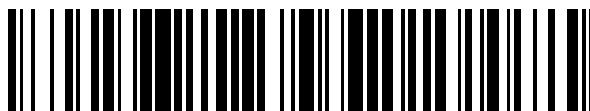


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 979**

51 Int. Cl.:
C07H 17/04 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06801019 .8**
96 Fecha de presentación: **08.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1928892**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **INHIBIDORES GLICOMIMÉTICOS DE LA LECTINA PA-IL, LECTINA PA-IIL O AMBAS LECTINAS DE PSEUDOMONAS.**

30 Prioridad:
09.08.2005 US 706546 P
01.06.2006 US 810190 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.03.2012

73 Titular/es:
GlycoMimetics, Inc.
401 Professional Drive Suite 250
Gaithersburg, MD 20879, US

72 Inventor/es:
MAGNANI, John, L.;
PATTON, John, T., Jr. y
SARKAR, Arun, K.

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 375 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores glicomiméticos de la lectina PA-IL, lectina PA-IIL o ambas lectinas de *Pseudomonas*

Campo de la invención

5 La invención presente se refiere generalmente a compuestos y composiciones para diagnóstico y tratamiento de enfermedades en animales de sangre caliente (por ejemplo, en seres humanos) con infecciones con y colonización por bacterias de *Pseudomonas*, incluyendo *Pseudomonas aeruginosa* en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística. La invención se refiere más particularmente al uso de uno o más compuestos selectivos para su unión con las lectinas PA-IL y/o las lectinas PA-IIL de la bacteria *Pseudomonas*. Estos compuestos son útiles en el diagnóstico y/o la intervención terapéutica de la colonización por bacterias de *Pseudomonas*, o pueden estar vinculados a un agente(s) diana(s) para marcar y eficazmente detener o matar a la bacteria de *Pseudomonas*.
10

Descripción de la técnica relacionada

15 Las infecciones por *Pseudomonas* se producen en una variedad de afecciones médicas y pueden ser potencialmente mortales. La *Pseudomonas* es una bacteria oportunista. Ejemplos de individuos en riesgo incluyen pacientes de fibrosis quística, quemados y pacientes con ventilación asistida. La fibrosis quística es descrita como un ejemplo representativo de una afección médica que puede implicar la infección con la bacteria *Pseudomonas*.

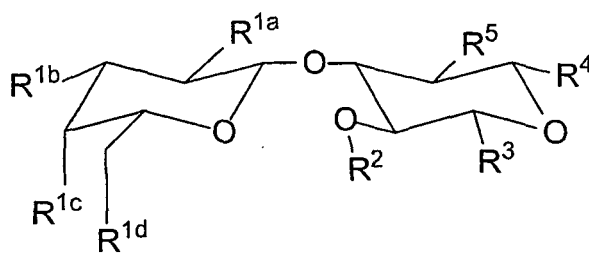
20 La fibrosis quística (CF) es la enfermedad genética letal más frecuente entre la población caucásica. CF es causada por mutaciones en el gen que codifica el regulador de la conductancia a través de las membranas de la fibrosis quística (CFTR), que actúa como un canal de cloruro. Las mutaciones genéticas de CFTR que alteran los movimientos de iones afectan también la N-glicosilación de CFTR así como de otras moléculas de la superficie celular. Todas las glándulas exocrinas de los pacientes se ven afectadas; sin embargo, los pulmones son el lugar primario de morbilidad y mortalidad. El cambio general en la glicosilación se asocia con una mayor capacidad de infección por *Pseudomonas aeruginosa*. Las mucinas salivares y respiratorias de los pacientes de CF contienen también patrones de glicosilación alterados.

25 La principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes de CF es la colonización pulmonar crónica por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, lo que origina una infección pulmonar pronunciada con una sólida respuesta inflamatoria neutrofílica que conduce a la destrucción de los pulmones y la muerte. La colonización por *P. aeruginosa* se inicia durante la fase sésil de las bacterias en la que los factores de virulencia son secretados en concierto. Dos factores de virulencia que se unen a los carbohidratos son lectinas. Estas lectinas, conocidas como PA-IL y PA-IIL, se unen a estas estructuras de oligosacáridos con gran afinidad y representan un objetivo molecular potencial para bloquear la colonización bacteriana. Los pacientes que nunca son totalmente colonizados por las bacterias tienen una excelente prognosis a largo plazo. Debido a las dificultades en los enfoques actuales de la técnica para la prevención de la colonización en un individuo por la bacteria *Pseudomonas*, hay una necesidad de compuestos, composiciones y métodos mejores. El documento de patente internacional WO 2004/058304 muestra oligosacáridos para el tratamiento de la infección de la bacteria de *Pseudomonas*.
30

35 Breve compendio de la invención

Brevemente dicho, esta invención proporciona compuestos y composiciones para utilizar ambas lectinas, PA-IIL y PA-IL, o cualquiera de ellas solas, expresadas por la bacteria *Pseudomonas* para la detección de la bacteria *Pseudomonas* y el diagnóstico y tratamiento de enfermedades de la bacteria *Pseudomonas*, incluyendo enfermedades en seres humanos. Por ejemplo, compuestos de la invención presente que tienen gran afinidad de unión con la lectina PA-IIL, la lectina PA-IL o ambas lectinas de *P. aeruginosa* tendrán un efecto terapéutico beneficioso en los pacientes de CF. Además, estos compuestos pueden administrarse en terapia combinada con antibióticos o pueden ser conjugados, por ejemplo con antibióticos, para aumentar su eficacia y disminuir la dosis, evitando así los efectos secundarios nocivos bien conocidos de muchos antibióticos. Dado que estos sitios de enlace son cruciales para la colonización y patogenicidad de la bacteria, las mutaciones en esta diana para convertirse en resistentes a esta terapia conjugada deberían ocasionar formas no patógenas de la bacteria.
40
45

Una realización de la invención presente proporciona un compuesto o su sal fisiológicamente aceptable, con la fórmula:



en donde el -O- que separa los dos anillos en la fórmula es una unión 1-3 alfa o beta;

R^1 = se selecciona independientemente de OH, NHAc y galactosa unida por un enlace O glicosídico, con la salvedad de que tres de los cuatro R^1 se seleccionan independientemente de OH y NHAc y un R^1 no es OH o NHAc;

5

R^2 = una fucosa

R^3 = $-\text{CH}_2\text{-OH}$

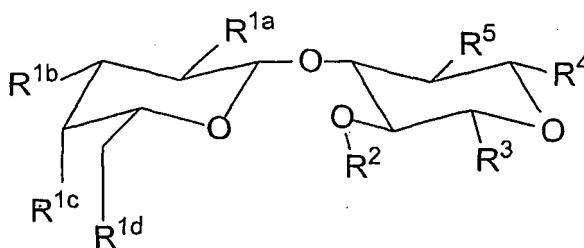
R^4 = H; y

R^5 = H.

10 Un compuesto o su sal de la invención presente pueden estar en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente.

En otra realización, la invención presente proporciona un conjugado que comprende un agente terapéutico unido a un compuesto como se ha descrito anteriormente.

15 Otra realización de la invención presente proporciona un compuesto para inhibir la infección por bacterias de *Pseudomonas* en un animal de sangre caliente que comprende administrar al animal en una cantidad eficaz para inhibir una o más lectinas de las bacterias un compuesto que comprende un compuesto o su sal fisiológicamente aceptable, que tiene la fórmula:



donde:

20 el -O- que separa los dos anillos en la fórmula es una unión 1-3 alfa o beta;

R^1 = se selecciona independientemente de OH, NHAc y galactosa unida por un enlace O glicosídico, con la condición de que tres de los cuatro R^1 se seleccionan independientemente de OH y NHAc y un R^1 no es OH o NHAc;

R^2 = una fucosa;

25 R^3 = $-\text{CH}_2\text{-OH}$

R^4 = H; y

R^5 = H.

30 En otra realización, la invención presente proporciona un método para detectar la bacteria *Pseudomonas* que comprende poner en contacto una muestra con un agente de diagnóstico ligado a un complejo que comprende un compuesto como se ha descrito anteriormente, en condiciones suficientes para que el compuesto se una a las bacterias o sus productos de lectina si están presentes en la muestra; y detectar al agente presente en la muestra, en donde la presencia del agente en la muestra es indicativa de la presencia de la bacteria de *Pseudomonas*.

En otra realización, la invención presente proporciona un método para inmovilizar a la bacteria de *Pseudomonas* sobre un soporte sólido que comprende poner en contacto, en condiciones suficientes para la unión, una muestra que contenga la bacteria *Pseudomonas* con un compuesto que comprende un compuesto como se ha descrito anteriormente que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido; y separar la muestra del soporte sólido.

- 5 En otras realizaciones, los compuestos y conjugados descritos en esta solicitud pueden utilizarse en la preparación de un medicamento para la inhibición de la bacteria *Pseudomonas*.

Estos y otros aspectos de la invención presente serán aparentes en referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos. Todas las referencias divulgadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad como si cada uno de ellas fuera incorporada individualmente.

10 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que ilustra la síntesis de un compuesto glicomimético.

La Figura 2A es un diagrama que ilustra la síntesis de un compuesto glicomimético que contiene un brazo de enlace.

La Figura 2B es un diagrama que ilustra la conjugación del compuesto de la figura 2A con el antibiótico tobramicina.

Las Figuras 3A y 3B son diagramas que ilustran la síntesis de compuestos glicomiméticos.

- 15 La Figura 4 muestra las estructuras de tres de los compuestos (compuestos A, B y glicomimético 1) utilizados en uno o más de los ensayos de lectinas descritos en esta solicitud.

La Figura 5 ilustra gráficamente la inhibición de la lectina PA-IL por el glicomimético 1 ("Glycm 1"). La lectina PA-IL es una lectina que se une a la galactosa y es inhibida por la galactosa, melibiosa (Galá11-6Gal) y glicomimético 1; pero no por la fucosa, el compuesto A o el compuesto B.

- 20 La Figura 6 ilustra gráficamente la inhibición de la lectina PA-IIL. La fucosa que se une a la lectina PA-IIL es inhibida por la fucosa, el compuesto A y el glicomimético 1, pero no por galactosa.

La figura 7 muestra la determinación del valor de IC_{50} para el glicomimético 1 para la inhibición de PA-IL. El glicomimético 1 inhibe la lectina que se une a la galactosa, PA-IL unas 4 a 5 veces mejor que la galactosa; mientras que la fucosa es inactiva.

- 25 La Figura 8 muestra la determinación del valor de IC_{50} para el glicomimético 1 para la inhibición de PA-IIL. El glicomimético 1 inhibe la lectina que se une a la fucosa, PA-IIL unas 4 a 5 veces mejor que la fucosa; mientras que la galactosa es inactiva..

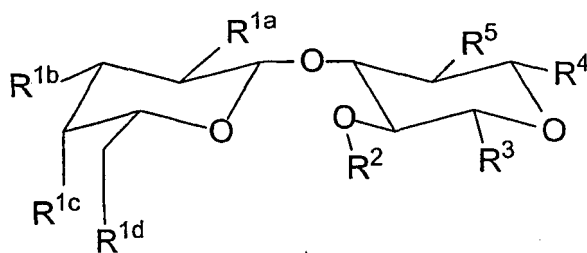
La Figura 9 ilustra la inhibición de la unión de PA-IIL a células epiteliales humanas. Las células epiteliales humanas bucales son incubadas con la lectina PA-IIL biotinilada seguido de la detección de la lectina unida a estreptavidina etiquetada con fluoresceína. Las células etiquetadas con fluorescencia se cuantifican por clasificación de células fluorescentes activadas (B). La incubación de la lectina PA-IIL con fucosa (D) o glicomimético 1 (E y F) inhibe la unión a la superficie de la célula. La galactosa (C) no tiene ningún efecto.

30 Descripción detallada de la invención

- Como se señaló anteriormente, la invención presente proporciona compuestos y composiciones que se unen a las lectinas bacterianas de *Pseudomonas* (p. ej., lectinas de *P. aeruginosa*) y pueden utilizarse en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Compuestos glicomiméticos

- 40 El término "compuesto glicomimético" como se usa en este documento, se refiere a un compuesto (incluyendo sus sales fisiológicamente aceptables) que tiene gran afinidad por la lectina PA-IL, lectina PA-IIL o ambas lectinas de la bacteria *Pseudomonas*. Las realizaciones de las estructuras de los compuestos glicomiméticos de esta invención tienen la fórmula:



en donde:

donde -O- separa los dos anillos en la fórmula es una unión 1-3 alfa o beta;

R^1 = se selecciona independientemente de OH, NHAc y galactosa unida por un enlace O glicosídico;

5 R^2 = una fucosa;

R^3 = $-\text{CH}_2\text{-OH}$

R^4 = H; y

R^5 = H.

10 Todos los compuestos (o sus conjugados) útiles en la presente invención incluyen sus sales fisiológicamente aceptables.

Los compuestos glicomiméticos de la invención presente incluyen la fórmula establecida anteriormente con sustituyentes R^1 - R^5 . Donde una opción sustituyente (es decir, átomo o grupo) para R^1 - R^5 posee un "-" esto es para indicar el punto de conexión (a un anillo para R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} y R^3 - R^5 , a CH_2 para R^{1d} y un O para R^2) y no representan CH_2 o CH_3 . En la fórmula anterior, existe un oxígeno (-O-) uniendo los dos anillos representados en la fórmula. El oxígeno puede estar en una unión alfa 1-3 o una unión beta 1-3.

20 Como se utiliza en la presente solicitud, una línea a la que ningún grupo está unido representa el enlace que une al sustituyente a la estructura representada por la fórmula general. Como se utiliza en la presente solicitud, un "arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ " se refiere a un sustituyente aromático con de seis a catorce átomos de carbono en uno o varios anillos que pueden estar separados por un enlace o un grupo alquilo o fusionados. Como se utiliza en la presente solicitud, un "heteroarilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ " es similar a un "arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ", excepto que el sustituyente aromático posee al menos un heteroátomo (tal como N, O o S) en lugar de un átomo de carbono del anillo. Ejemplos de arilos y heteroarilos incluyen fenilo, naftilo, difenilo, piridinilo y pirimidinilo.

25 R^1 se compone de R^{1a} , R^{1b} , R^{1c} y R^{1d} , como se muestra en la fórmula anterior. R^{1a} está unido en la posición de carbono 2. R^{1b} está unido en la posición del carbono 3. R^{1c} está unido en la posición de carbono 4. R^{1d} está unido en la posición de carbono 6, que a su vez está unido en la posición de carbono 5.

30 Para determinadas realizaciones, puede resultar beneficioso vincular también, o, alternativamente, un agente de diagnóstico o terapéutico, tal como un fármaco a un compuesto glicomimético, para formar un conjugado donde el vínculo es covalente. Como se utiliza en la presente solicitud, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente bioactivo destinado a la administración a un animal de sangre caliente (por ejemplo, un mamífero como un ser humano) para prevenir o tratar una enfermedad u otra condición indeseable o para mejorar el éxito de los tratamientos.

Agentes terapéuticos incluyen antibióticos, hormonas, factores de crecimiento, proteínas, péptidos, genes, vectores no virales y otros compuestos.

Formulaciones de compuestos glicomiméticos

35 Los compuestos glicomiméticos como se describe en esta solicitud pueden estar presentes dentro de una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica comprende uno o más compuestos glicomiméticos en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes o excipientes fisiológicamente o farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones (por ejemplo, solución salina neutra tamponada o solución salina tamponada con fosfato), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, manosa, sacarosa o dextrano), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos como la glicina, antioxidantes, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y/o conservantes. Dentro de otras realizaciones, las composiciones de la invención presente pueden formularse como un liofilizado. Las composiciones de la invención

presente pueden formularse de cualquier manera apropiada de administración, incluyendo por ejemplo, aerosoles, administración tópica, oral, nasal, intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular.

5 Una composición farmacéutica puede también, o alternativamente, contener uno o más agentes activos, tales como fármacos (por ejemplo, antibióticos), que pueden estar unidos a un compuesto glicomimético o pueden estar libres en la composición. La unión de un agente a un compuesto glicomimético puede ser covalente o no covalente. Un ejemplo de un agente activo es la tobramicina. La tobramicina sola normalmente ha sido administrada por vía intravenosa o por inhalación.

10 Las composiciones descritas en esta solicitud pueden ser administradas como parte de una fórmula de liberación sostenida (es decir, una formulación como una cápsula o esponja que efectúa una lenta liberación de agente modulando tras la administración). Dichas formulaciones generalmente pueden prepararse usando tecnología bien conocida y administradas por, por ejemplo, implantación oral, rectal o subcutánea, o por implantación en el sitio de destino deseado. Los vehículos para uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles y también pueden ser biodegradables; preferentemente la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del agente modulador. La cantidad de compuesto glicomimético contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende del lugar de implantación, la tasa y la duración prevista de liberación y la naturaleza de la condición que deba tratarse o prevenirse.

15 Los compuestos glicomiméticos están generalmente presentes dentro de una composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que resulta en un beneficio perceptible para el paciente, tal como una respuesta observada o medida de una afección asociada con infección por *Pseudomonas*.

Métodos de uso de los compuestos glicomiméticos

25 En general, los compuestos glicomiméticos descritos en esta solicitud pueden emplearse para lograr resultados diagnósticos y/o terapéuticos en enfermedades (por ejemplo, enfermedad en seres humanos) que envuelven infección por la bacteria *Pseudomonas* (p. ej., *P. aeruginosa*). Tales resultados diagnósticos y/o terapéuticos pueden ser logrados *in vitro* y/o *in vivo* en un animal, preferiblemente en un mamífero tal como un ser humano, siempre que la *Pseudomonas* (p. ej., *P. aeruginosa*) o sus productos finalmente se pongan en contacto con un compuesto glicomimético, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para lograr un resultado perceptible de diagnóstico o terapéutico. En el contexto de esta invención, un resultado terapéutico estaría asociado con, por ejemplo, la prevención de infecciones pulmonares. En algunas condiciones, los resultados terapéuticos estarían asociados con la inhibición de *Pseudomonas* (como *P. aeruginosa*) o sus productos (en donde la inhibición incluye, por ejemplo, detener el crecimiento de o matar a las bacterias o prevenir la colonización por las bacterias). Como se utiliza en esta solicitud, la terapia o resultados terapéuticos incluyen el tratamiento o la prevención.

30 Los compuestos glicomiméticos de la invención presente pueden administrarse de manera adecuada a la enfermedad que deba tratarse o prevenirse. Las dosis apropiadas y duración y frecuencia de administración adecuadas pueden determinarse por factores tales como la condición del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente y el método de administración. En general, un régimen de dosificación y tratamiento adecuado proporciona los agente(s) moduladores en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio de tratamiento y/o profiláctico. En las realizaciones particularmente preferidas de la invención, un compuesto glicomimético puede administrarse a una dosis en el intervalo de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal (más típicamente 0,01 a 1000 mg/kg), en un régimen de una o múltiples dosis diarias. Dosis adecuadas pueden determinarse generalmente utilizando modelos experimentales o ensayos clínicos. En general, se prefiere el uso de la dosis mínima que sea suficiente para proporcionar un tratamiento eficaz. Generalmente, los pacientes pueden ser monitorizados en cuanto a la eficacia terapéutica mediante ensayos adecuados para la condición que se trata o previene, que resultarán familiares a aquellos expertos en la técnica. Los compuestos glicomiméticos descritos en esta solicitud pueden ser administrados en combinación (es decir, simultáneamente o secuencialmente) con otro compuesto antibacteriano. Por ejemplo, un compuesto glicomimético puede administrarse en combinación con la tobramicina.

35 Los compuestos glicomiméticos también pueden ser usados como sustancias diana para las bacterias de *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. aeruginosa*. Tales sustancias incluyen agentes terapéuticos y agentes de diagnóstico. Agentes terapéuticos pueden ser una molécula, virus, componente viral, célula, componente celular o cualquier otra sustancia que pueda demostrarse que modifique las propiedades de una célula diana a fin de proporcionar un beneficio en el tratamiento o prevención de un trastorno o en la regulación de la fisiología del paciente. Un agente terapéutico también puede ser un fármaco o un pro fármaco que genera un agente con

actividad biológica *in vivo*. Moléculas que pueden ser agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, polipéptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, nucleósidos, esteroides, polisacáridos o compuestos inorgánicos. Dichas moléculas pueden funcionar en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo como enzimas, inhibidores de enzimas, hormonas, receptores, oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos catalíticos, agentes antivirales, agentes antitumorales, agentes antibacterianos, agentes inmunomoduladores y agentes citotóxicos (por ejemplo, radionucleidos como el yodo, bromo, plomo, renio, homio, paladio y cobre). Los agentes de diagnóstico incluyen agentes de imagen tales como metales y agentes radioactivos (por ejemplo, galio, tecnecio, indio, estroncio, yodo, bario, bromo y compuestos que contienen fósforo), agentes de contraste, colorantes (por ejemplo, colorantes fluorescentes y cromóforos) y las enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica. En general, los agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden unirse a un compuesto glicomimético usando una variedad de técnicas tales como las descritas anteriormente. Para fines de marcaje, un compuesto glicomimético puede ser administrado a un paciente como se ha descrito en esta solicitud.

Los compuestos glicomiméticos también pueden ser usados *in vitro*, por ejemplo, dentro de una variedad de cultivos celulares bien conocidos y métodos de separación de células bien conocidos. Por ejemplo, un compuesto glicomimético puede ser inmovilizado sobre un soporte sólido (tal como unido a la superficie interior de una placa de cultivo de tejidos o de otro tipo de soporte de cultivo celular) para su uso en la inmovilización de las bacterias de *Pseudomonas* o sus productos para cribas, ensayos y crecimiento en cultivos. Dichas uniones pueden realizarse por cualquier técnica adecuada, tal como los métodos descritos anteriormente, así como otras técnicas estándar. Los compuestos glicomiméticos pueden utilizarse también para facilitar la identificación de células y la clasificación *in vitro*, lo que permite la selección de dichas células bacterianas. Preferiblemente, los compuestos glicomiméticos fijados para su uso en tales métodos están unidos a un agente de diagnóstico que es un marcador detectable. Marcadores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen radionucleidos, grupos luminiscentes, grupos fluorescentes, enzimas, colorantes, dominios de inmunoglobulina constantes y biotina. En una realización preferida, un compuesto glicomimético unido a un marcador fluorescente, tal como la fluoresceína, se pone en contacto con las células, que luego son analizadas por clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

Tales métodos *in vitro* comprenden generalmente poner en contacto una muestra (por ejemplo, una preparación biológica) con cualquiera de los compuestos glicomiméticos y detectar el compuesto en la muestra. Si se desea, pueden añadirse uno o más pasos de lavado al método. Por ejemplo, después de poner en contacto una muestra con un compuesto glicomimético pero antes de la detección del compuesto, la muestra se puede lavar (es decir, ponerla en contacto con un líquido y, a continuación, eliminar el líquido para eliminar el compuesto glicomimético que no esté unido). Como alternativa, o además, puede añadirse un paso de lavado durante el proceso de detección.

Por ejemplo, si un compuesto glicomimético posee un marcador (un agente de diagnóstico) que se puede unir a una sustancia que es detectable, puede ser conveniente lavar la muestra después de poner en contacto la muestra con una sustancia detectable, pero antes de la detección. Como se utiliza en esta solicitud, la frase "detectar el compuesto (o agente) en la muestra" incluye detectar el compuesto (o agente) mientras está unido a la muestra, o detectar el compuesto (o agente) que fue unido a la muestra, pero después de que se haya separado de la muestra.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

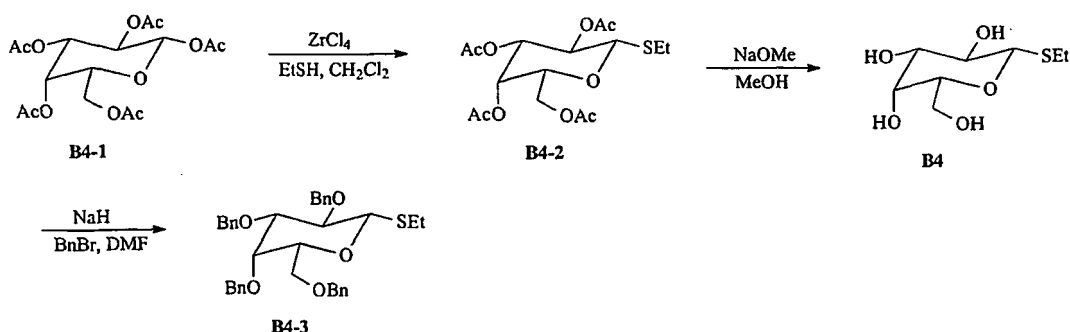
Ejemplos

40 Ejemplo 1

Síntesis del glicomimético 1

Los reactivos y disolventes se utilizaron como recibidos de los proveedores comerciales. La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó mediante placas de gel de sílice Analtech y se visualizaron como manchas de luz UV (254 nm). El progreso de las reacciones fue supervisado por CCF o CG.

45

Preparación de derivados de B4Preparación de B4-2

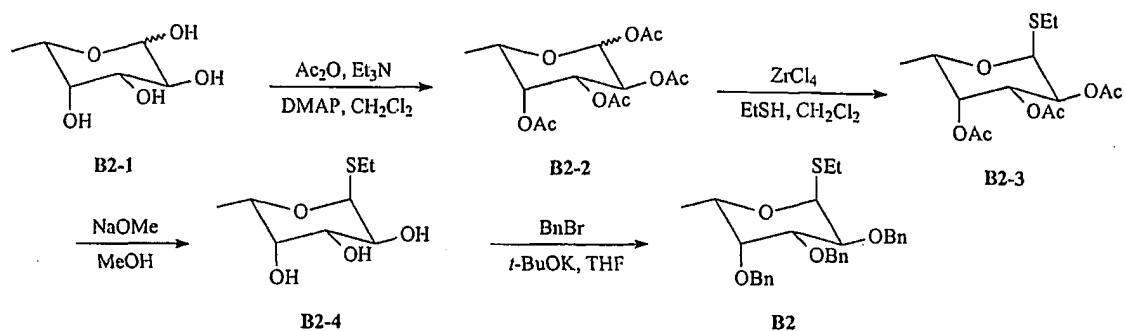
5 Una solución de B4-1 (150 g, 385 mmoles) en CH_2Cl_2 (800 ml) se agregó lentamente a una papilla de ZrCl_4 (85 g, 366 mmoles) en CH_2Cl_2 (800 ml) a 0°C . Después de que la reacción se removiera a 0°C durante 30 minutos, se agregó EtSH (32 ml, 423 mmoles) y la reacción fue completada en 2 horas. La reacción se apagó con salmuera (500 ml). Se separaron las capas y la capa orgánica fue lavada con NaHCO_3 acuoso saturado (1 x 500 ml) y salmuera (1 x 500 ml), secada sobre MgSO_4 , filtrada y concentrada para dar un residuo oleoso. Esto fue disuelto en MTBE (300 ml) y la solución se diluyó con heptano (1,2 l). Después de que la mezcla resultante se removiera en un baño de hielo durante 1 hora, la mezcla fue filtrada para proporcionar el compuesto B4-2 (143 g, 95%).

Preparación de B4

15 Se añadió NaOMe (0,5 M en MeOH, 1,09 l, 545 mmoles) a una solución de B4-2 (710 g, 392 mmoles) en MeOH (4 l) a temperatura ambiente. Después de 2 horas, se agregó resina de Dowex 50wx8-200 (350 g) hasta pH 3,5-4. La resina fue filtrada y el filtrado se concentró a un residuo oleoso. Esto fue disuelto en CH_2Cl_2 y concentrado nuevamente para dar B4 como un sólido (367 g, 90%).

Preparación de B4-3

20 Una solución de B4 (10 g, 44,6 mmoles) en DMF anhidro (125 ml) fue agregada a una suspensión de NaH (14 g, 357 mmoles, 60% en aceite mineral) a 0°C . Después de que la reacción se agitara a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se enfriara a 0°C , se añadió con cautela BnBr (42 ml, 357 mmoles). La reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas y luego cuidadosamente apagada con MeOH (30 ml) mientras se enfriaba en un baño de hielo. Se agregó agua (200 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 200 ml). La fase orgánica fue lavada con agua (2 x 500 ml) y salmuera, secada sobre MgSO_4 y concentrada a un residuo oleoso. La purificación cromatográfica con gel de sílice eluida con EtOAc/ heptano (1:9) proporcionó B4 (20,6 g, 79%).

Preparación de derivados de B2

25

Preparación de B2-2

Se agregó trietilamina (6,8 l, 48,7 moles) a una solución de B2-1 (1 kg, 6,1 moles) y DMAP (74 g, 0,61 moles) en CH_2Cl_2 (12 l), seguido de adición de Ac_2O (3,46 l, 36,6 moles) a $0-10^\circ \text{C}$. La reacción fue agitada a temperatura

ambiente durante la noche y luego se apagó con agua (25 l). Las capas se separaron. La fase orgánica se lavó con agua (25 l), solución saturada acuosa de NaHCO_3 (2 x 10 l) y salmuera (10 l), se secó sobre MgSO_4 y se concentró para proporcionar B2-2 crudo (2,1 kg, > cuantitativo).

Preparación de B-2-3

- 5 Una solución de B2-2 (1,5 kg, 3,01 moles) en CH_2Cl_2 (6 l) se agregó lentamente a una papila de ZrCl_4 (1 kg, 2,86 moles) en CH_2Cl_2 (1,2 l) a de 0-5° C. Después de que la reacción se agitara durante 30 minutos, se agregó EtSH (351 ml, 3,16 moles). La reacción se agitó a 0° C. Debido a la reacción incompleta, se añadió EtSH adicional (3 x 3051 ml) durante las primeras 30 horas de la reacción. Después de 2 días la mezcla se apagó con salmuera (7,5 l). Se separaron las capas y la capa orgánica fue lavada con solución saturada de NaHCO_3 (6 l) y salmuera (6 l),
 10 secada sobre MgSO_4 y concentrada para dar un residuo oleoso. El residuo fue recrystalizado de MTBE/heptano (1:3) para dar una primera cosecha de B2-3. Los licores madre fueron concentrados y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (2:8) para dar una segunda cosecha. Se obtuvo un total de 560 g de B2-3 (38% en dos pasos).

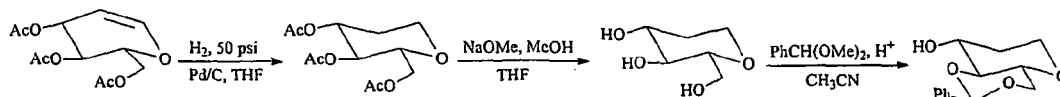
Preparación de B2-4

- 15 Se agregó lentamente NaOMe (25% en peso en MeOH, 119 ml, 519 mmoles) a una solución de B2-3 (579 g, 1,73 moles) en MeOH (2,3 l) a temperatura ambiente. Después de 1 hora, se agregó resina Dowex 50wx8-200 (290 g) y la reacción fue agitada durante 30 minutos. La resina se filtró y desechó y el filtrado se concentró para proporcionar B2-4 sólido (360 g, cuantitativo).

Preparación de B2

- 20 Se trató una solución de B2-4 (360 g, 1,73 moles) en THF (3,5 l) con terc-butóxido de potasio (20% en peso en THF, 3,88 kg, 6,91 moles) a 0° C. Después de 30 minutos, se añadió BnBr (822 ml, 6,91 moles). La reacción se removió a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se enfrió a 10° C. Después de agitarla durante la noche, la reacción se apagó con solución acuosa saturada de NH_4Cl (2 l) y, a continuación, se filtró a través de una almohadilla de Celita. El filtrado se extrajo con EtOAc (5,5 l). La fase orgánica fue lavada con salmuera (4 l) y concentrada. La
 25 purificación por cromatografía eluida con EtOAc/heptano (1:9) proporcionó B2 (460 g, 56%).

Preparación de derivados de B5



Preparación de B5-2

- 30 Una suspensión de B5-1 (184 g, 676 mmoles, Aldrich) y Pd/C (10% en peso, 50% de agua; 19 g) en THF (800 ml) fue hidrogenada a 50 psi durante la noche a temperatura ambiente. El catalizador fue filtrado y desechado a través de una almohadilla a temperatura ambiente durante la noche. El catalizador fue filtrado y desechado a través de una almohadilla de Celita, la almohadilla de filtro se lavó con acetato de etilo y el filtrado combinado se concentró. El residuo se disolvió en acetato de etilo y la solución después se lavó con agua (250 ml), bicarbonato de sodio acuoso (250 ml) y, a continuación, salmuera (250 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró para dar B5-2 como un residuo
 35 oleoso (217 g, cuantitativo).

Preparación de B5-3

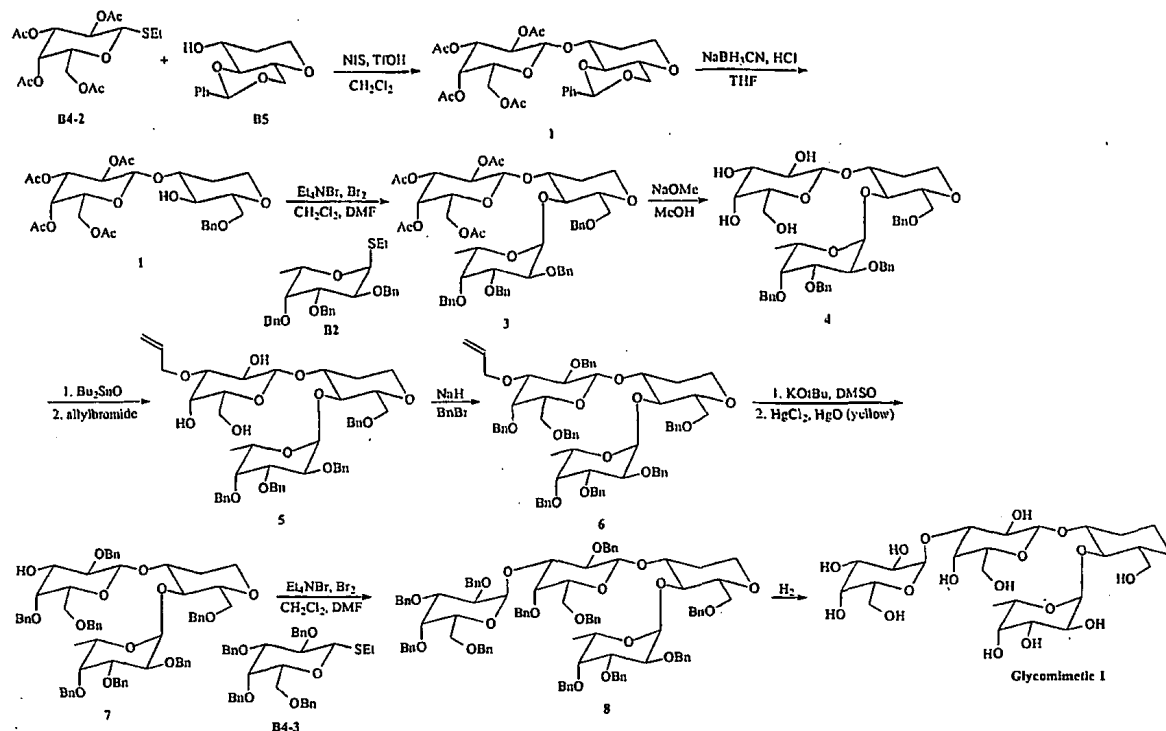
- Se agregó lentamente NaOMe (25% en peso en MeOH, 236 ml, 1,03 moles) a una solución de B5-2 (189 g, 689 mmoles) en MeOH (600 ml) a temperatura ambiente. Después de 2 horas, se añadió resina Dowex 50wx8-200 (320 g) para ajustar el pH a 3,5-4. La resina fue filtrada y desechada y el filtrado se concentró. El residuo fue evaporado azeotrópicamente con tolueno y luego con acetonitrilo para dar B5-3 (102 g, cuantitativo) como un sólido ceroso.
 40

Preparación de B5

- Se trató una suspensión de B5-3 (69 g, 465 mmoles) en CH_3CN (1,2 l) con una solución de benzaldehído dimetil acetal (76,9 ml, 512 mmoles) y una solución del monohidrato del ácido p-toluensulfónico (4,56 g, 24 mmoles) en CH_3CN (75 ml). Después de la agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, la reacción se calentó a reflujo durante 1 hora y luego se enfrió a temperatura ambiente y neutralizó con Et_3N (3 ml). La mezcla se concentró y el residuo se disolvió con EtOAc (800 ml). La solución se lavó con agua (500 ml) y luego salmuera (500 ml), se secó sobre MgSO_4 y se concentró para dar un producto crudo. Este se disolvió en acetato de etilo (100 ml) a 70° C y luego se trató con heptano (270 ml, en porciones de 50 ml). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se filtró para dar
 45

una primera cosecha de B5. La purificación cromatográfica de las aguas madre con gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (3:7) dio una segunda cosecha. Se obtuvo un total de 88 g de B5 (80%).

Preparation del glicomimético 1



5 Preparación del compuesto 1

Una suspensión de B5 (20 g, 87,4 mmoles), B4-2 (40 g 101,6 mmoles) y N-yodosuccinimida (25 g, 110,1 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (230 ml) fue tratada con ácido trifluorometanosulfónico (0,15 moles en CH_2Cl_2 , alrededor de 2 ml; recién preparado antes de su uso) a 0°C hasta que el color cambió de marrón rojizo ligero a marrón oscuro. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 40 minutos y luego se paró con Na_2CO_3 acuoso (8%, 100 ml) a pH 9. Después de dilución con CH_2Cl_2 (100 ml) y agua (100 ml), se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ acuoso (370 ml 10%) y luego salmuera (100 ml), se secó con Na_2SO_4 y se concentró. La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con MTBE/heptano (6:4) dio 1 (40,8 g, 81%) como una espuma.

Preparación del compuesto 2

Una solución de NaBH_3CN (42 g, 670 mmoles) en THF anhidro (280 ml) fue añadida a una solución del compuesto 1 (38 g, 67 mmoles) en THF anhidro (70 ml) a temperatura ambiente. Se añadió después tamiz molecular (3 Å, polvo, seco; 30 g) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos antes de ser enfriada a 0°C . Se añadió HCl (en Et_2O anhidro, preparado antes de su uso; alrededor de 90 ml) lentamente hasta el consumo total del compuesto 1 por CCF. Se agregó Na_2CO_3 sólido (35 g) en porciones a la reacción con enfriamiento de un baño de hielo y la papilla se agitó durante 10 minutos antes de filtrar a través de un filtro de Celita. El filtrado fue diluido con EtOAc (300 ml), lavado con solución de NaHCO_3 acuosa saturada (100 ml) y salmuera (100 ml) y concentrado hasta un aceite amarillo. Este residuo fue dividido entre tolueno (400 ml) y agua (200 ml) pero se formaron tres capas. Se separaron las capas y la capa media fue repetidamente dividida entre tolueno (6 x 400 ml) y agua (6 x 100 ml). Las capas orgánicas combinadas se concentraron para dar el compuesto 2 crudo (35 g). La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (6:4) proporcionó el compuesto 2 (26 g, 68%) como una espuma aceitosa.

Preparación del compuesto 3

Parte 1: se agregó Br_2 (destilado sobre P_2O_5 1,8 ml, 34,8 mmoles) gota a gota a una solución de B2 (13,9 g, 29 mmoles) en CH_2Cl_2 anhidro (30 ml) a 0°C . Después de que la reacción hubiera sido agitada en un baño de hielo durante 40 minutos, se agregó ciclohexeno (4 ml) hasta que el color cambió a un amarillo persistente.

Parte 2: el compuesto 2 (11 g, 19,4 mmoles) fue disuelto en CH_2Cl_2 anhidro (80 ml), seguido de la adición de Et_3NBr (secado a 200°C durante 2 horas bajo N_2 ; 6,1 g, 29 mmoles), DMF anhidra (50 ml) y tamices moleculares (4 Å polvo seco; 12 g). Después de que la mezcla de reacción hubiera sido agitada a temperatura ambiente durante 30

minutos, fue añadida la solución de la parte 1. La mezcla de reacción se agitó durante 40 horas a temperatura ambiente y luego se diluyó con EtOAc (100 ml) y se filtró a través de un filtro de celita. El filtrado fue lavado con Na₂S₂O₃ acuoso (10%, 100 ml), agua (100 ml) y luego salmuera (100 ml), secado con Na₂SO₄ y concentrado. La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (1:1) dio el compuesto 3 (15 g, 78%) como una espuma aceitosa.

Preparación del compuesto 4

NaOMe (0,5 molar en MeOH, 4,6 ml, 2,24 mmoles) fue agregado a una solución del compuesto 3 (11 g, 11,2 mmoles) en MeOH (30 ml) a temperatura ambiente. Después de 3 horas, se agregó AcOH (1 ml) y se llevó a pH 4. La mezcla se concentró para dar un crudo compuesto 4 (9,2 g, cuantitativo), utilizado sin purificación adicional en el siguiente paso.

Preparación del compuesto 5

Una mezcla del compuesto 4 (9,2 g, 12,3 mmoles) y óxido de dibutilestaño (3,92 g, 15,8 mmoles) en MeOH anhidro (150 ml) se calentó a reflujo durante 4 horas y luego la reacción se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en tolueno (150 ml, anhidro) en un recipiente seco. Fueron añadidos bromuro de tetrabutilamonio (3,65 g, 7,91 mmoles) y bromuro de alilo (1,6 ml, 18,1 mmoles). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 4 horas, se enfrió y después se concentró. El residuo fue purificado mediante cromatografía en gel de sílice eluida con EtOAc/CH₂Cl₂ (7:3) para dar el compuesto 5 (6,4 g, 67% en el total de los dos pasos).

Preparación del compuesto 6

Una solución del compuesto 5 (6,3 g, 7,35 mmoles) en DMF anhidra (30 ml) fue añadida a una suspensión de NaH (1,47 g, 36,8 mmoles, 60% en aceite mineral) en DMF anhidra (30 ml) a 0° C. Después de que la reacción había sido agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, se enfrió a 0° C y se añadió BnBr (3,95 ml, 33,1 mmoles). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se paró con MeOH (1,5 ml) con un baño de hielo. Se añadieron agua (20 ml) y solución acuosa enfriada con hielo de HCl (1 M, 100 ml), seguida por extracción con CH₂Cl₂ (200 ml). Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con agua (200 ml), solución acuosa saturada de NaHCO₃ enfriada con hielo (100 ml) y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (1:4) proporcionó el compuesto 6 (6,36 g, 78%).

Preparación del compuesto 7

Se agregó KOtBu (1,57 g, 14,0 mmoles) a una solución del compuesto 6 (6,3 g 5,59 mmoles) en DMSO (40 ml) a temperatura ambiente. La papilla se calentó a 100° C en un baño de aceite precalentado 2 horas. Después de que la reacción se hubo enfriado a temperatura ambiente, se agregó CH₂Cl₂ (150 ml) y agua (100 ml). Las capas se separaron y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 100 ml) y, a continuación, salmuera (100 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron hasta un residuo (6,4 g). Este fue disuelto con acetona (40 ml) y agua (4 ml), se agregó HgO (amarillo; 3,3 g, 15,1 mmoles) seguido de una solución de HgCl₂ (anhidro; 3,3 g, 12,3 mmoles) en acetona (40 ml) y agua (4 ml) gota a gota. Después de 30 minutos, la mezcla se filtró a través de un filtro de celita y el filtrado fue concentrado. El residuo se dividió entre CH₂Cl₂ (200 ml) y solución saturada acuosa de NaI (30 ml). La capa orgánica se lavó con agua (100 ml) y, a continuación, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (1:4) proporcionó 7 (4,35 g, 72%) como un aceite amarillo.

Preparación del compuesto 8

Parte 1: se agregó Br₂ (destilado sobre P₂O₅ 0,39 ml, 7,59 mmoles) gota a gota a una solución de B4-3 (4,03 g, 6,9 mmoles) en CH₂Cl₂ anhidro (10 ml) a 0° C. Después de que la reacción hubiera sido agitada en un baño de hielo durante 40 minutos, se agregó ciclohexeno (1 ml) hasta que el color cambió a un amarillo persistente.

Parte 2: el compuesto 7 (3,75 g, 3,45 mmoles) fue disuelto en CH₂Cl₂ anhidro (25 ml) y, a continuación se agregó, Et₄NBr (secado a 200° C durante 2 horas bajo N₂, 1,45 g, 6,9 mmoles), DMF anhidra (15 ml) y tamices moleculares (polvo de 4 Å seco; 4 g). Después de que esta mezcla hubiera sido agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió la solución de la parte 1. La reacción se agitó durante 60 horas a temperatura ambiente y luego se diluyó con EtOAc (50 ml) y se filtró a través de un filtro de celita. El filtrado se lavó con Na₂S₂O₃ acuoso (10%, 50 ml), agua (30 ml) y, a continuación, salmuera (30 ml), se secó en Na₂SO₄ y concentró. La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con EtOAc/heptano (1:3) dio el compuesto 8 (3,94 g, 71%) como una espuma.

Preparación del glicomimético 1

Una suspensión del compuesto 8 (3,9 g, 2,42 mmoles) y Pd(OH)₂/C (20% en peso, humectado al 50% con agua; 2 g) en MeOH (150 ml), 1,4-dioxano (15 ml), y AcOH (5 ml) fue hidrogenada a 60 psi a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla fue filtrada a través de un filtro de celita y el filtrado se concentró. La purificación cromatográfica sobre gel de sílice eluida con CH₂Cl₂/MeOH/H₂O (10:9:1) dio el glicomimético 1 (1,05 g, 70%) como un sólido blanco.

Ejemplo 2

SÍNTESIS DE GLICOMMETICO (COMPUESTO XXVIII)

Las estructuras químicas se representan en las figuras 3A-3B.

- 5 Síntesis del producto intermedio XXIV: A una solución del compuesto XVIII (0,8 g) en acetonitrilo (10 ml) se agregó benzaldehidodimetilacetil (0,5 g) y ácido p-toluensulfónico (0,2 mg) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 6 horas. Se agregó trietilamina (0,2 ml) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos. El disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el producto intermedio XXIV.
- 10 Síntesis del producto intermedio XXV : A una solución del compuesto XXIV (0,5 g) en DMF (5 ml) se agregó hidruro de sodio (0,1 g, suspensión al 60% en aceite) sin dejar de agitar. Se agregó bromuro de bencilo (0,2 ml) gota a gota a la mezcla de reacción anterior y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió metanol (0,5 ml) con agitación y la mezcla de reacción se concentró a sequedad. Se añadió diclorometano (50 ml) y la capa orgánica se lavó sucesivamente con HCl 1N frío, solución de bicarbonato sódico y agua fría. La capa orgánica se secó (sulfato de sodio), filtró y concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXV.
- 15 Síntesis del producto intermedio XXVI: A una solución fría de XXV (0,4 g) en THF (5 ml) se agregó cianoborohidruro de sodio (0,1 g). Se agregó una solución fría de HCl en éter gota a gota hasta que paró la efervescencia (pH 2-3). La mezcla de reacción se diluyó con éter (50 ml) y se lavó sucesivamente con una solución acuosa fría de bicarbonato de sodio y agua fría. El disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXVI.
- 20 Síntesis del producto intermedio XXVII: A una solución de los compuestos XXVI (0,1 g) en diclorometano-DMF (2 ml) se agregó tamices moleculares (4 Å, 0,1 g) y bromuro de tetraetilamonio (0,05 g) y se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente bajo argón. A esta mezcla de reacción se agregó el compuesto XVI (0,1 g) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas bajo argón. La mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (10 ml) y se lavó sucesivamente con solución saturada de bicarbonato de sodio fría y agua; luego se secó (sulfato de sodio), filtró y concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXVII.
- 25 Síntesis del compuesto XXVIII: A una solución del compuesto XXVII (0,06 g) en dioxano-agua (6:1, 5 ml) se añadió ácido acético (10 gotas) y Pd-C al 10% (0,06 g). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente bajo hidrógeno durante 20 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de celita y el disolvente se eliminó por evaporación. El residuo se purificó pasándolo a través de una columna de sephadex G-10 para dar el compuesto XXVIII.
- 30

Ejemplo 3

SÍNTESIS DE GLICOMIMÉTICO (COMPUESTO XXXIII)

- 35 Las estructuras químicas se representan en las figuras 3A-3B.
- 40 Síntesis del producto intermedio XXIX: A una solución del compuesto XVIII (2 g) en piridina (20 ml) se agregó cloruro de terc-butildimetilsialilo (0,6 g) y se agitó la solución a temperatura ambiente durante 16 horas. El disolvente se eliminó por evaporación y el residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXIX.
- 45 Síntesis del producto intermedio XXX: A una suspensión de los compuestos XXIX (1 g) en α,α -dimetoxi propano (10 ml) se añadió ácido canforsulfónico (0,2 g) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Se agregó la trietilamina (0,2 ml) y el disolvente se eliminó por evaporación. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXX.
- 50 Síntesis del producto intermedio XXXI: El compuesto XXX (0,8 g) se hizo reaccionar con el compuesto XVI (0,8 g) de igual forma como se describió en el ejemplo 2 para dar el compuesto XXXI.
- Síntesis de producto intermedio XXXII: A una solución del compuesto XXXI (0,5 g) en acetonitrilo (5 ml) se agregó trietilamina (0,1 ml) y una solución de H_2SiF_6 (0,5 ml, 35%) en acetonitrilo (1 ml). Después de 2 horas, la mezcla de reacción se diluyó con diclorometano (50 ml) y se lavó con solución saturada de bicarbonato de sodio fría y agua fría, después se secó (sulfato de sodio), filtró y concentró a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXXII.
- Síntesis del compuesto XXXIII: una solución de los compuestos XXXII (0,2 g) en ácido acético al 60% en agua se calentó a 60° C durante 1 hora. El disolvente se eliminó por evaporación y el producto bruto se disolvió en dioxano-agua (5 ml, 6:1). Se agregó ácido acético (10 gotas) seguido por Pd-C al 10%. La suspensión se agitó bajo

hidrógeno durante 24 horas, se filtró (filtro de celita) y concentró a sequedad. El residuo se purificó pasando a través de una columna de sephadex G-1 0 para dar el compuesto XXXIII.

Ejemplo 4

SÍNTESIS DE GLICOMIMETICO (COMPUESTO XXXVII)

5 Las estructuras químicas se representan en las figuras 3A-3B.

Síntesis del producto intermedio XXXIV: una solución de XXIX (1 g) en DMF se trató con NaH (0,14 g) y bromuro de bencilo (0,4 ml) en igual forma que se describió en el ejemplo 2 y se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice) para dar el compuesto XXXIV.

10 Síntesis del producto intermedio XXXV: el compuesto XXXIV (1 g) se trató con H_2SiF_6 de la misma forma que se describió en el ejemplo 3 para dar compuesto XXXV.

Síntesis del compuesto intermedio XXXVI: el producto intermedio XXXV (0,5 g) se hizo reaccionar con el compuesto intermedio XVI (0,4 g) como se describió en el ejemplo 2 para dar el compuesto XXXVI.

Síntesis del compuesto XXXVII: el compuesto intermedio XXXVI (0,3 g) se hidrogenó como se describió en el ejemplo 2 y purificó por medio de sephadex G-10 para dar el compuesto XXXVII.

15 Ejemplo 5

ENSAYO PARA LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA PA-IL.

Los pocillos de una placa de microtítulo (placa 1) se recubren de PA-IL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por incubación durante 2 horas a 37° C. Los pocillos se bloquean después durante 2 horas mediante la adición de seroalbúmina bovina (BSA) diluida al 1% en TBS-Ca (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 7,4) mezclada 1:1 v/v con Stabilcoat (Surmodics, Eden Prairie, MN). En una segunda placa de microtítulo de fondo redondo de baja unión (placa 2), los antagonistas del ensayo son diluidos en serie en 1% BSA en TBS-Ca /Stabilcoat (60µl/pocillo). Los conjugados preformados de α -galactosa-PAA-Biotina (GlycoTech Corp, Gaithersburg, MD) mezclado con estreptavidina-HRP (KPL Labs, Gaithersburg, MD) se agregan a cada pocillo de la placa 2 (60µl/pocillo de 2 µg/ml). La placa 1, a continuación, se lava con TBS-Ca y 100 µl/pocillo se transfieren de la placa 2 a la placa 1. Después de incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, se lava la placa 1 y 100 µl del reactivo TMB (KPL Labs, Gaithersburg, MD) se añade a cada pocillo. Después de la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, la reacción se para mediante la adición de 100 µl/pocillo de 1 M H_3PO_4 y la absorbancia de la luz a 450 nm se determina mediante un lector de placas de microtítulo.

Ejemplo 6

30 ENSAYO PARA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE PA-IIL

Pocillos de una placa de microtítulo (placa 1) se recubren de PA-IIL (Dr. Wimmerova, Universidad de Masaryk, Brno, República Checa) mediante incubación durante 2 horas a 37° C. Los pocillos se bloquean después durante 2 horas por la adición de 1% de albúmina de suero bovino (BSA) diluida en TBS-Ca (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ pH 7,4) mezclada 1:1 v/v con Stabilcoat (Surmodics, Eden Prairie, MN). En una segunda placa de microtítulo de fondo redondo de baja unión (placa 2), los antagonistas del ensayo son diluidos de forma seriada en 1% BSA en TBS-Ca/Stabilcoat (60µl/pocillo). Los conjugados preformados de fucosa-PAA-biotina (GlycoTech Corp, Gaithersburg, MD) mezclado con estreptavidina-HRP (KPL Labs, Gaithersburg, MD) se agregan a cada pocillo de la placa 2 (60µl/pocillo de 2 µg/ml). La placa 1, a continuación, se lava con TBS-Ca y 100 µl/pocillo se transfieren de la placa 2 a la placa 1. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la placa 1 se lava y 100 µl del reactivo TMB (KPL Labs, Gaithersburg, MD) se añaden a cada pocillo. Tras la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente, la reacción se para mediante la adición de 100 µl/pocillo de H_3PO_4 1M y la absorbancia a 450 nm se determina mediante un lector de placas de microtítulo.

Ejemplo 7

ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE LECTINA DE PA-I O PA-II A LAS CÉLULAS BUCALES

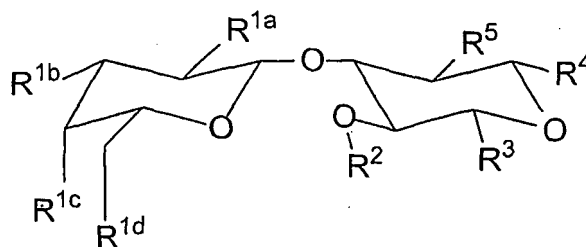
45 Obtener muestra de células bucales por raspado dentro de la mejilla y recoger en 2 ml de PBS. Centrifugar las células a 400 g durante 7 minutos para generar una pellet de células. Eliminar el sobrenadante. Resuspender en TBS-Ca frío (50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ pH 7,4) para la concentración celular de 10^6 células / ml. Alícuotas de 0,1 ml a cada tubo. Agregar PA-I o PA-II biotinilado a tubos (5 µl/pocillo de 1,0 mg/ml lectina). Añadir inhibidores a los tubos (5 µl a la concentración deseada). Incubar en hielo durante 30 minutos. Lavar las células una vez agregando 400 µl de TBS-Ca frío para cada tubo y centrifugar a 400 g durante 7 minutos. Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en 100 µl de TBS-Ca frío. Añadir estreptavidina-FITC (2 µl/tubo de 1 mg/ml, KPL Labs, Gaithersburg, MD). Incubar 30 minutos en hielo. Lavar las células una vez agregando 400 µl de TBS-Ca

ES 2 375 979 T3

frio para cada tubo y centrifugar a 400 g durante 7 minutos. Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en 500 µl de TBS-Ca frío. Analizar por citometría de flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o su sal fisiológicamente aceptable, que tiene la fórmula



en donde:

5 el -O- que separa los dos anillos en la fórmula está en un enlace 1-3 alfa o beta;

R^1 = se selecciona independientemente de OH, NHAc y galactosa unida por un enlace O glicosídico, con la condición de que tres de los cuatro R^1 se seleccionen independientemente de OH y NHAc y un R^1 no sea OH o NHAc;

R^2 = una fucosa;

10 R^3 = $-CH_2-OH$

R^4 = H; y

R^5 = H.

2. El compuesto o su sal según la reivindicación 1, en donde R^{1a} no es OH o NHAc.

3. El compuesto o su sal según la reivindicación 1, en donde R^{1b} no es OH o NHAc.

15 4. El compuesto o su sal según la reivindicación 1, en donde R^{1c} no es OH o NHAc.

5. El compuesto o su sal según la reivindicación 1, en donde R^{1d} no es OH o NHAc.

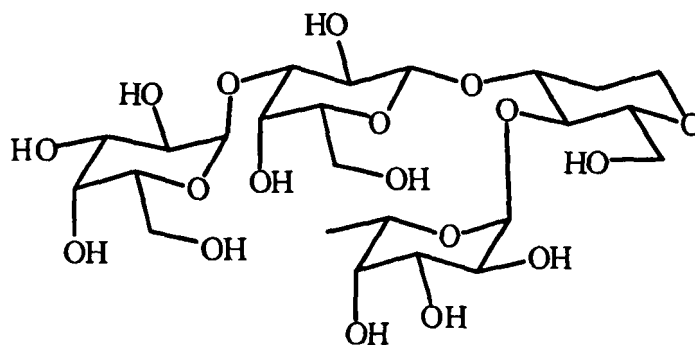
6. El compuesto o su sal según la reivindicación 1, en donde el -O- que separa los dos anillos en la fórmula está en un enlace 1-3 beta

20 7. El compuesto o su sal según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto o su sal está en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

8. Un conjugado que comprende un agente terapéutico unido a un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

9. El conjugado de la reivindicación 8, en donde el conjugado está en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.

25 10. El compuesto o su sal según la reivindicación 1, en donde el compuesto es de la fórmula



11. El compuesto o su sal según la reivindicación 10, en donde el compuesto o su sal está en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.
12. Un conjugado que comprende un agente terapéutico unido a un compuesto según la reivindicación 10.
13. El conjugado de la reivindicación 12, en donde el conjugado está en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 5 14. El uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para la preparación de una composición para inhibir la infección por bacterias de *Pseudomonas* en un animal de sangre caliente
15. El uso de la reivindicación 14, en donde el compuesto está unido a un agente terapéutico.
- 10 16. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, en donde el compuesto está en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptables.
17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, en donde el compuesto está en combinación con otro compuesto antibacteriano.
18. El uso de la reivindicación 14, en donde la bacteria es la *Pseudomonas aeruginosa*.
- 15 19. Un método para detectar la bacteria de *Pseudomonas* que comprende poner en contacto una muestra con un agente de diagnóstico ligado a un compuesto que comprende un compuesto según la reivindicación 1, en condiciones suficientes para que el compuesto se una a la bacteria o sus productos de lectina si están presentes en la muestra; y detectar al agente presente en la muestra, en donde la presencia del agente en la muestra es indicativa de la presencia de la bacteria de *Pseudomonas*.
20. El método de la reivindicación 19, en donde la bacteria es la *Pseudomonas aeruginosa*.
- 20 21. Un método para inmovilizar a la bacteria de *Pseudomonas* sobre un soporte sólido que comprende poner en contacto, en condiciones suficientes para la unión, una muestra que contenga la bacteria de *Pseudomonas* con un compuesto que comprende un compuesto según la reivindicación 1 que se encuentra inmovilizado en un soporte sólido; y separar la muestra del soporte sólido.
- 25 22. Un compuesto o su sal según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 10-11, para uso en un método para inhibir la infección bacteriana de *Pseudomonas* o en un método para detectar la bacteria de *Pseudomonas*.
23. El uso de un compuesto o su sal según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o 10-11, para la preparación de un medicamento para inhibir la bacteria de *Pseudomonas*.

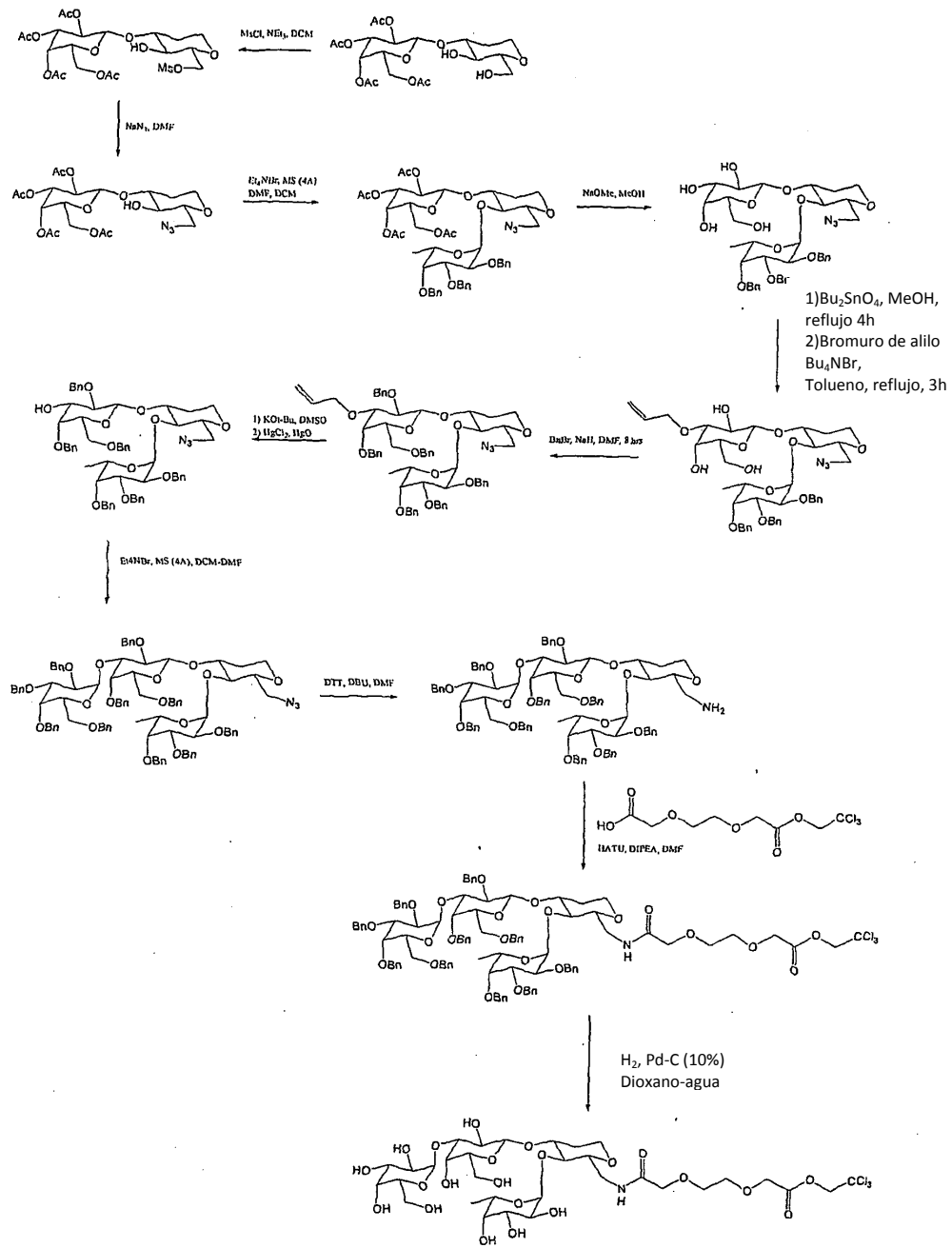


Fig. 2A

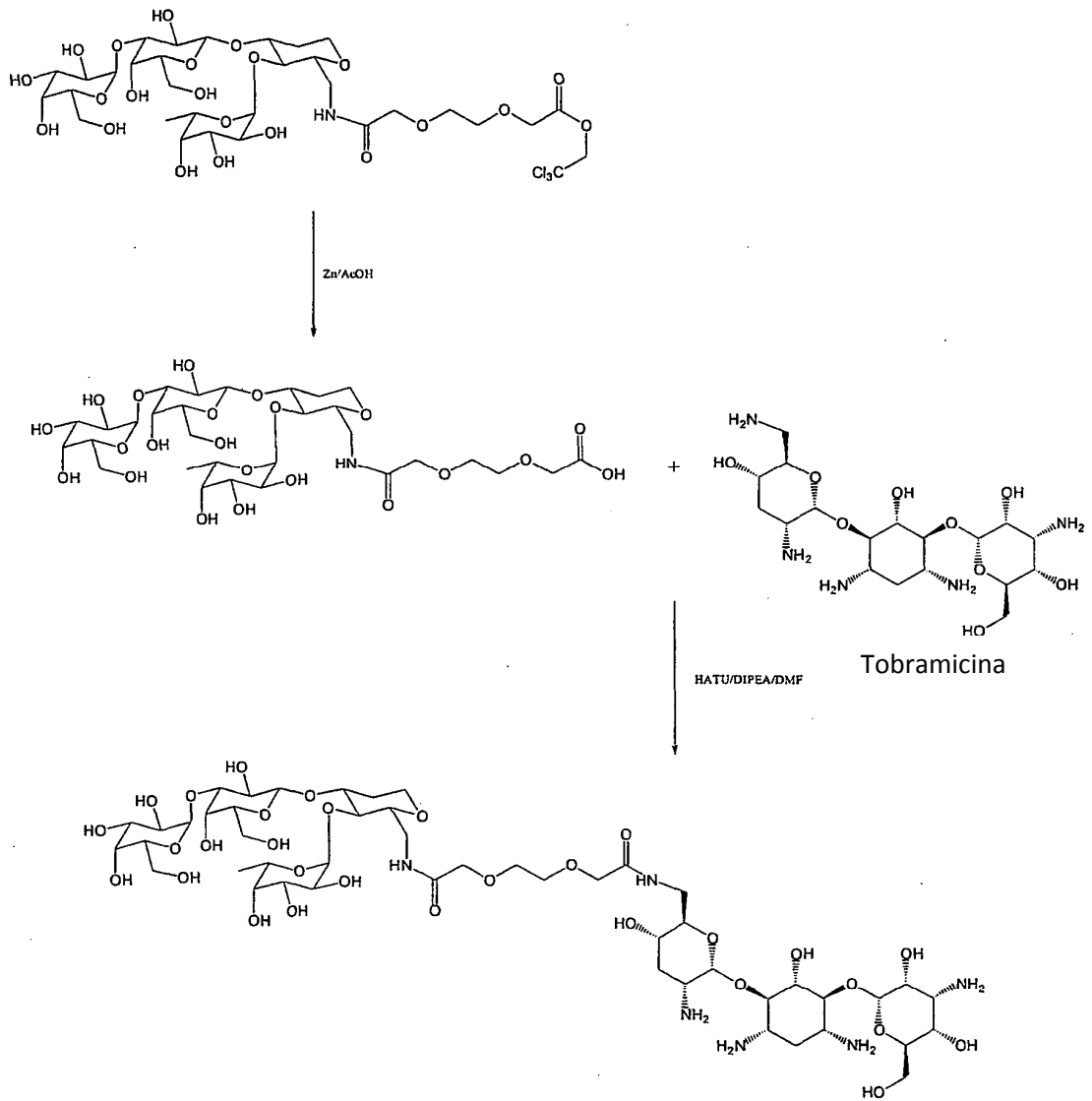
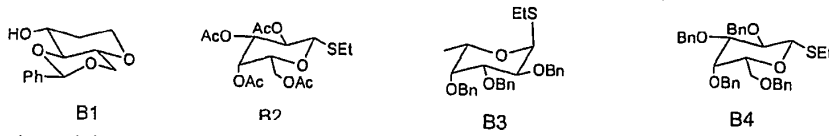
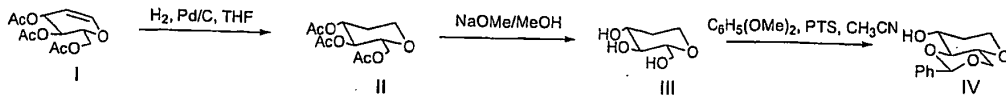


Fig. 2B

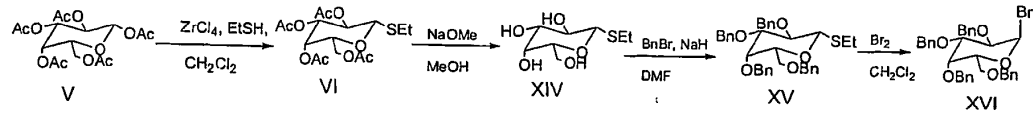
Estructuras



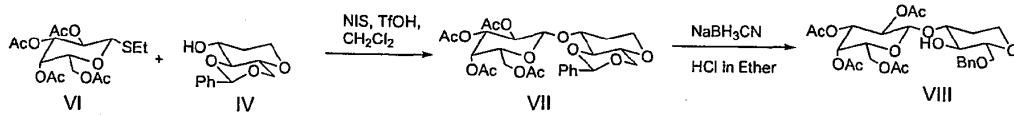
Síntesis de la estructura B1



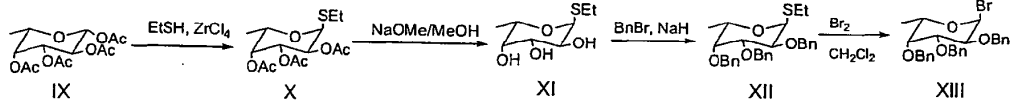
Síntesis de la estructura B2



Síntesis del derivado de disacárido



Síntesis de la estructura B3



Síntesis del derivado de trisacárido

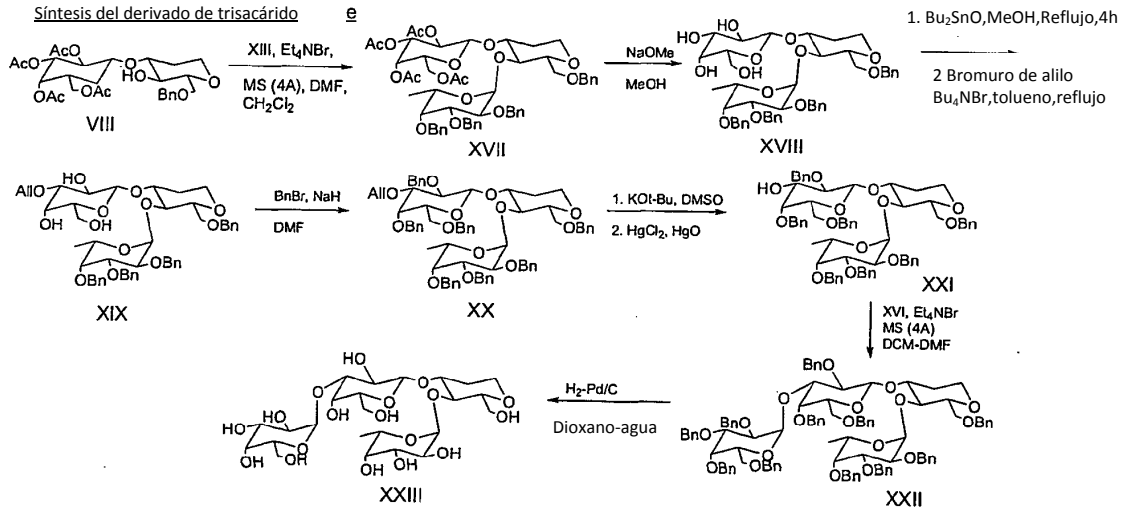


Fig. 3A

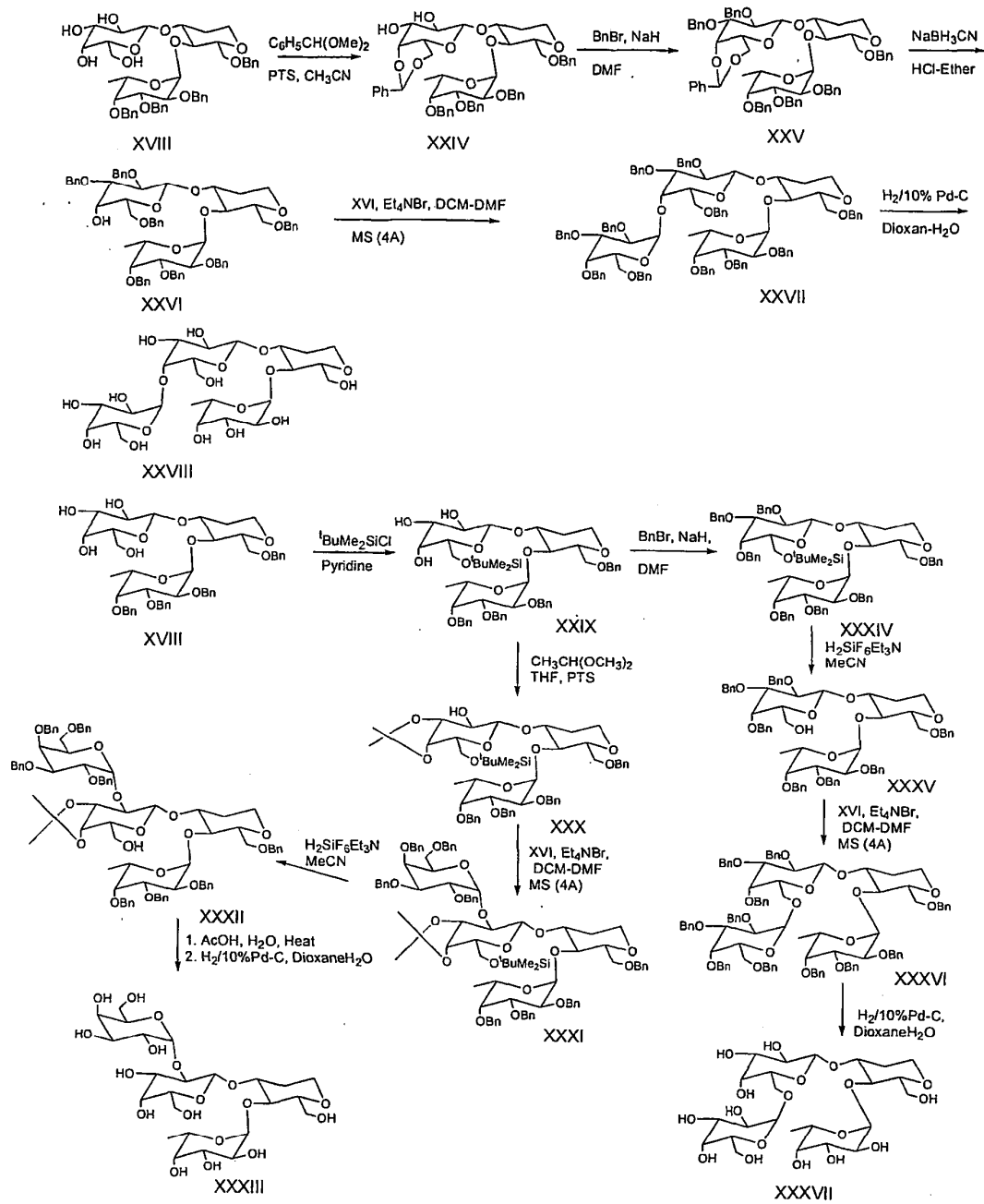
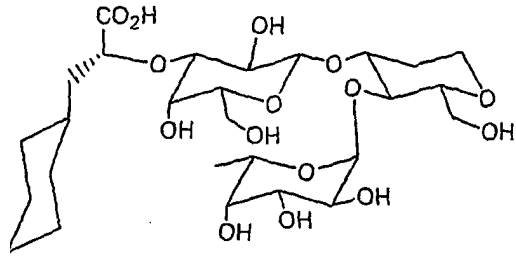
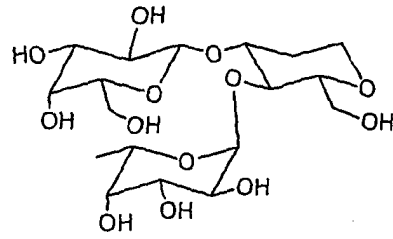


Fig. 3B

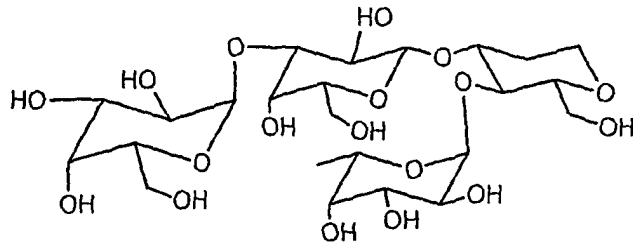
Estructuras para los ensayos de lectina



COMPUESTO A

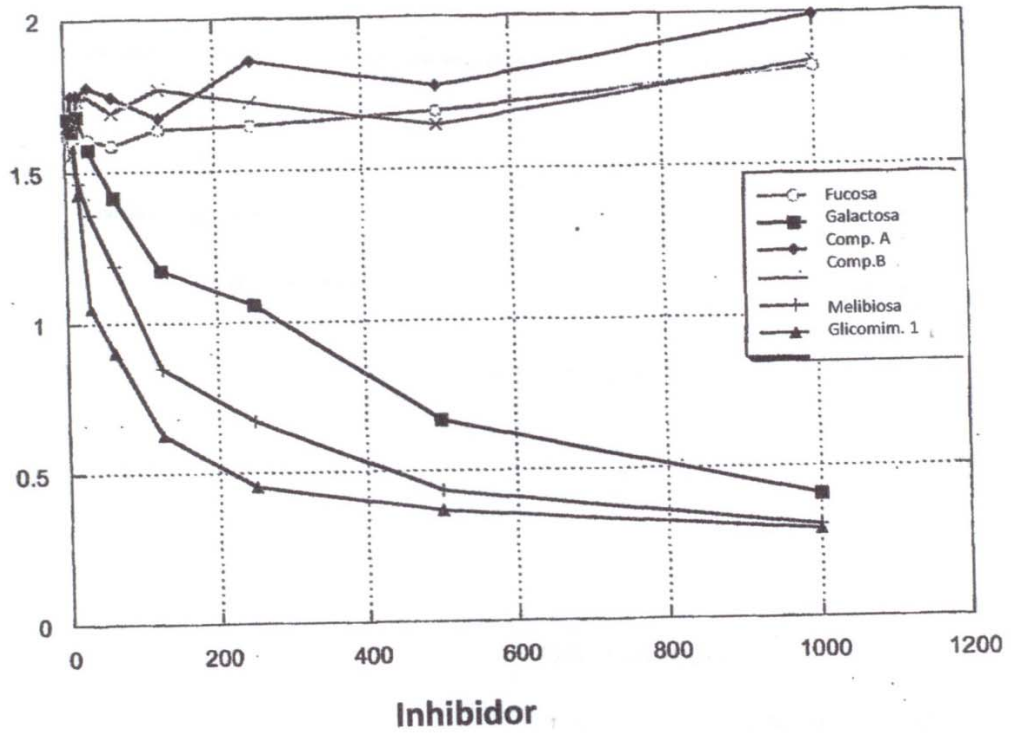


COMPUESTO B



GLICOMIMÉTICO 1

Fig. 4



| Compuesto | IC ₅₀ (μM) |
|-----------------|-----------------------|
| Galactosa | 277 |
| Melibiosa | 111 |
| Glicomimético 1 | 47 |

Fig. 5

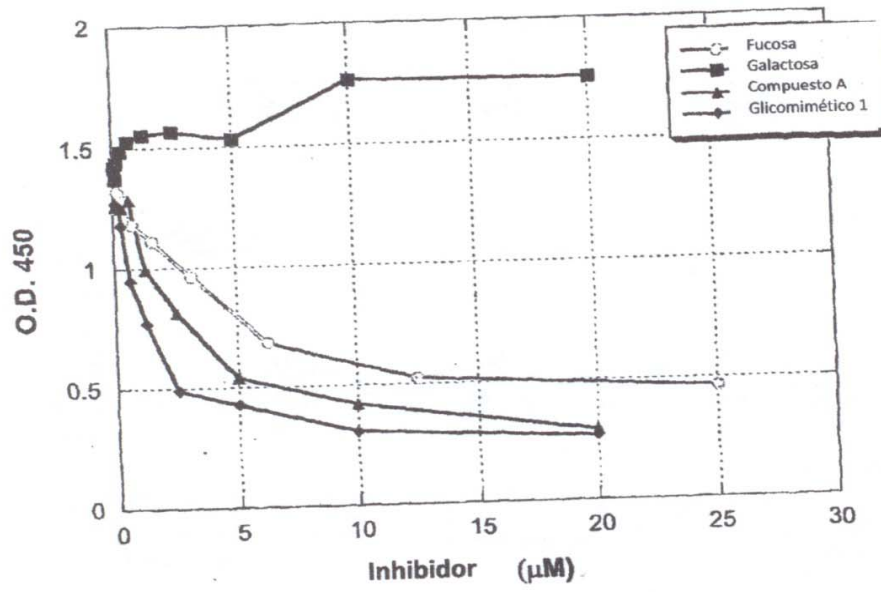
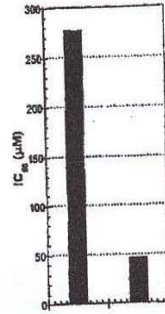
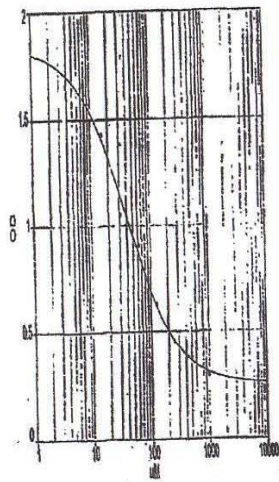


Fig. 6

Glicomimético 1

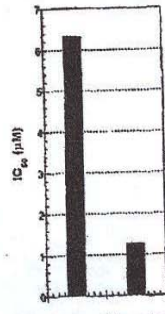
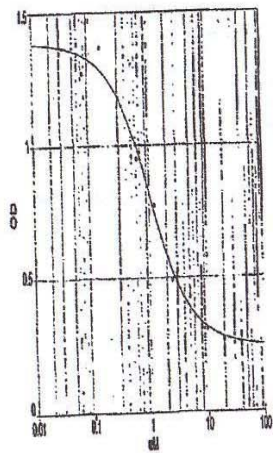


La fucosa es inactiva

Galactosa. Glicomim.1

Fig. 7

Glicomimético 1



La galactosa es inactiva

Fucosa Glicomim.1

Fig. 8

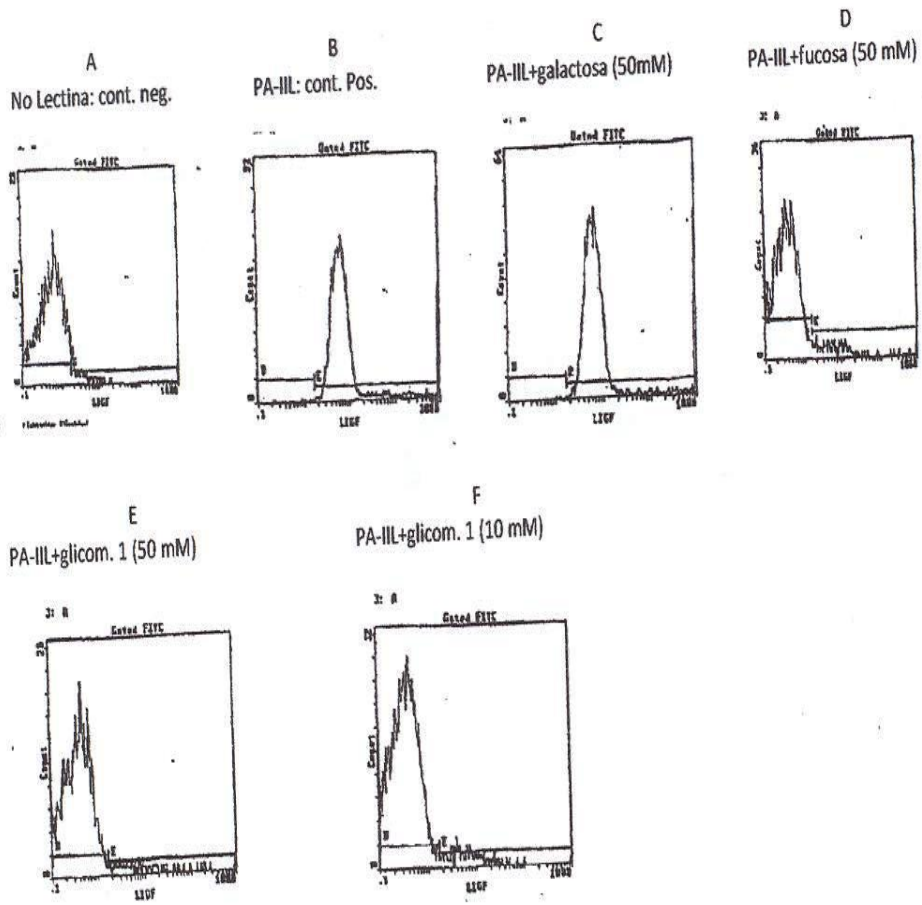


Fig. 9