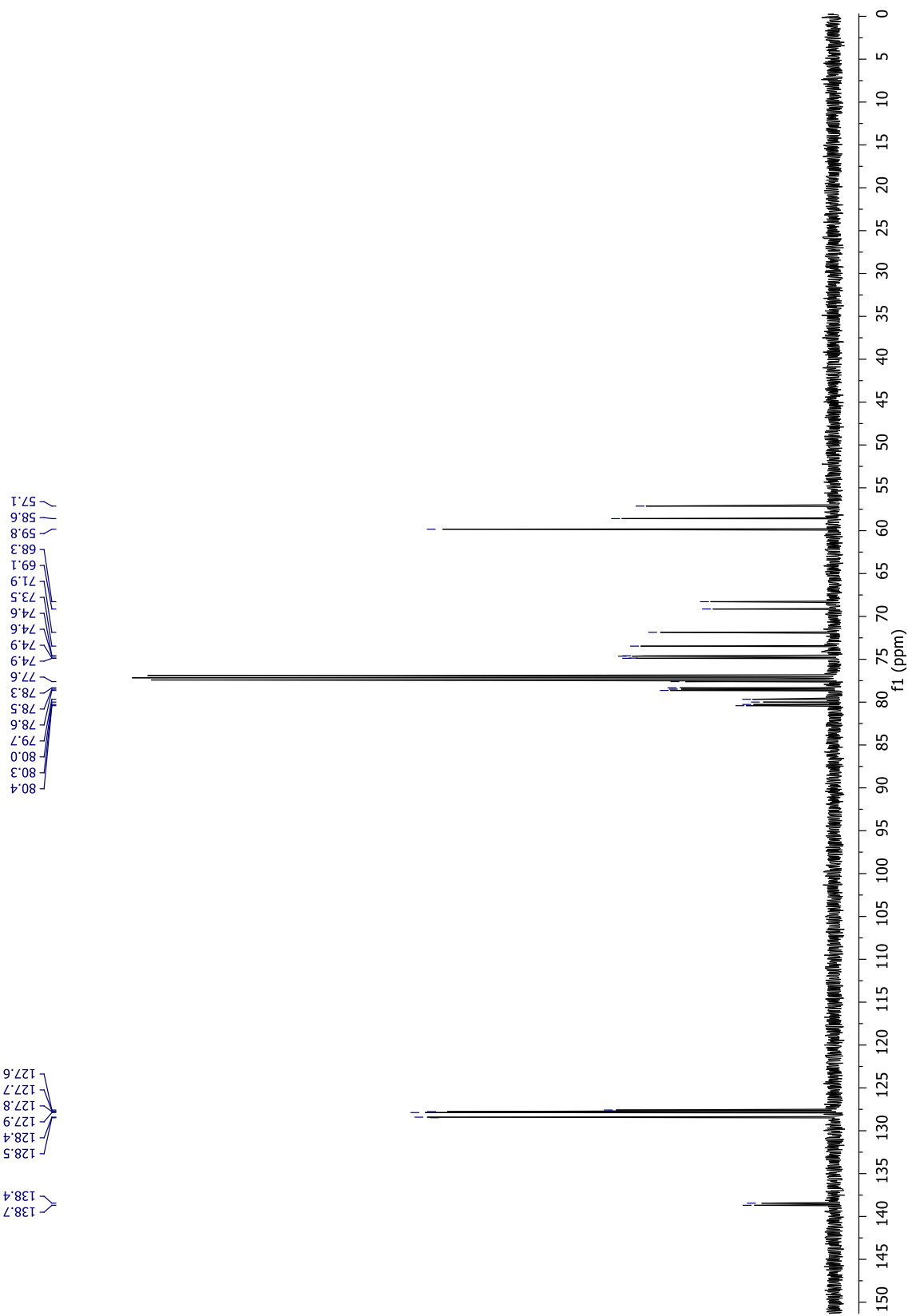
Espectro 71. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 63.



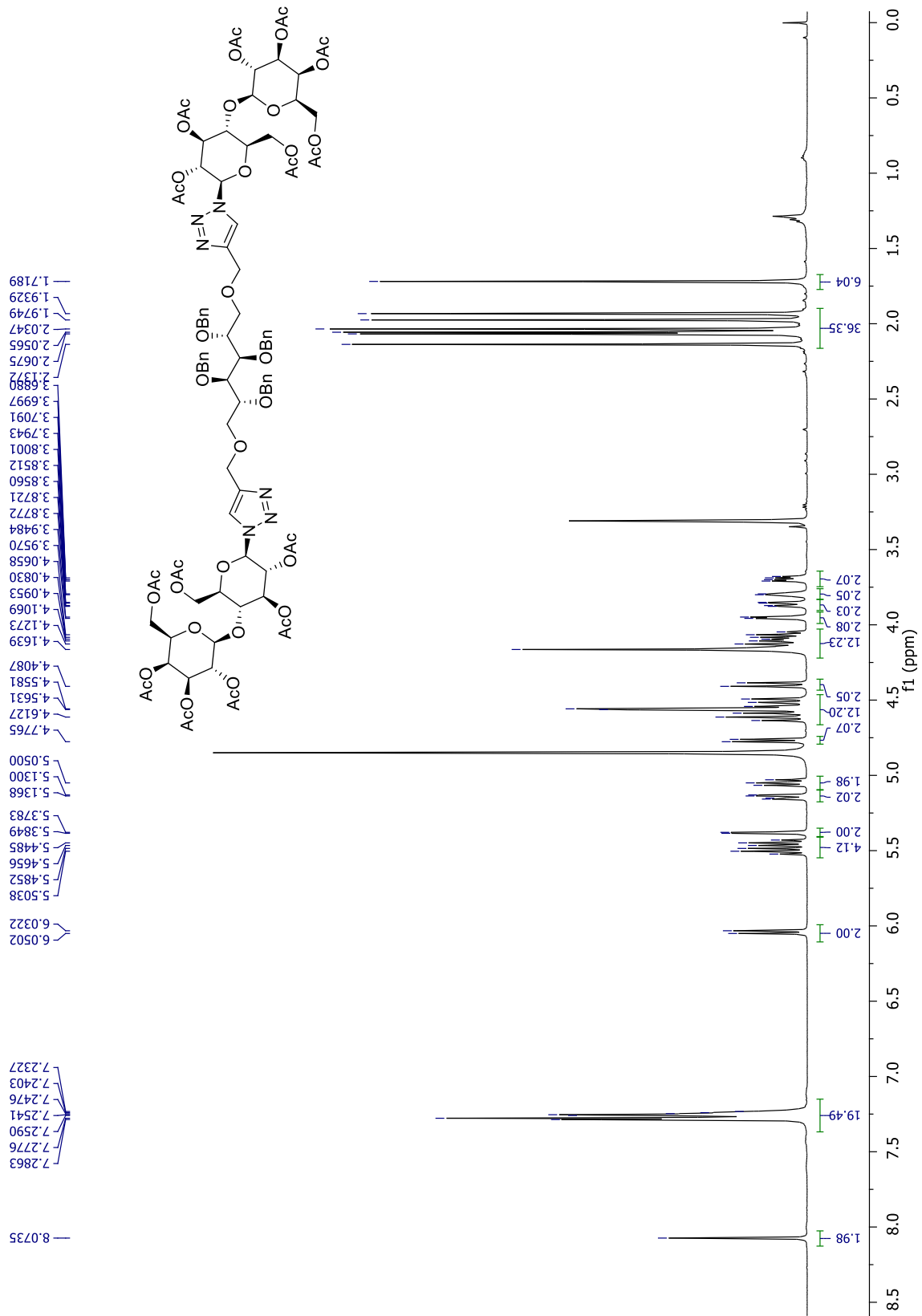


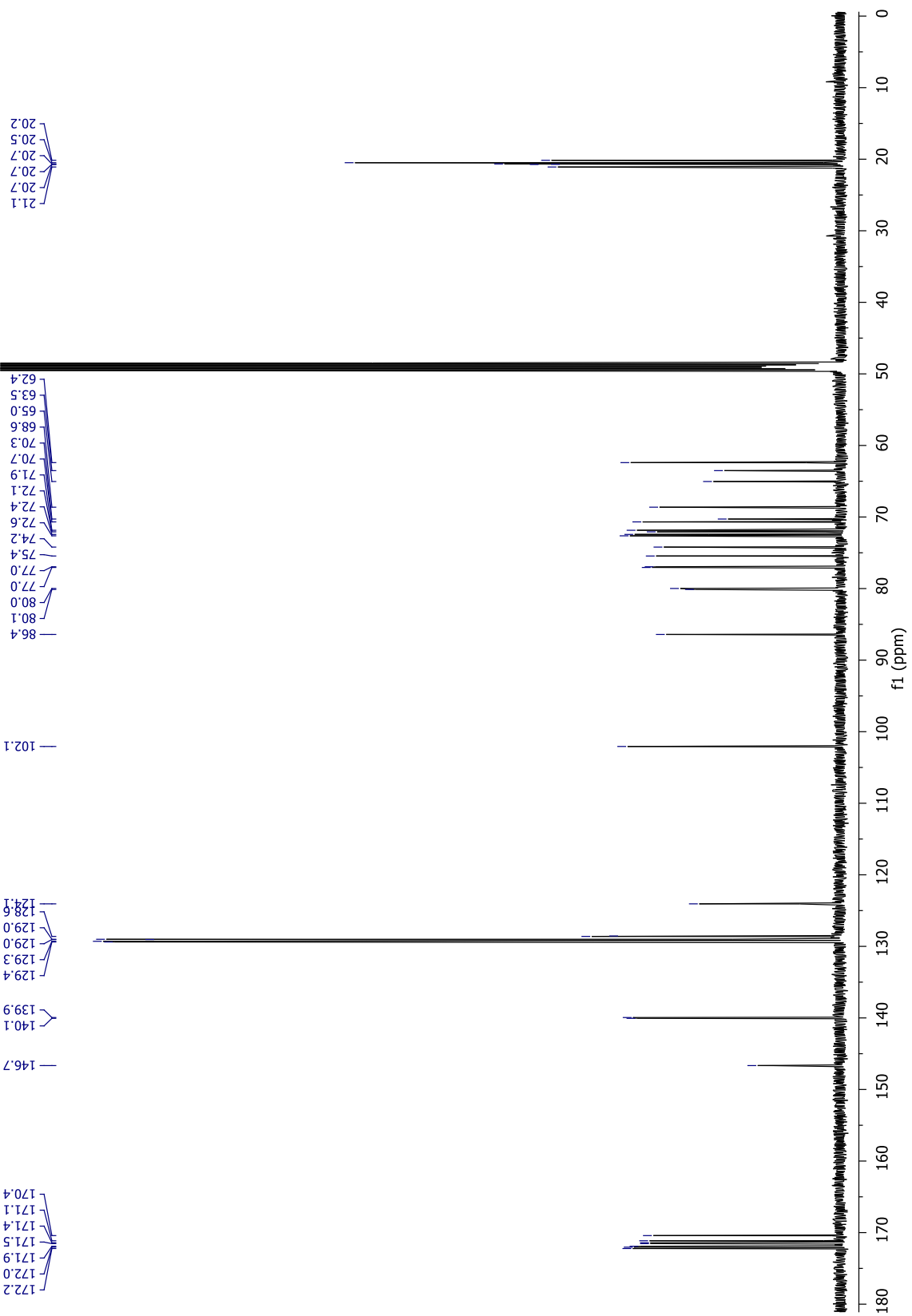
Espectro 73. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado 64.



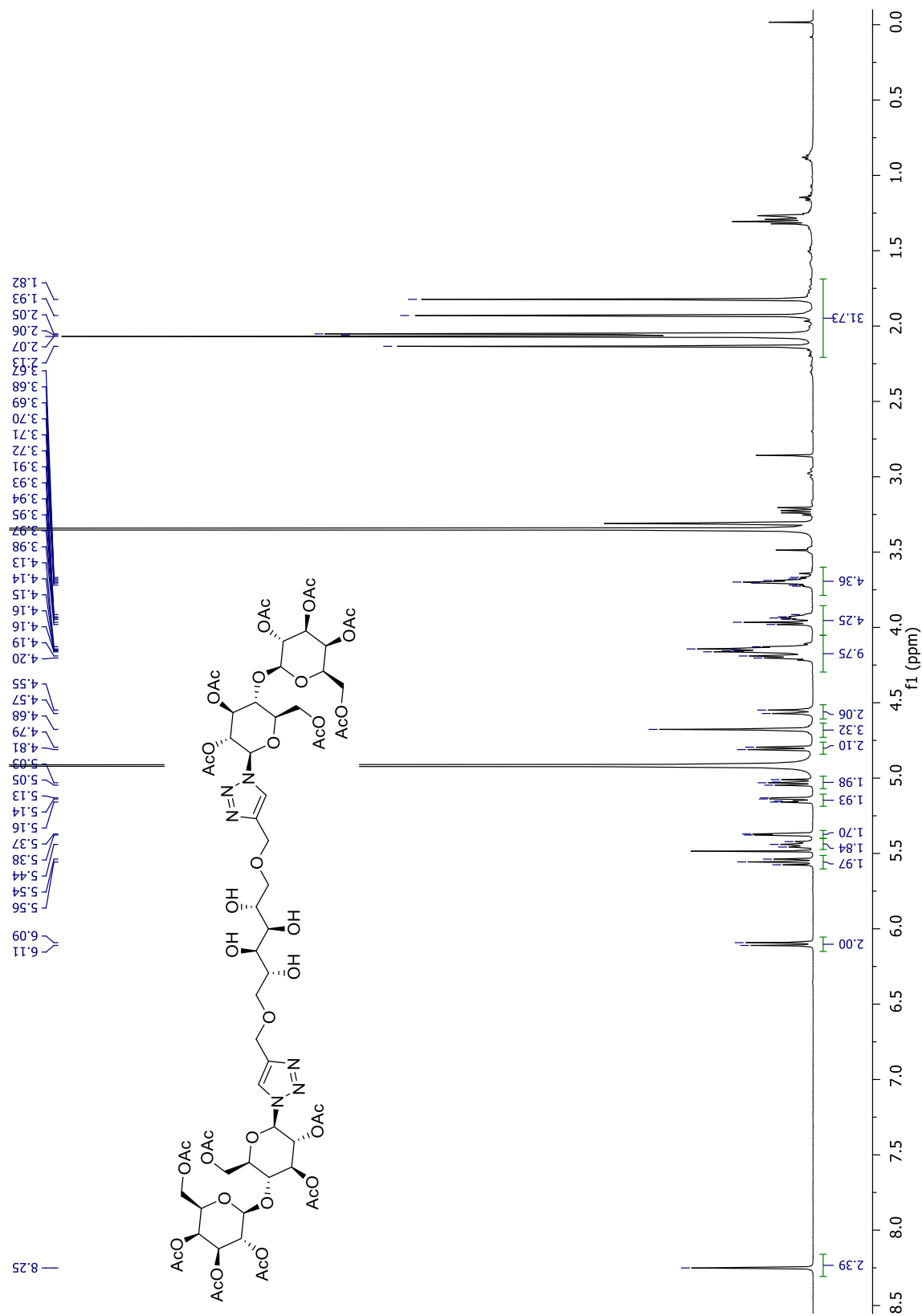


Espectro 75. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 65.

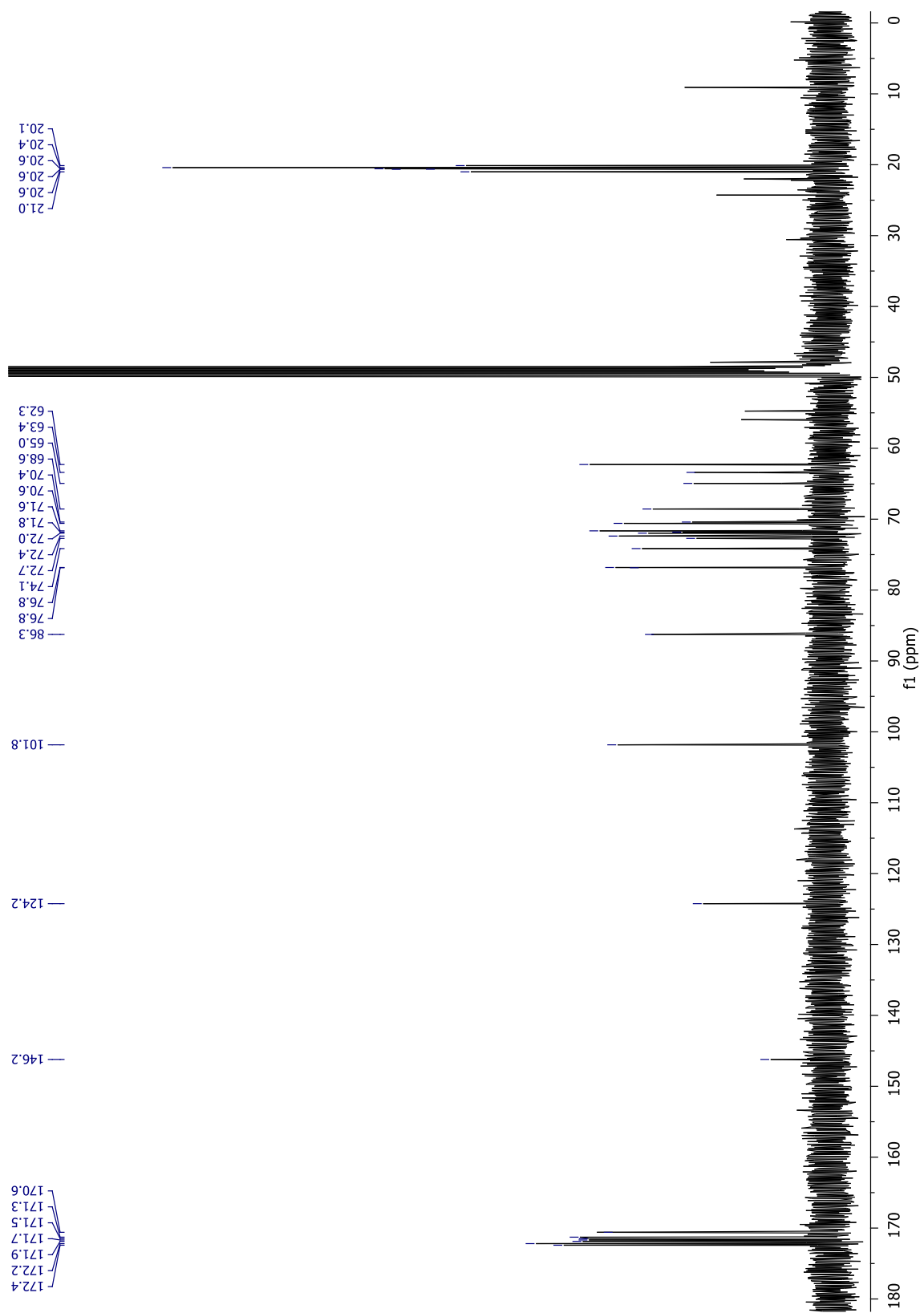




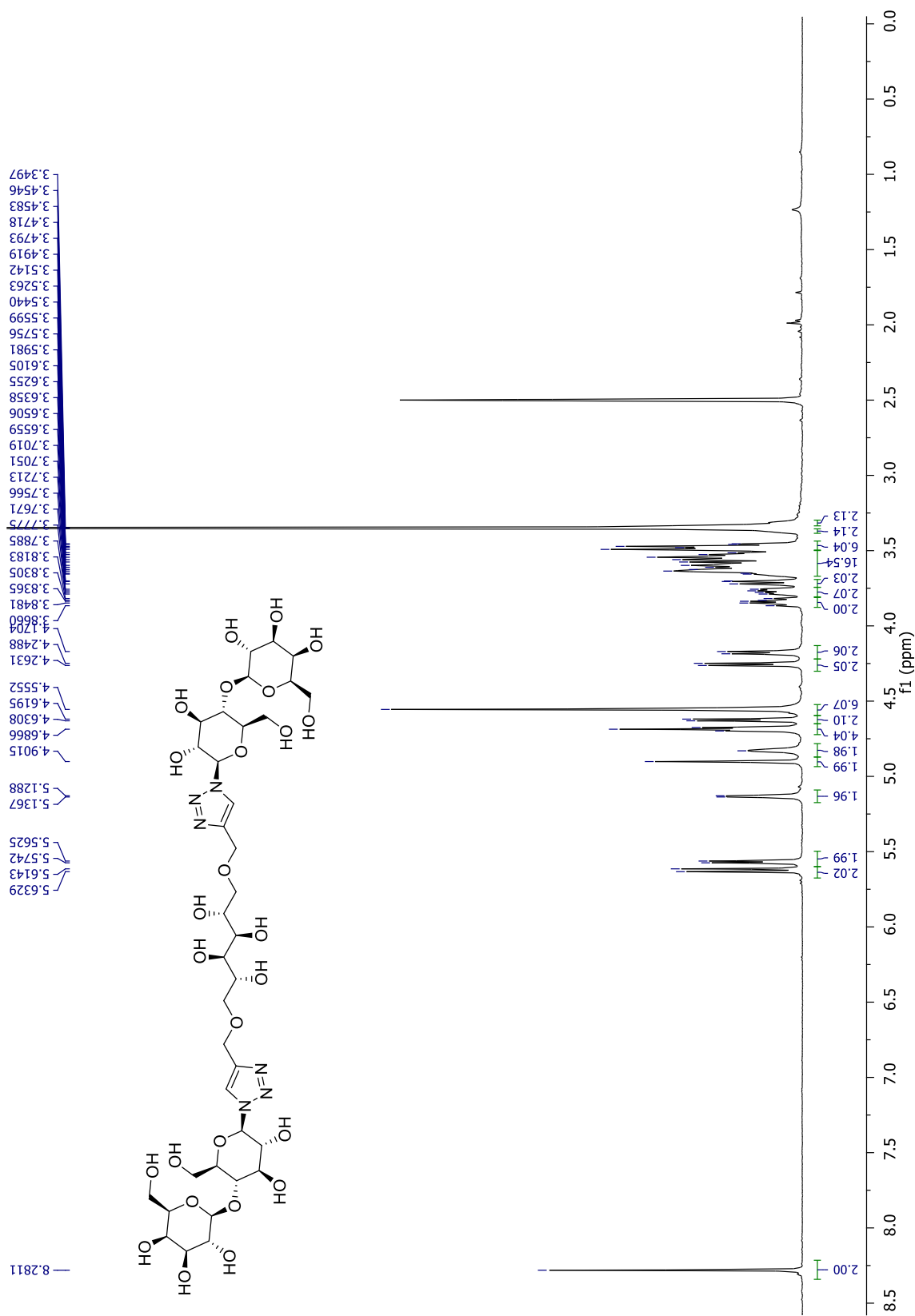
Espectro 77. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado 66.

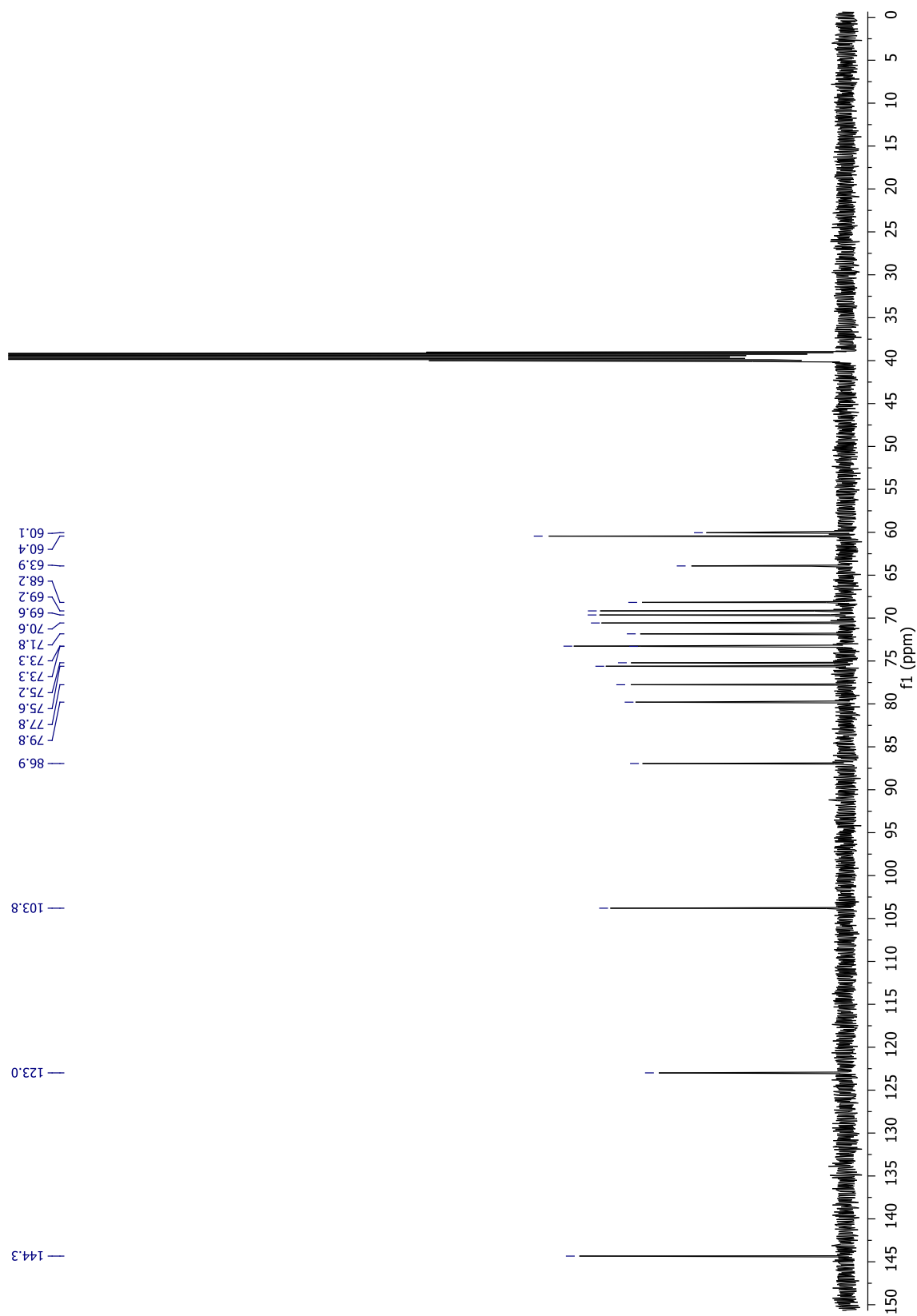


Espectro 78. RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) del derivado 67.

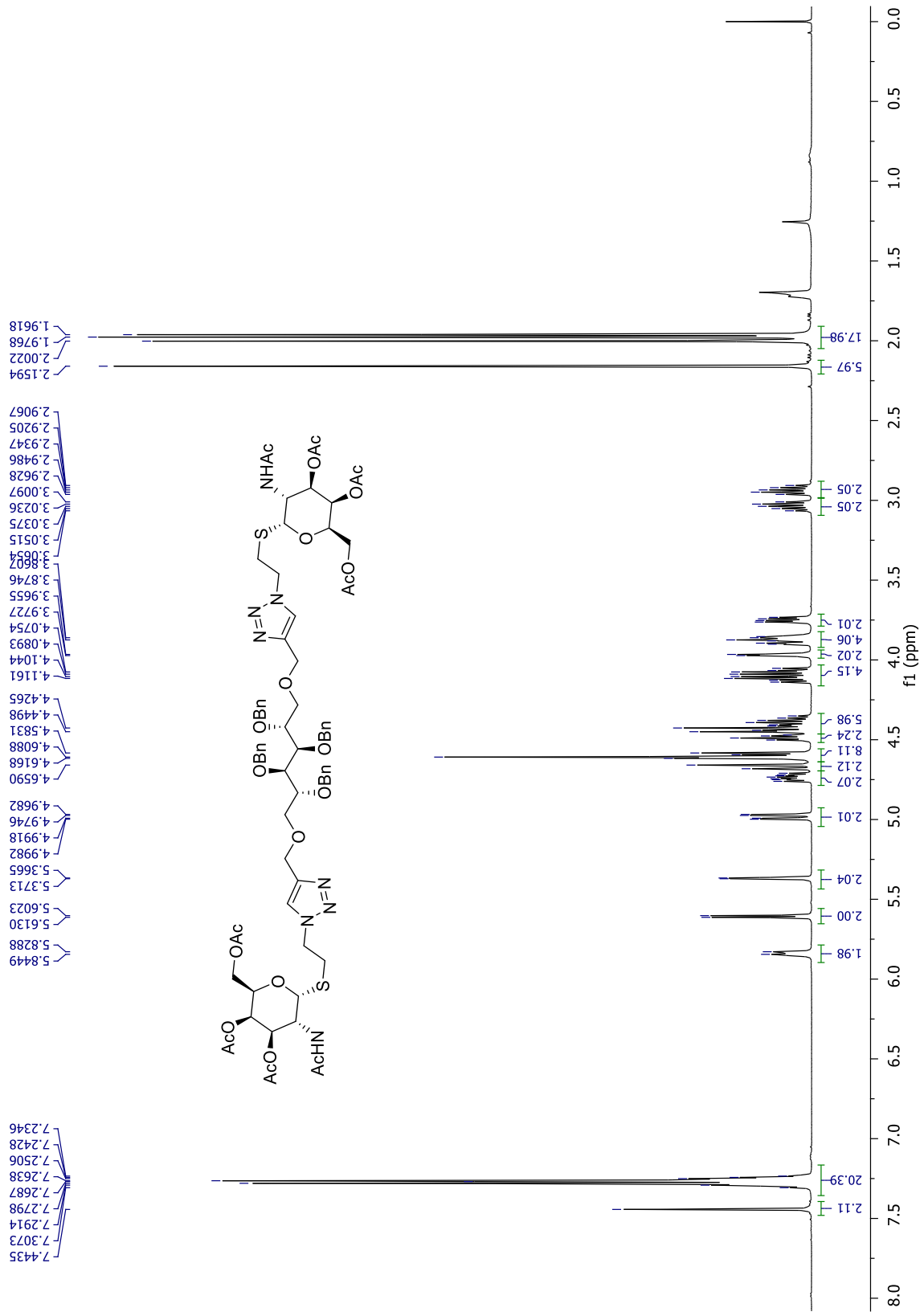


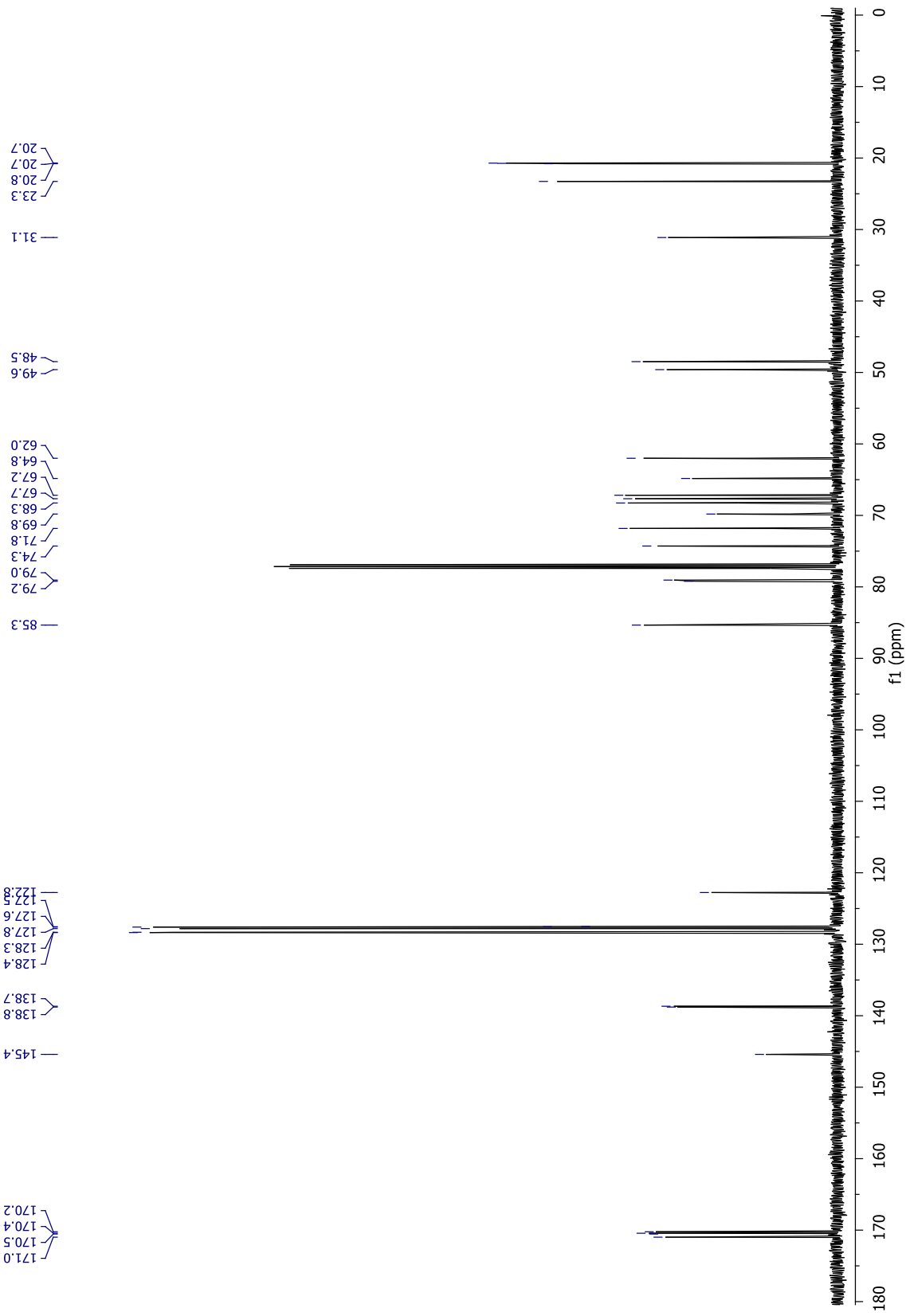
Espectro 79. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CD_3OD) del derivado 67.



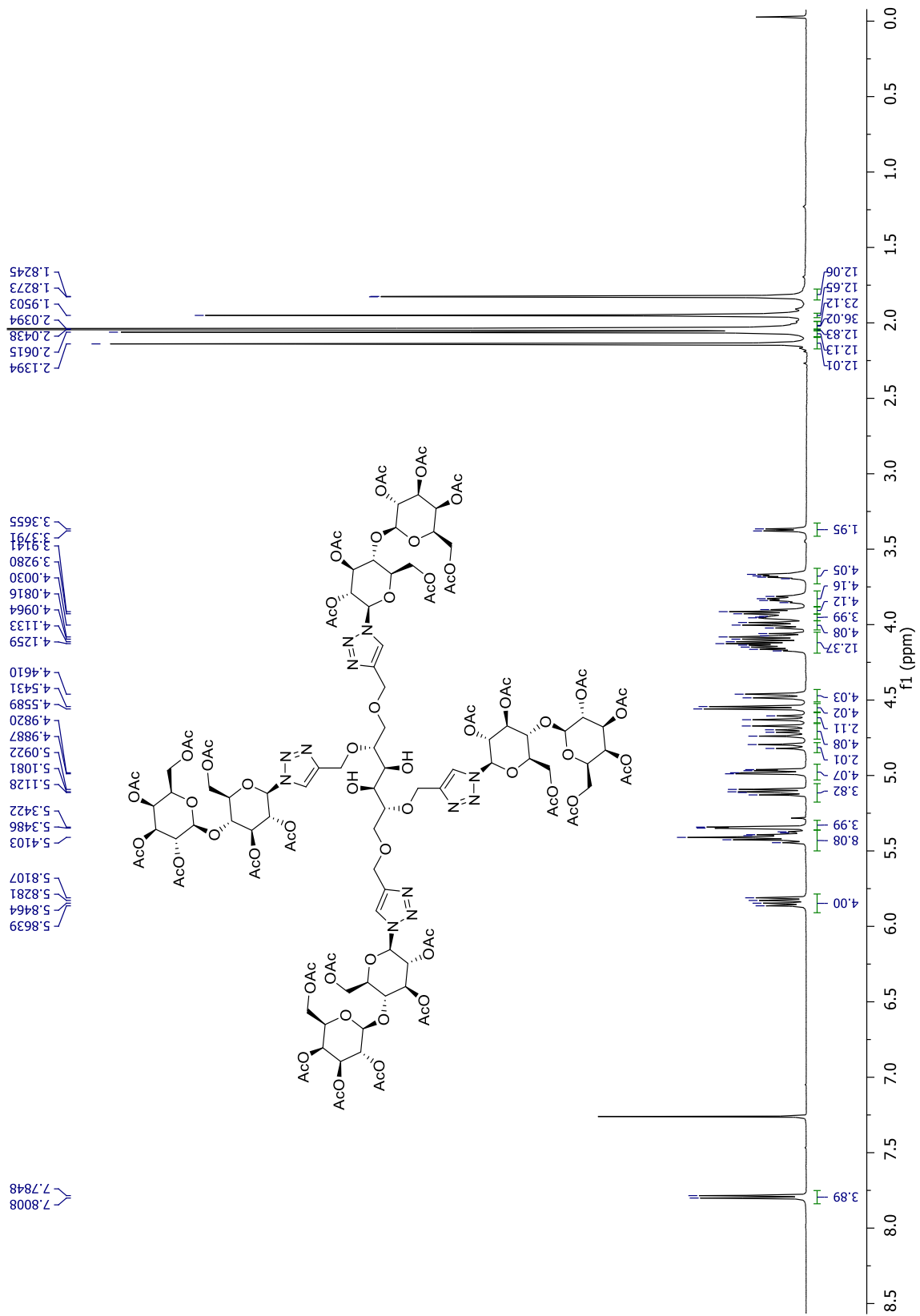


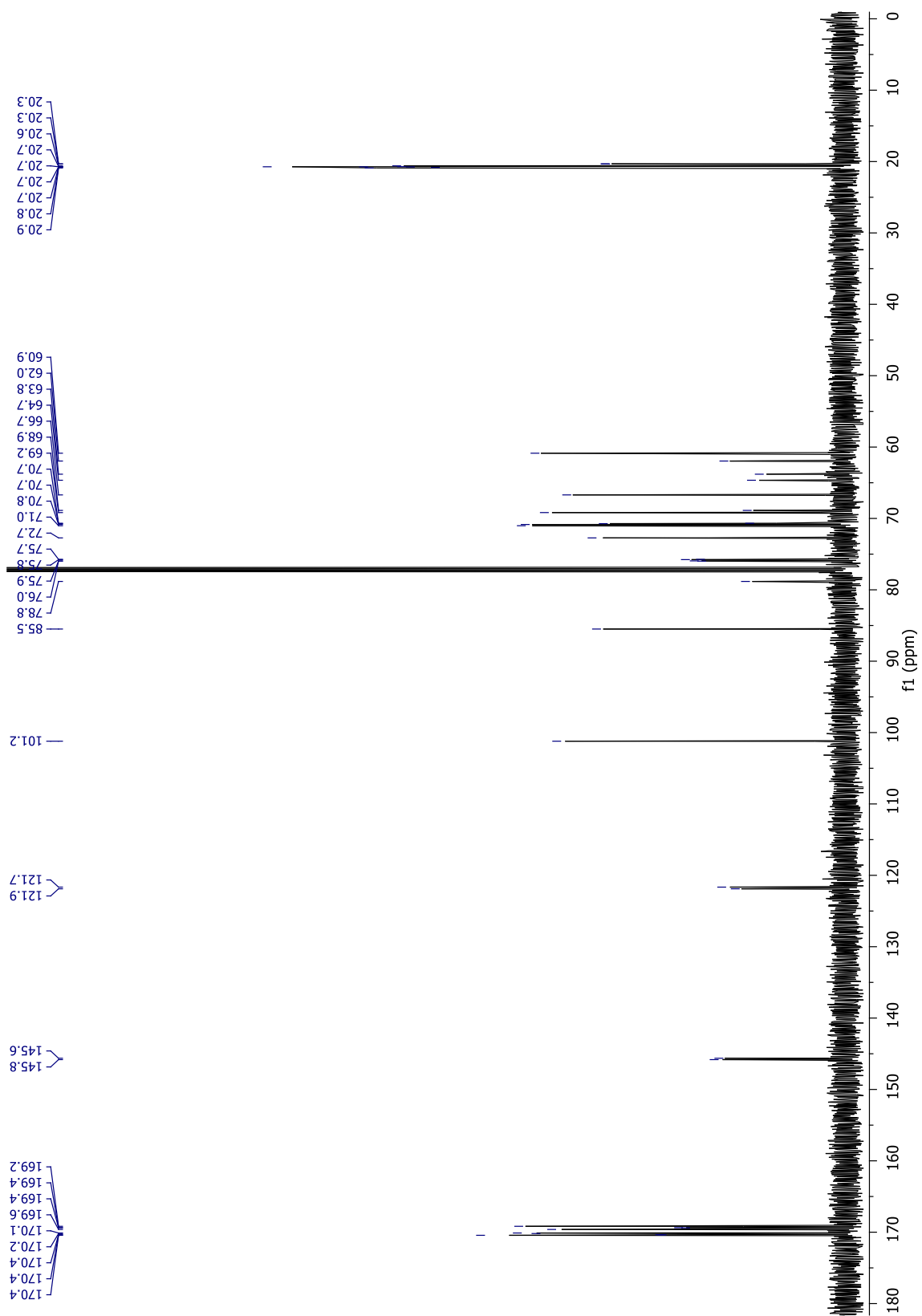
Espectro 81. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del derivado **68**.



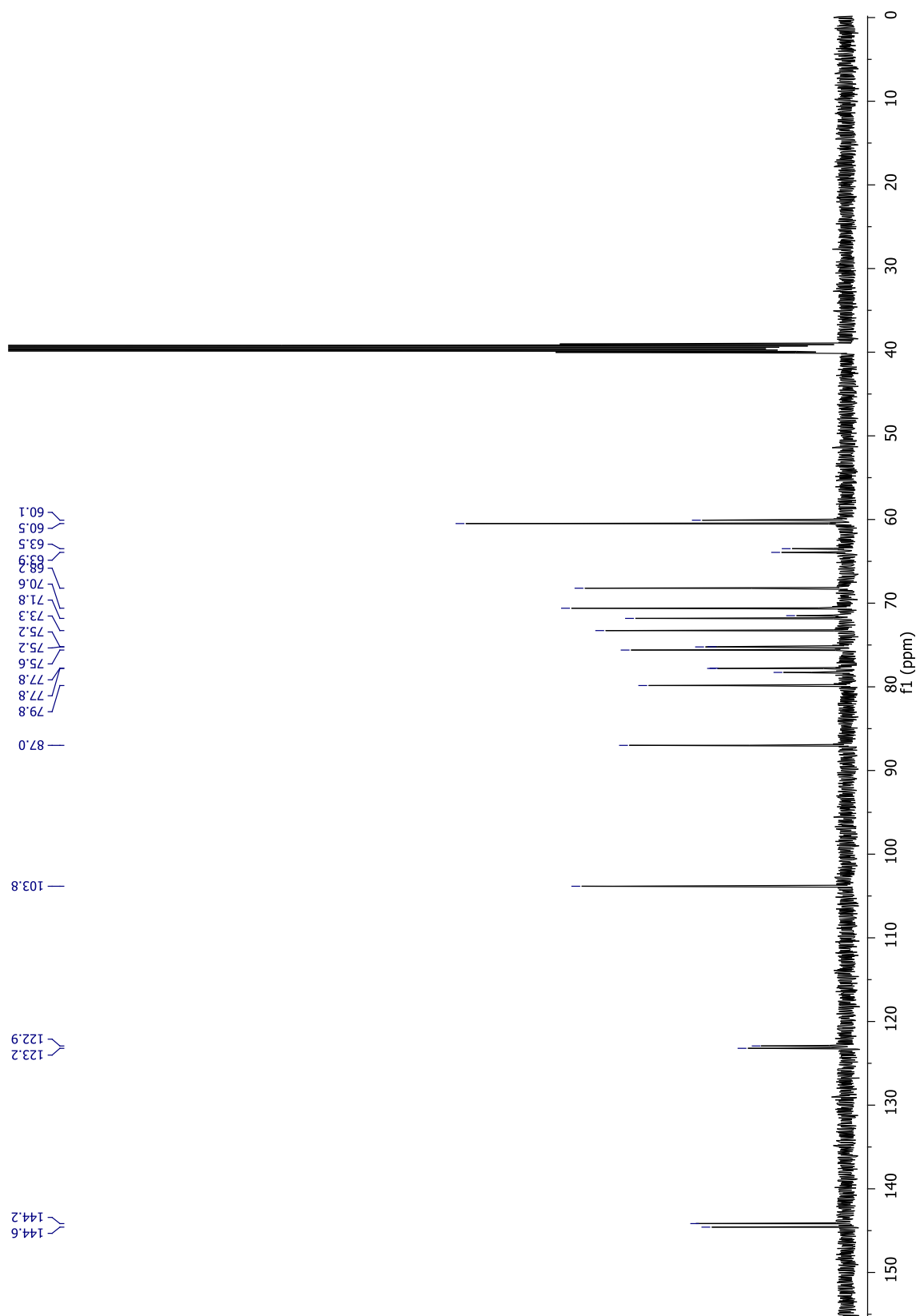


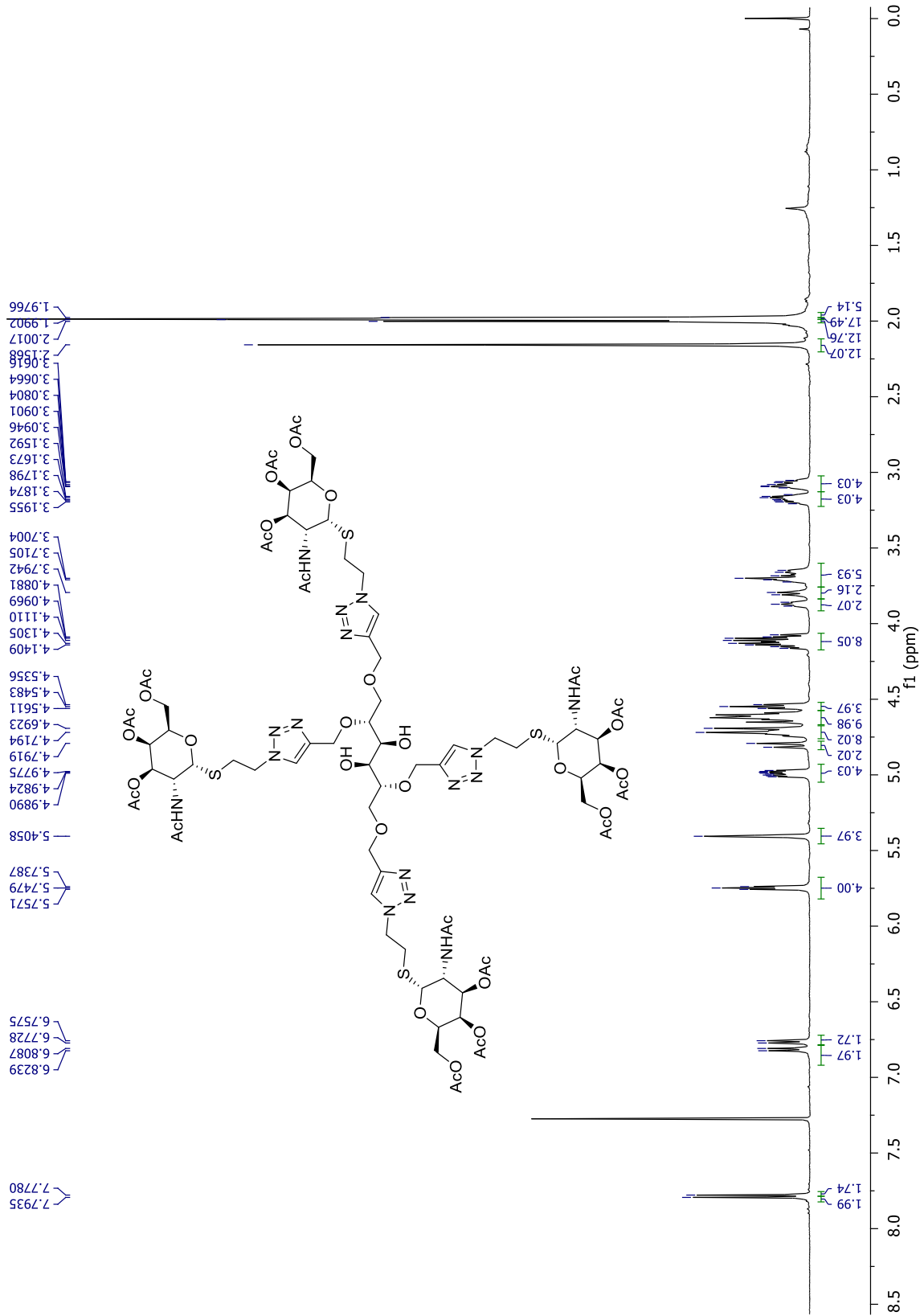
Espectro 83. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **69**.



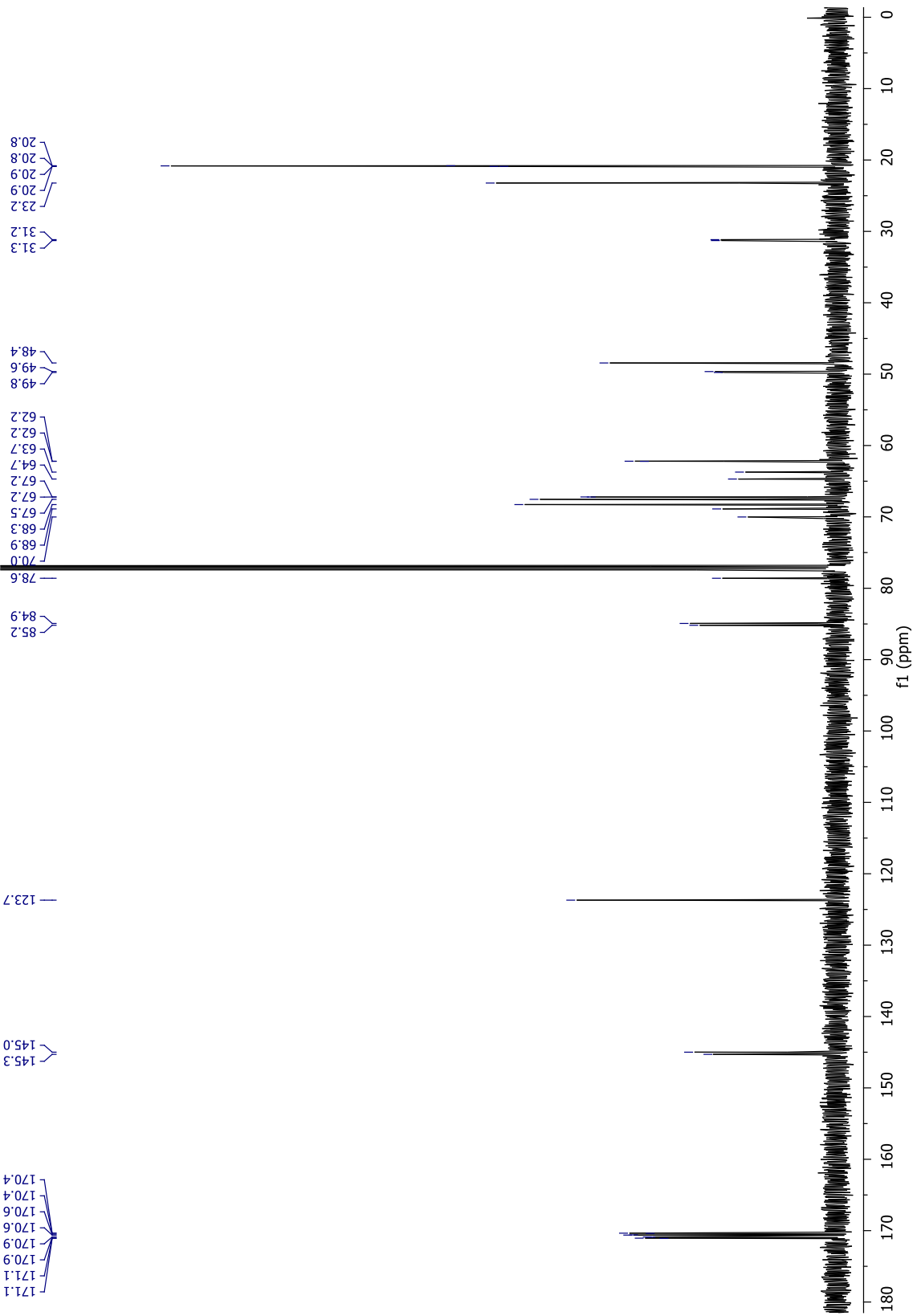


Espectro 85. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **71**.

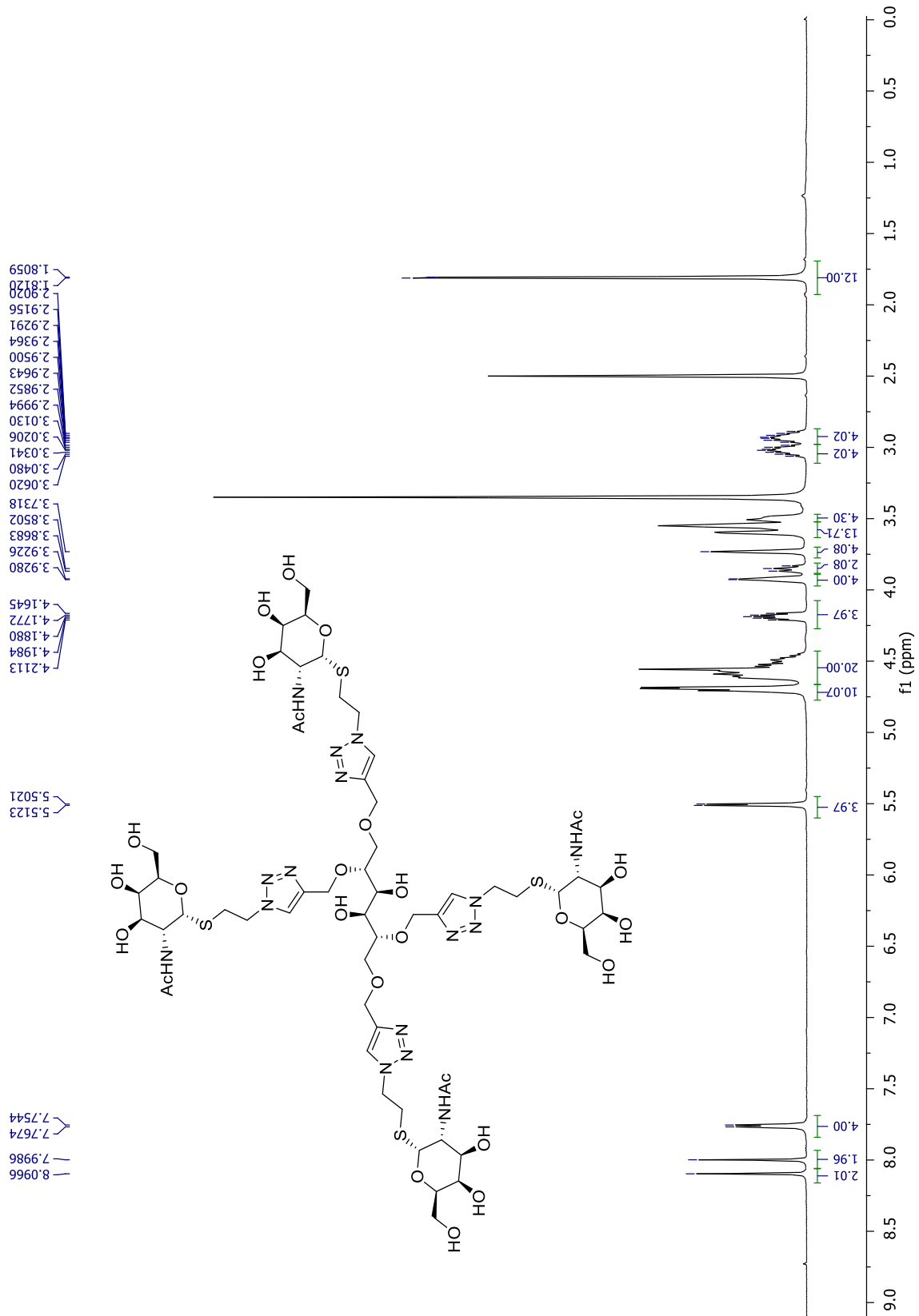




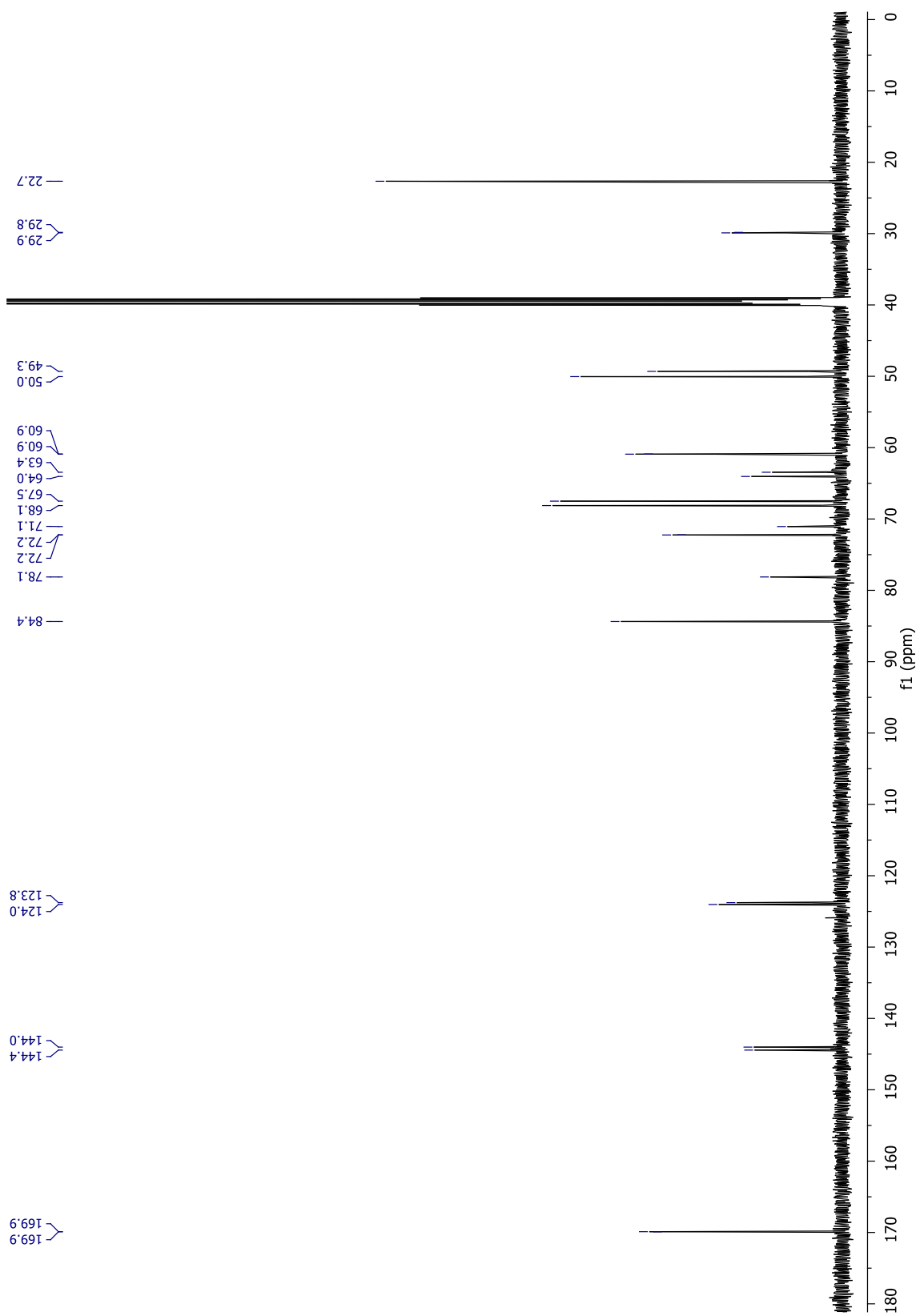
Espectro 88. RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) del derivado 75.



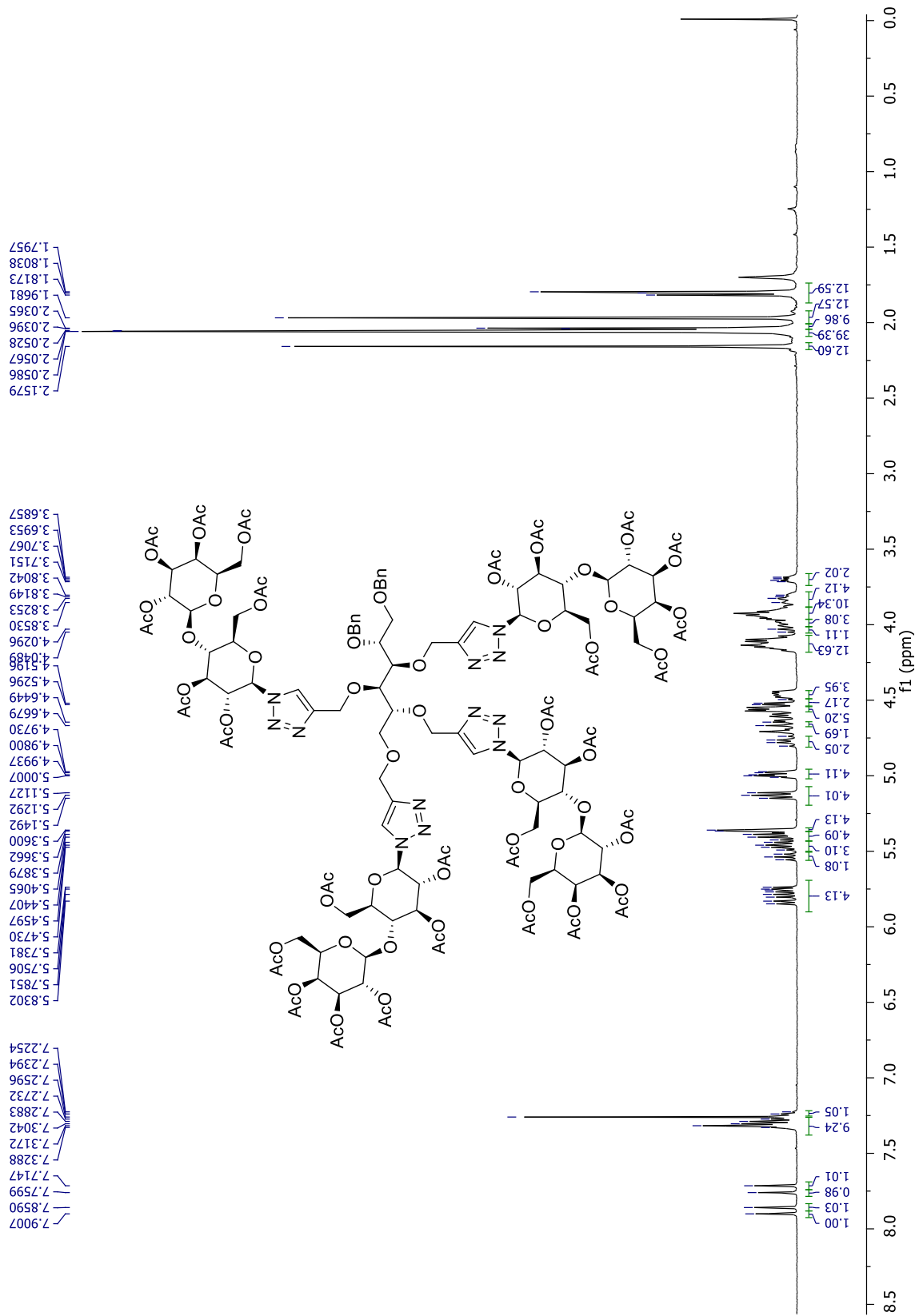
Espectro 89. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado **75**.

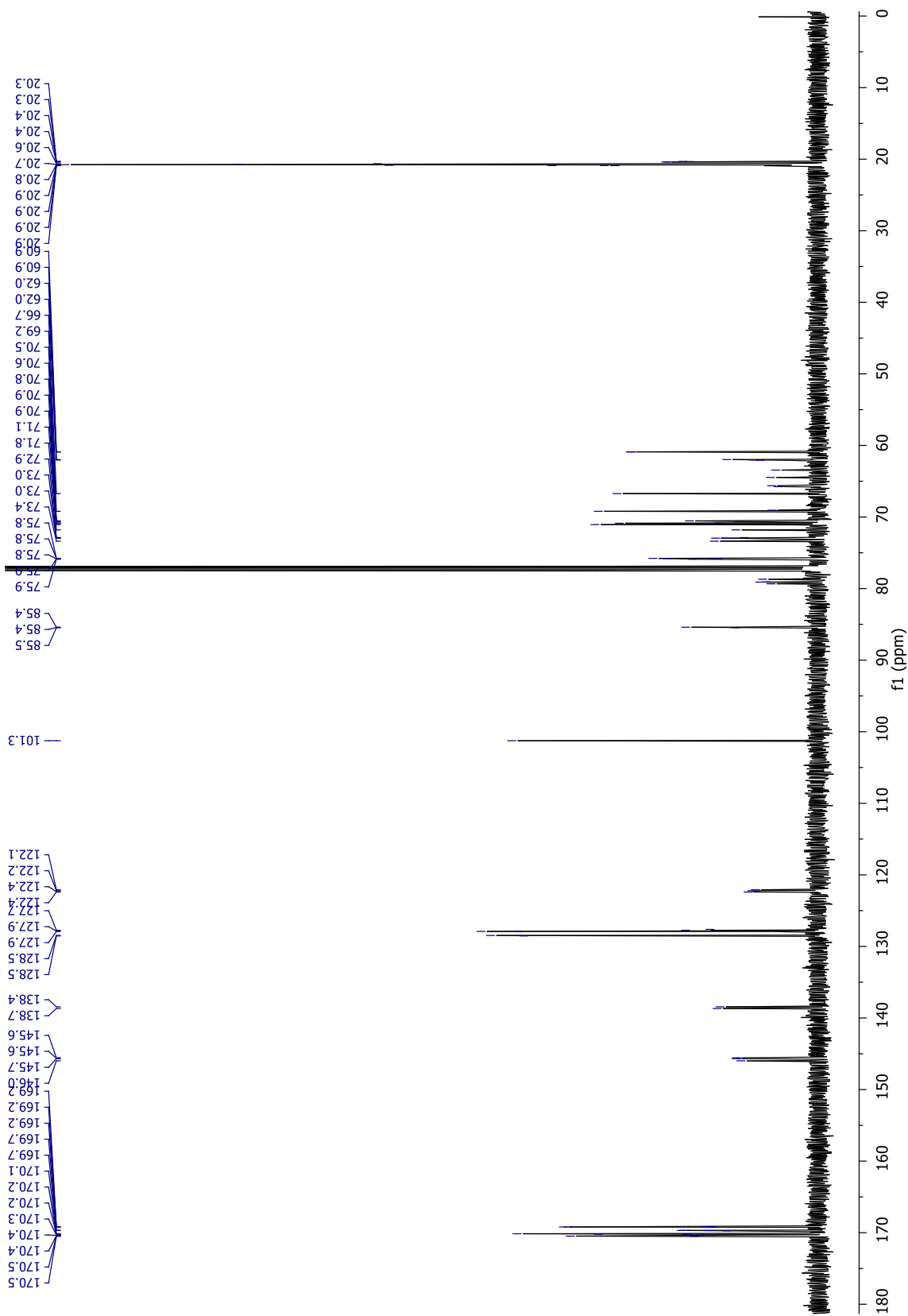


Espectro 90. RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del derivado 76.

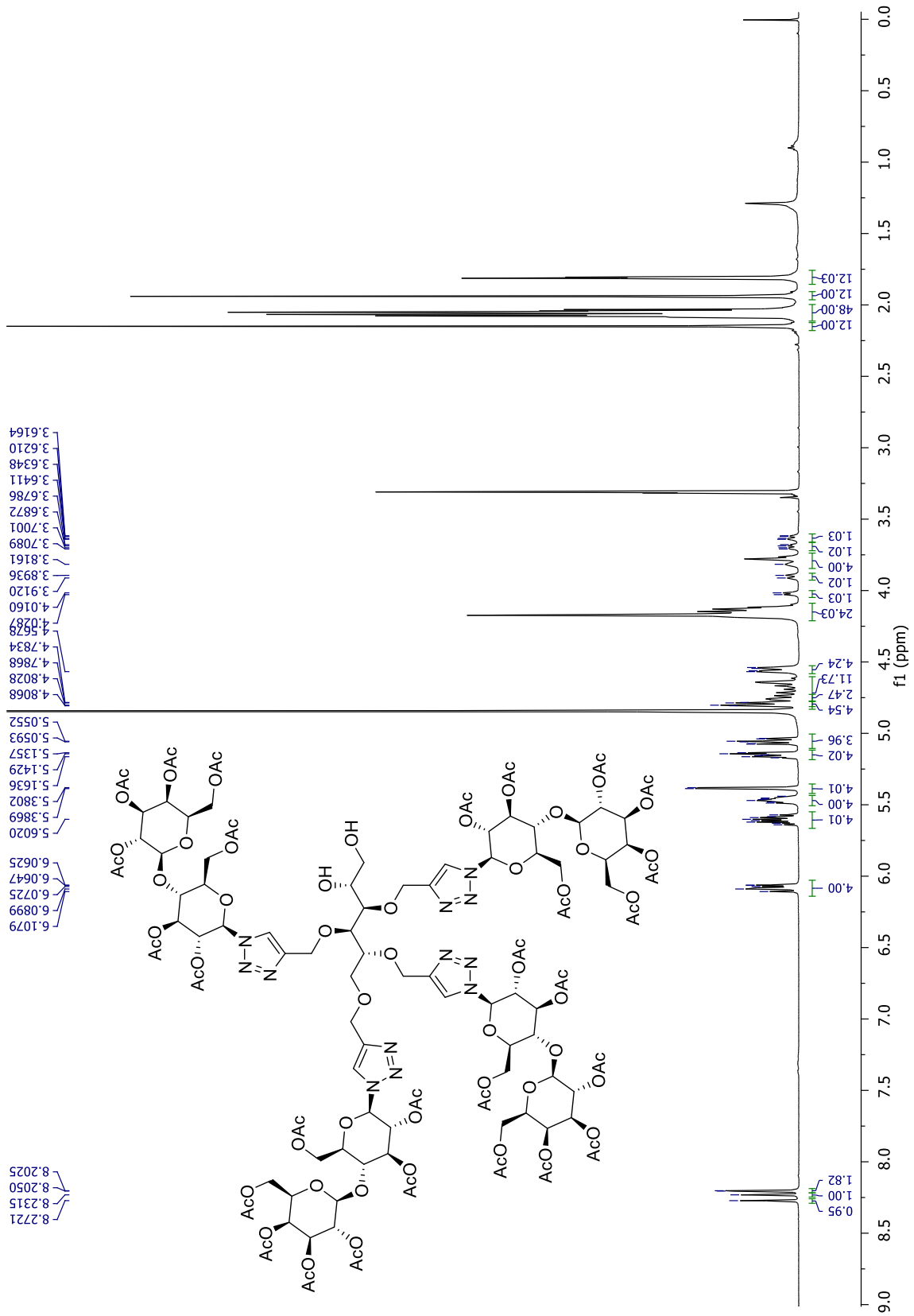


Espectro 91. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del derivado 76.

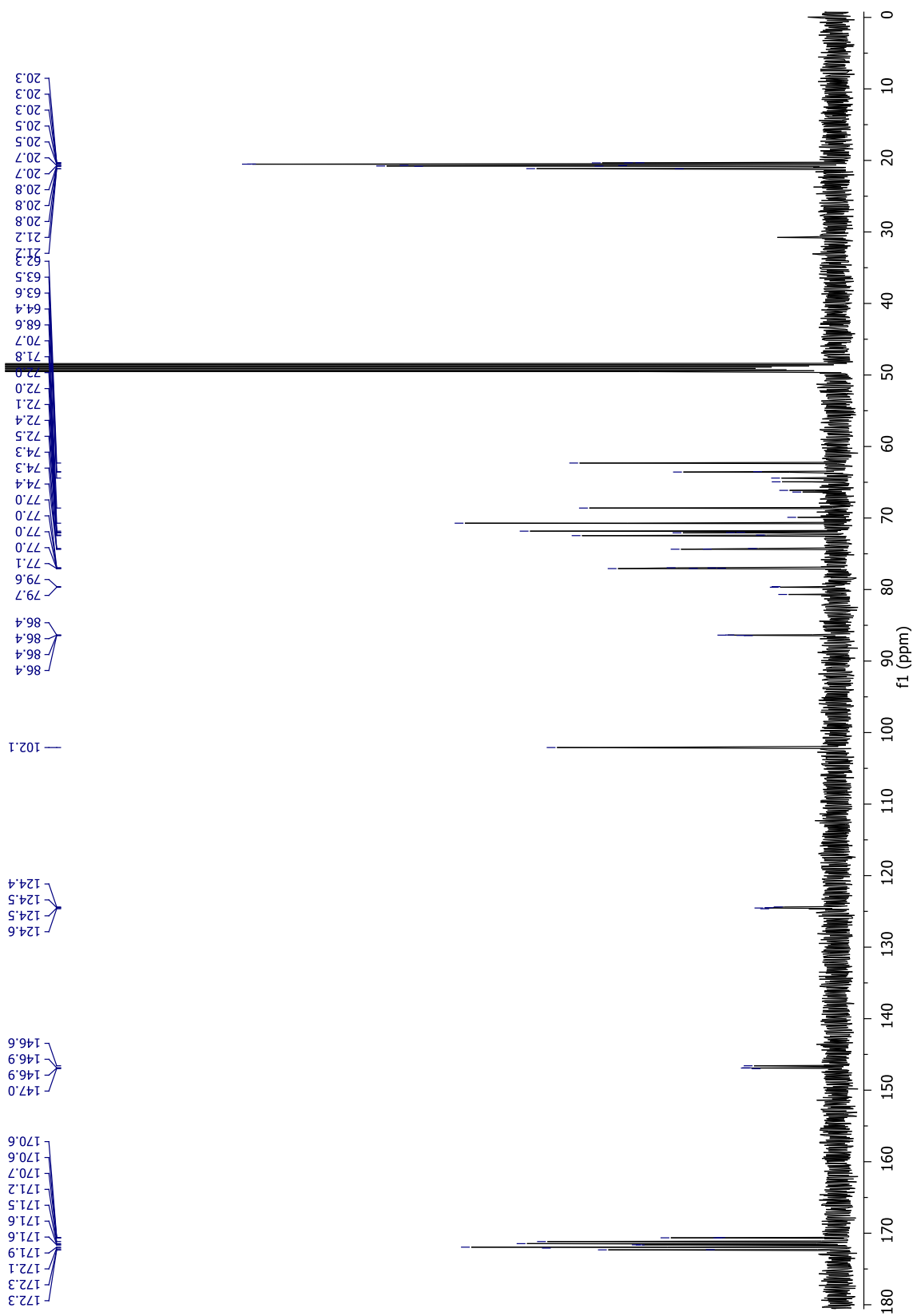




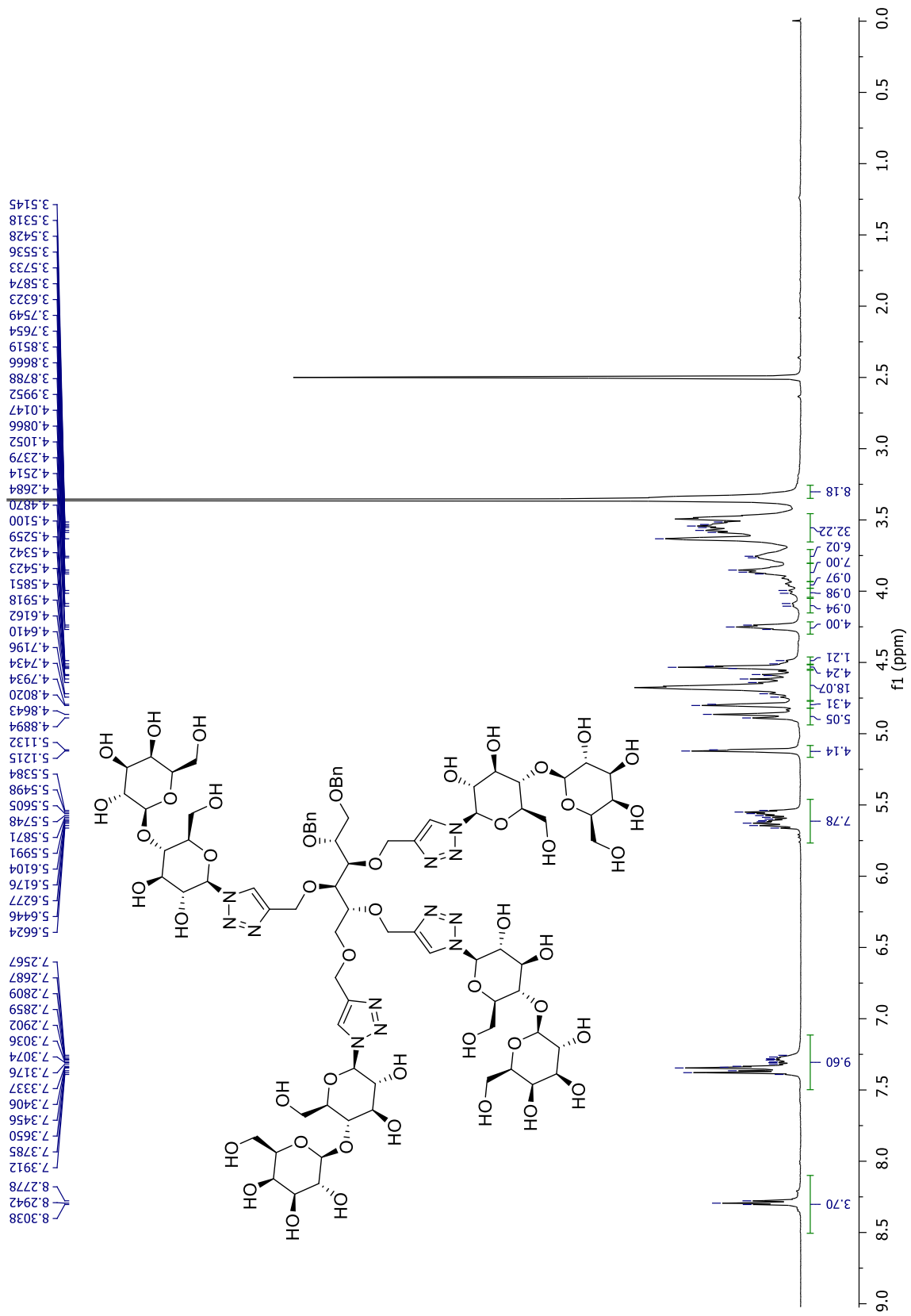
Espectro 93. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, CDCl_3) del derivado 77.



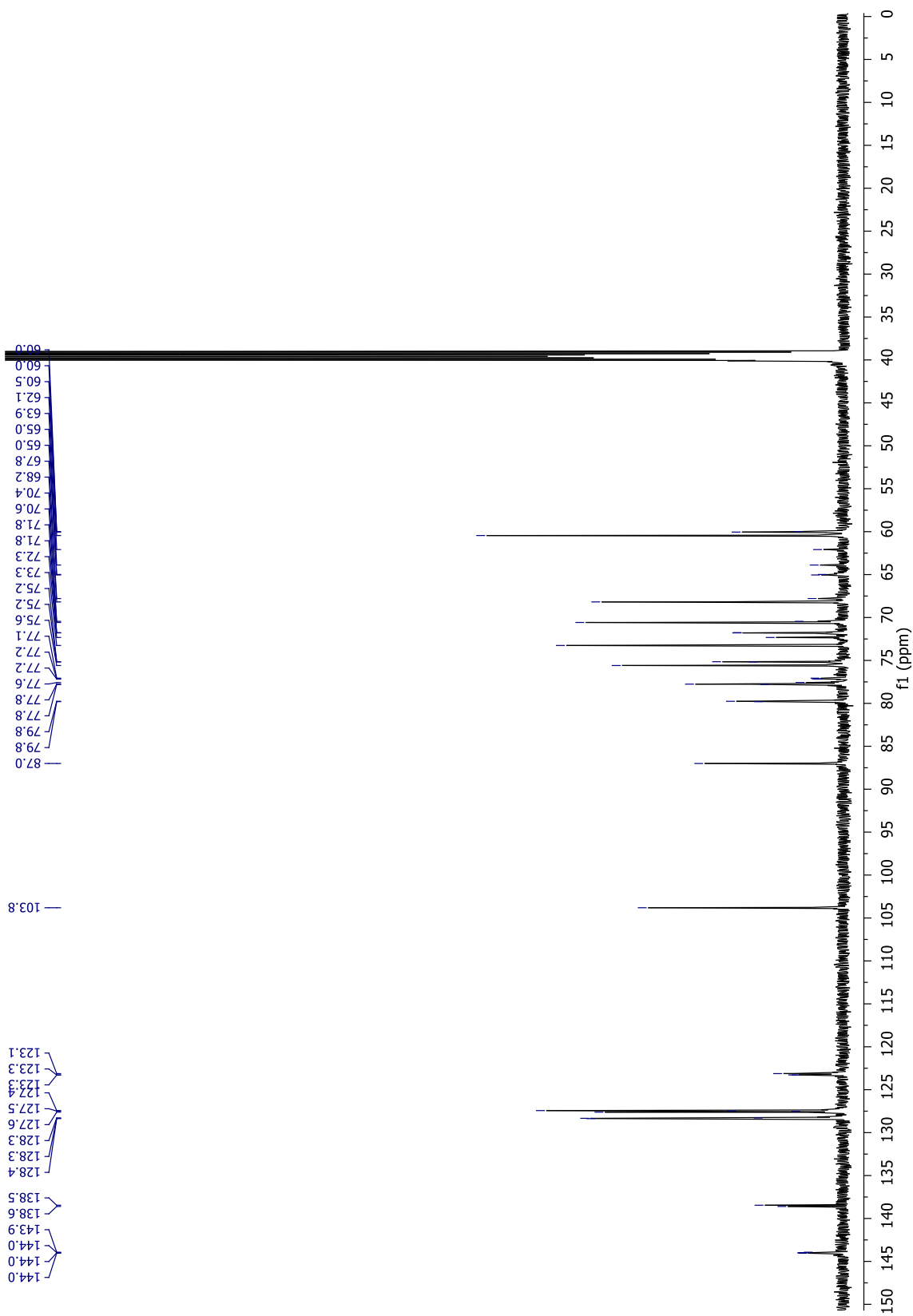
Espectro 94. RMN de ^1H (500 MHz, CD_3OD) del derivado 78.



Espectro 95. RMN de ¹³C (125.7 MHz, CD₃OD) del derivado 78.



Espectro 96. RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del derivado 79.



Espectro 97. RMN de ^{13}C (125.7 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del derivado **79**.

