

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 363**

51 Int. Cl.:

C07H 3/06 (2006.01)

C07H 5/06 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10812804 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2649085**

54 Título: **Compuestos glicomiméticos como agentes antiinfecciosos frente a lectinas patógenas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2014

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)**

3, rue Michel Ange

75794 Paris Cedex 16, FR;

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (33.3%)

y

UNIVERSITÉ LILLE 2 - DROIT ET SANTÉ (33.3%)

72 Inventor/es:

IMBERTY, ANNE;

VIDAL, SÉBASTIEN;

MATTHEWS, SUSAN;

FAURE, KARINE;

GUERY, BENOIT y

CECIONI, SAMY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 524 363 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

Compuestos glicomiméticos como agentes antiinfecciosos frente a lectinas patógenas

La presente invención se refiere a compuestos glicomiméticos como agentes infecciosos contra patógenos que usan lectinas en la primera etapa de infección.

5 *Pseudomonas aeruginosa*, también denominado el bacilo piocianico, es una bacteria gramnegativa que vive en medios húmedos y en el suelo. Está asociada con actividades humanas, y está presente en la cocina, en el baño, en los hospitales, etc. Esta bacteria oportunista es responsable de varias infecciones intrahospitalarias en pacientes inmunocomprometidos, una población que está creciendo con el mayor número de transplantes. En Francia, *P. aeruginosa* ha sido responsable de 8% de infecciones intrahospitalarias durante el período de agosto de 2001 a junio de 2006 (Institut de veille sanitaire, BHE 30-31, 2008). Es una causa habitual de infección de quemaduras, pero también ojos y oídos, y también es responsable de la mayoría de la colonización en dispositivos médicos tales como catéteres.

15 La bacteria *P. aeruginosa* es también un agente etiológico principal de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (CF). En la mayoría de los casos, los pacientes con CF sufren infección pulmonar crónica cuando alcanzan el desarrollo adolescente. Estas infecciones son la causa principal de morbilidad. Una vez se ha establecido la infección crónica, es muy difícil o incluso imposible erradicarla debido a la aparición de muchas cepas que presentan multiresistencia a antibióticos. La formación de biopelículas de *P. aeruginosa* que dan como resultado resistencia a la inmunidad del hospedante y a antibióticos también complica el enfoque terapéutico. La aparición rápida de muchos microorganismos patógenos que presentan resistencia frente a compuestos farmacéuticos tales como agentes antiviricos o antibióticos es una preocupación importante para la salud pública. Ahora es urgente la necesidad de estrategias terapéuticas alternativas.

25 *P. aeruginosa* produce un gran número de receptores de proteínas que son capaces de reconocer específicamente hidratos de carbono. Estos receptores, denominados lectinas, desempeñan un papel en la adhesión al tejido del hospedante y en la formación de biopelículas. Las lectinas se producen en forma soluble en la bacteria, o están presentes en el ápice de orgánulos adhesivos. LecA (PA-IL) y LecB (PA-IIL) son lectinas solubles que se producen en el citoplasma de *P. aeruginosa*, pero también se han detectado en gran cantidad en la membrana externa de las células bacterianas. LecA y LecB son ambas proteínas tetrámeras, y reconocen galactosa y fucosa, respectivamente, de una forma dependiente del calcio (Gilboa-Garber, Methods Enzymol. 1982, 83, 378-385). Se consideran como factores de virulencia para las bacterias, y son coexpresadas con enzimas y otras proteínas durante la infección. Se ha demostrado que LecA es tóxico para las células de las vías respiratorias (Bajolet-Laudinat et al. Infect. Immun. 1994, 62, 4481-4487), y también desempeña un papel en la formación y estabilización de la biopelícula de las bacterias. LecB también está implicada en la formación de biopelículas (Tielker et al., Microbiology 2005, 151, 1313-1323), e inhibe el movimiento ciliar en células del pulmón en cultivo (Adam et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1997, 155, 2102-2104).

35 En muchos casos, el proceso infeccioso se inicia mediante el reconocimiento específico de glicoconjugados de los epitelios del hospedante por receptores bacterianos denominados lectinas. La especificidad de estas lectinas por hidratos de carbono determina la focalización por hospedantes y tejidos. La etapa de reconocimiento es seguida por la adhesión, un proceso que acciona muchas rutas celulares tanto en las bacterias como en el hospedante, influyendo por lo tanto en la siguiente etapa de invasión y colonización. El bloqueo de la adhesión por glicocompuestos que actúan como análogos solubles de glicoconjugados (denominados aquí "glicomiméticos" en oposición a los azúcares o glicoconjugados naturales) es por lo tanto una posible estrategia frente a la infección. Tales glicomiméticos entran en competición con los glicoconjugados naturales presentes en los tejidos humanos, y de este modo bloquean la adhesión bacteriana y el desarrollo de colonias. La caracterización de la interacción entre las lectinas bacterianas y los glicoconjugados de los hospedantes ha sido una etapa necesaria para el diseño de glicomiméticos que pueden interferir en el proceso, y por lo tanto limitar la adhesión bacteriana y/o la formación de biopelículas.

50 Los hidratos de carbono y los derivados son una fuente prometedora de compuestos antiinfecciosos, puesto que muchas infecciones se inician mediante la adhesión de los microorganismos sobre la superficie de la célula huésped. En lugar de exterminar a las bacterias mediante antibióticos, un procedimiento que induce la aparición de cepas resistentes, la alternativa propuesta es interferir con el proceso de adhesión. La caracterización de los oligosacáridos naturales implicados en la adhesión bacteriana ayuda en el diseño de análogos solubles (es decir, los glicomiméticos) que son capaces de competir con los glicoconjugados de la superficie celular. Las ventajas de los glicomiméticos antibacterianos son su uso local y su ausencia de toxicidad. Además, el riesgo de resistencia es débil puesto que no afecta directamente al metabolismo de las bacterias. Finalmente, tales compuestos se pueden usar conjuntamente con otros tratamientos, tales como antibióticos.

55 Los compuestos glicomiméticos son así una ruta de interés para inhibir la adhesión de patógenos a tejidos humanos, y algunos de ellos ya se han desarrollado para infección bacteriana que afecta al aparato gastrointestinal, al aparato urinario, u a los oídos. Recientemente, los glicomiméticos diseñados contra FimH, una lectina presente en los pelos

de *E. coli* uropatógena, demostraron que no sólo bloquean la adhesión de las bacterias en los epitelios de la vejiga sino que también inhiben la producción de biopelículas (Wellens et al., PLoS One. 2008, 3, 2040).

Los documentos WO 2005/089733, WO 2007/021721 y WO 2007/143052 describen oligosacáridos dirigidos contra algunas infecciones bacterianas.

5 Sin embargo, cuando se desarrollan glicomiméticos, se ha de recordar que se requiere una fuerte afinidad a fin de obtener una competición eficiente con los glicoconjugados de la superficie celular, y no siempre es fácil de desarrollar tales glicomiméticos. Las interacciones de lectina-hidratos de carbono se caracterizan a menudo por una baja afinidad (intervalo milimolar), y esto ha sido una barrera importante en el desarrollo de compuestos glicomiméticos biológicamente activos. Se ha demostrado que la multivalencia es una estrategia eficiente para incrementar significativamente la interacción entre los compuestos y la diana. Se han usado varios enfoques, oscilando desde valencia baja para los glicoconjuntos hasta valencia elevada para los glicodendrimeros o glicopolímeros. Los glicodendrimeros dirigidos contra FimH demostraron ser eficientes como compuestos anti-adhesivos frente a *E. coli* uropatógena (Touaibia et al., ChemMedChem. 2007, 2, 1190-1201). Recientemente se usaron glicodendrimeros que presentan fucosa para dispersar biopelículas de varias cepas de *P. aeruginosa* (Johansson et al., Chem Biol 2008, 15, 1249-1257). Estos resultados confirman el potencial del glicomimético para combatir infecciones bacterianas, y demuestran que se pueden usar como estrategias anti-adhesión.

10 Recientemente, los inventores de la presente invención han publicado (Cecioni et al. Chem. Eur. J. 2009, 15, 13232-13240) compuestos glicomiméticos que son glicoconjugados de calixareno y que se evaluaron como ligandos para la lectina que se une a la galactosa PA-IL de la bacteria oportunista *P. aeruginosa*. Los resultados muestran que un glicoconjugado de calixareno que posee cuatro azúcares es el inhibidor más potente para la unión de PA-IL a superficies galactosiladas para aplicaciones potenciales como agente anti-adhesivo.

20 Los resultados interesantes obtenidos en este trabajo han alentado a los inventores a proseguir su búsqueda a fin de encontrar algunos compuestos nuevos que presenten propiedades anti-adhesivas y que tengan afinidad elevada por lectinas bacterianas.

25 Sin embargo, el hallazgo de tales compuestos no es fácil. La afinidad de los glicomiméticos por las lectinas, y por lo tanto su eficiencia, no depende solamente del número de azúcares presentados por los glicoconjugados de calixareno, es decir, la valencia, sino también de la longitud y flexibilidad de los ligadores de los glicoconjugados de calixareno, conectando dichos ligadores el resto de azúcar al resto de calixareno. Basándose en el resto de calixareno que proporciona valencia que varía de 1 a 4, es necesario por lo tanto desarrollar nuevas clases de moléculas, basándose en nuevos ligadores que provean de propiedades diferentes a los compuestos glicomiméticos finales.

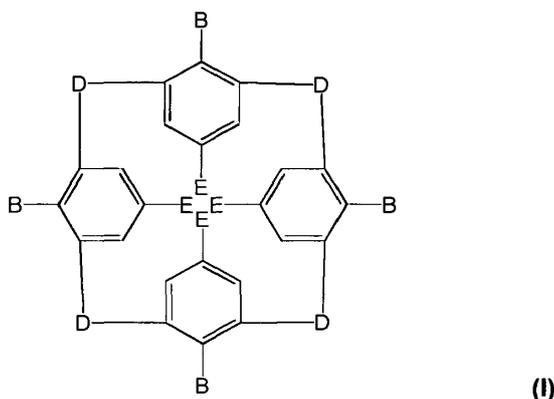
30 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de un nuevo desarrollo para obtener nuevos compuestos glicomiméticos que tengan afinidad elevada frente a lectinas de patógenos, y actividad antiinfecciosa.

35 Un objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos glicomiméticos capaces de bloquear selectivamente la lectina A y/o la lectina B de *Pseudomonas aeruginosa*.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos glicomiméticos capaces de limitar la adhesión de patógenos, y por lo tanto con fuerte actividad antimicrobiana.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar nuevos compuestos glicomiméticos capaces de inhibir la formación de biopelículas, y por lo tanto de interés como compuesto antiinfeccioso frente a bacterias mucoides.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) que tiene la fórmula:



en la que

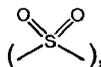
ES 2 524 363 T3

D se selecciona independientemente del grupo que comprende un grupo -CH₂-, un átomo de oxígeno (-O-), un átomo de azufre (-S-), un grupo sulfinilo



o un grupo sulfonilo

5

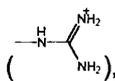


E se selecciona independientemente del grupo que comprende un hidrógeno (-H), un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo que tiene de 6 a 20 átomos de carbono, un grupo dióxido de nitrógeno

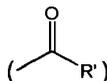


un grupo azida (-N=N⁺=N⁻), un grupo amino (-NH₂), un grupo guanidinio

10



un átomo de halógeno, un grupo -CH₂R en el que R es un hidroxilo (OH), un halogeno, un grupo amino, un grupo N(alquilo)₂, un grupo NH(alquilo), o E representa un -CO-R'



en la que R' es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un amino,

15

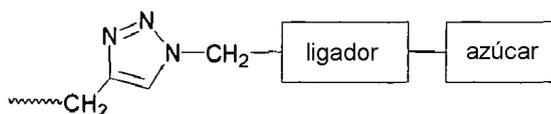
B representa un grupo A-C en el que

A se selecciona independientemente del grupo que comprende un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NH o un grupo (CH₂)_i, siendo i un número entero de 1 a 10,

C se selecciona independientemente del grupo que comprende un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, un alquinilo,

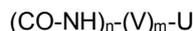
20

o C es un grupo de fórmula:



en la que

el ligador es un grupo de fórmula:



25

en la que

n es un número entero de 1 a 3,

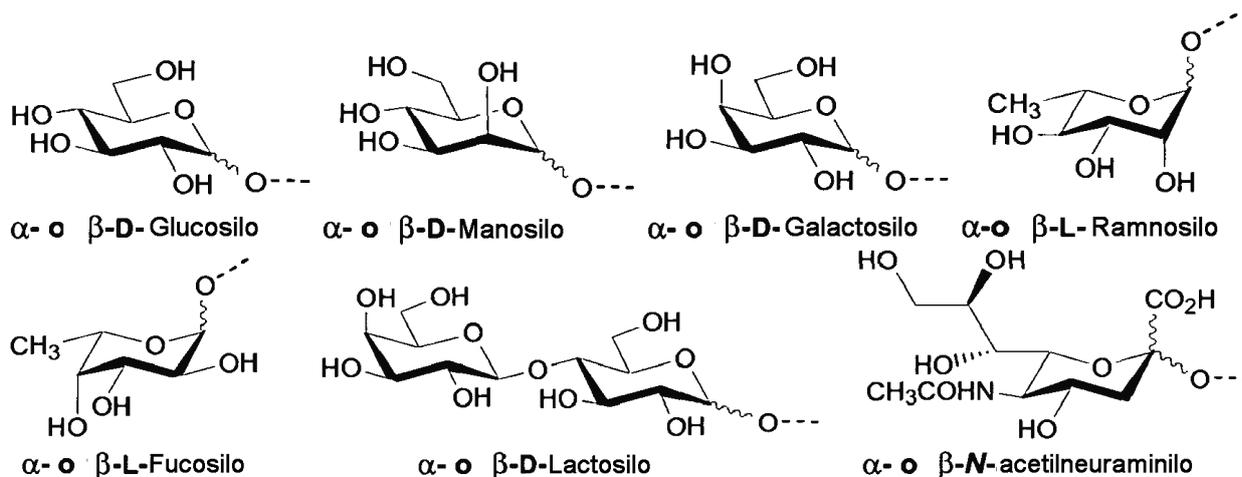
V = CH₂, C₆H₄ (fenilo "Ph"), CH₂-CH₂-O-CH₂, CH₂-CO-NH-CH₂,

m es un número entero de 1 a 15,

U está ausente o es CH₂,

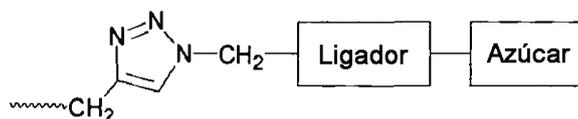
30

el azúcar es un grupo que tiene al menos un resto de hidrato de carbono y se selecciona del grupo que comprende:



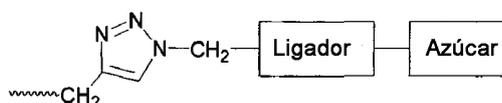
o sus derivados,

- 5 y en la que al menos uno de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representa el grupo de fórmula



como se define anteriormente.

- 10 El compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define en la presente solicitud también se podría definir como un compuesto glicomimético que comprende un núcleo que tiene al menos un brazo y como máximo cuatro brazos, estando representado el brazo por el siguiente grupo C

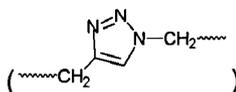


definiéndose el núcleo como el resto de la fórmula (I).

- 15 La expresión "compuesto glicomimético", como se usa en la presente solicitud, se refiere más particularmente a un compuesto (incluyendo sus sales fisiológicamente aceptables) que tiene afinidad elevada por la Lec A, Lec B o por ambas lectinas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

La originalidad de la presente invención está en la estructura particular del ligador que está constituido en dos partes.

La primera parte del ligador (situada próxima al resto triazólico



- 20 es un enlace de amida (-CONH-); este enlace de amida plano proporciona cierta rigidez a la primera parte del ligador, y permite una presentación óptima de los brazos (número variable de 1 a 4) con respecto al sitio de unión a lectina.

- 25 La segunda parte del ligador (situada próxima al resto de hidrato de carbono) es variable, y está representada por la estructura (V)_m-U como se define anteriormente. Esta segunda parte variable del ligador puede representar un grupo que comprende también un enlace amídico, un resto etilenglicólico o un resto aromático. Estas segundas partes variables tendrán diferentes flexibilidades, y por lo tanto pueden presentar diferentes afinidades con respecto a las lectinas.

- 30 Se mostró que las interacciones de los glicomiméticos recientemente diseñados con LecA desempeñan mayores afinidades en comparación con los compuestos no funcionalizados con amida previamente dados a conocer (Cecioni et al., 2009). Puesto que las afinidades medidas están mejoradas para tales glicomiméticos recientemente diseñados, las propiedades anti-adhesivas de tales moléculas se pueden por lo tanto imaginar realmente.

El término “alquilo”, como se usa aquí, se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada, ramificada o no ramificada, monorradicálica, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono. Este término se ejemplifica mediante grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-hexilo, n-octilo, terc-octilo, n-decilo, y similares.

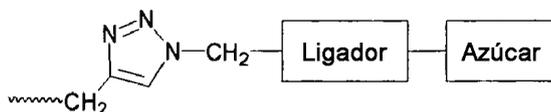
- 5 El término “arilo” se refiere a un grupo carboxílico aromático insaturado, de 6 a 20 átomos de carbono, que tiene un único anillo o múltiples anillos condensados (fusionados). Este término se ejemplifica mediante grupos tales como fenilo, naftilo, y similares.

El átomo de halógeno se ejemplifica mediante un flúor (F), un cloro (Cl), un bromo (Br) o un yodo (I).

- 10 El término “alqueno”, como se usa aquí, se refiere a un monorradical de grupo hidrocarbonado insaturado, ramificado o no ramificado, que tiene preferiblemente de 2 a 10 átomos de carbono, y que tiene de 1 a 6 sitios de insaturación vinílica. Este término está ejemplificado por grupos tales como etenilo (-CH=CH₂), n-propenilo (-CH₂-CH=CH₂), iso-propenilo (-C(CH₃)=CH₂), y similares.

- 15 El término “alquino” se refiere a un monorradical de un hidrocarburo insaturado que tiene preferiblemente de 2 a 10 átomos de carbono y que tiene al menos de 1 a 2 sitios de insaturación acetilénica (triple enlace). Este término se ejemplifica mediante grupos tales como etinilo (-C≡CH), propargilo (-CH₂-C≡CH), y similares.

Cuando uno de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representa el siguiente grupo mencionado anteriormente:



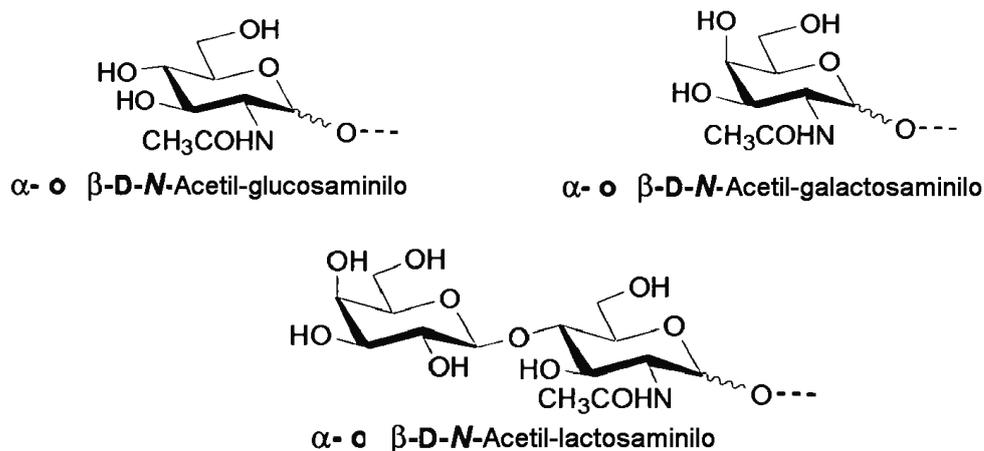
- 20 entonces el mencionado compuesto glicosilado a base de calixareno (I) también se puede denominar compuesto glicosilado a base de calixareno (I) “monovalente”.

Cuando dos de los cuatro grupos C representan tal grupo, el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) se denomina “divalente”.

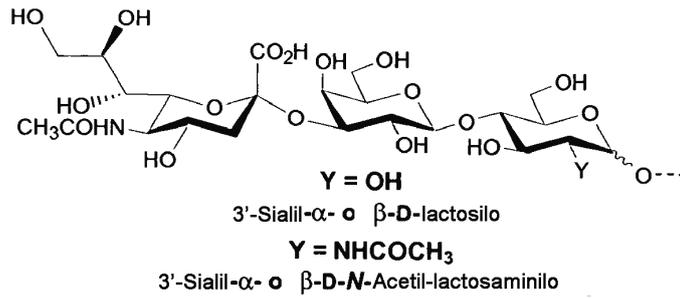
Cuando tres de los cuatro grupos C representan tal grupo, el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) se denomina “trivalente”.

- 25 Cuando los cuatro grupos C representan tal grupo, el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) se denomina “tetralente”.

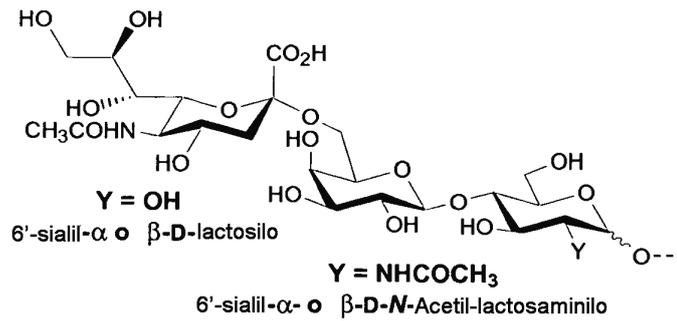
Ventajosamente, los derivados de azúcar mencionados anteriormente en el grupo C se seleccionan del grupo que comprende:



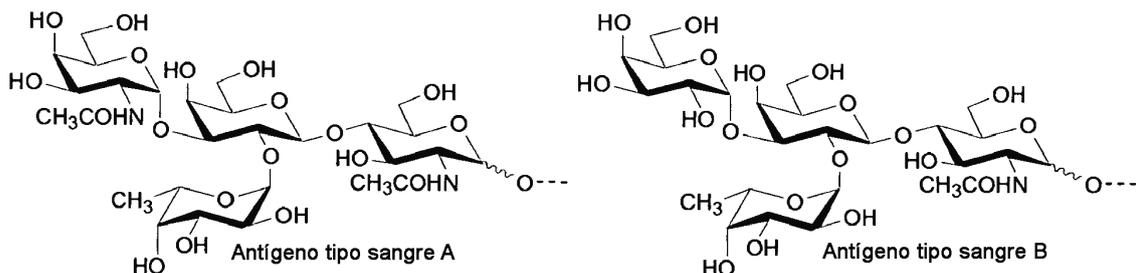
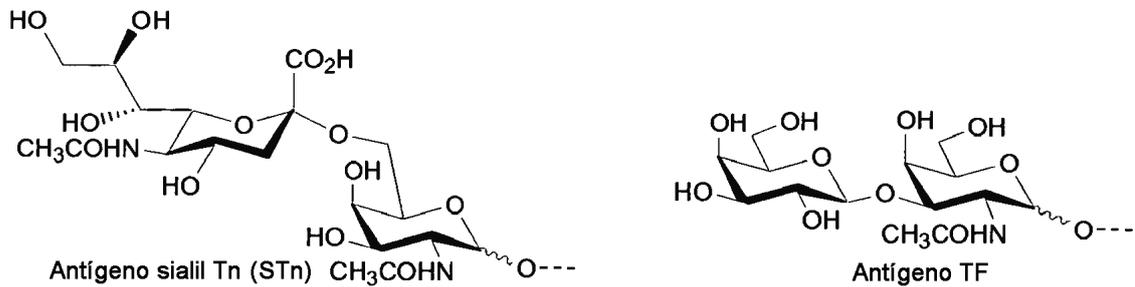
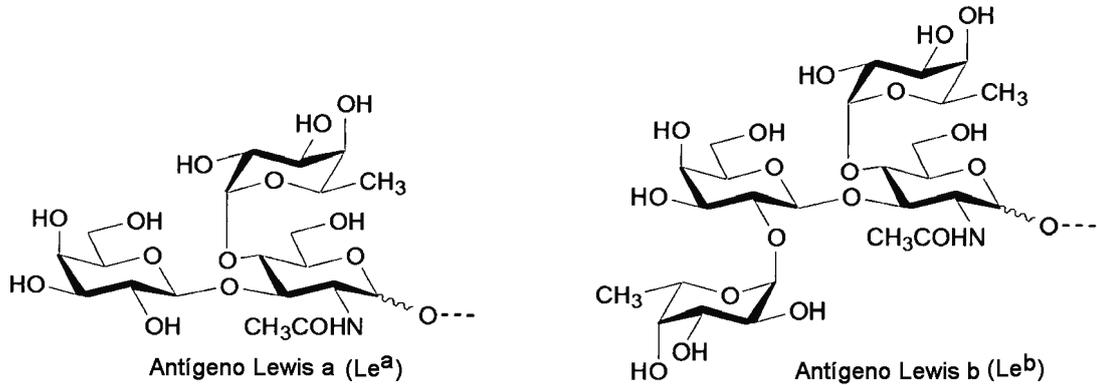
30

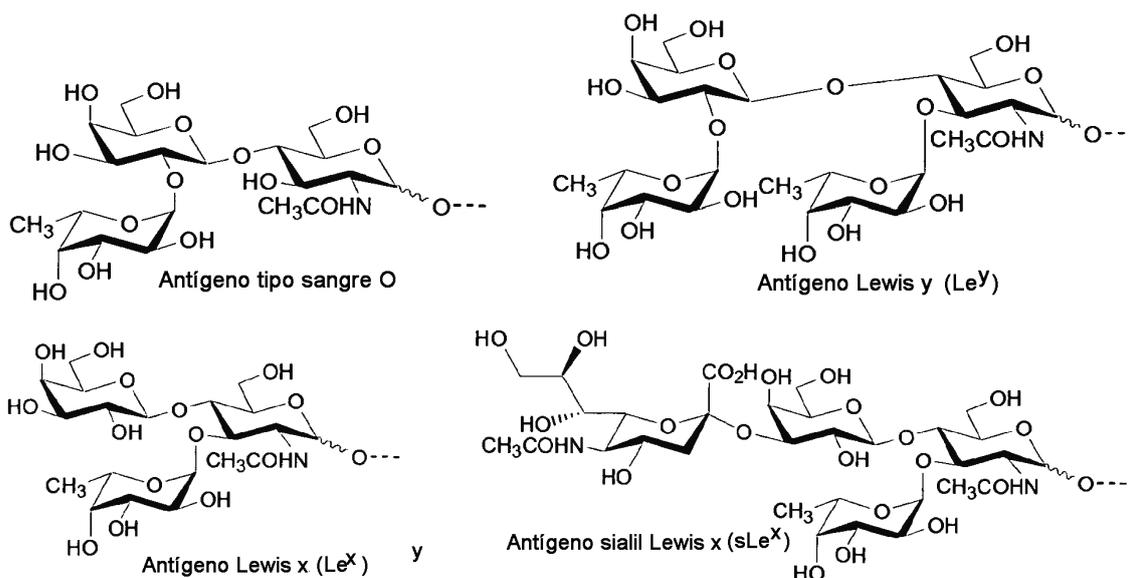


y



5 En otro aspecto, los derivados de azúcar mencionados anteriormente en el grupo C se seleccionan del grupo que comprende:



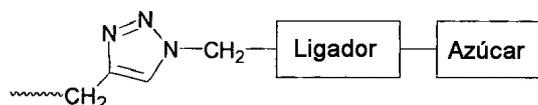


En aún otro aspecto, se selecciona el azúcar definido en el grupo C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I), en el que el azúcar definido en el grupo C se selecciona del grupo que comprende β -D-galactosilo, α -D-mannosilo y α -L-fucosilo. Ventajosamente, el azúcar es el β -D-galactosilo.

Ventajosamente, el ligador definido en el grupo C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) se selecciona del grupo que comprende:

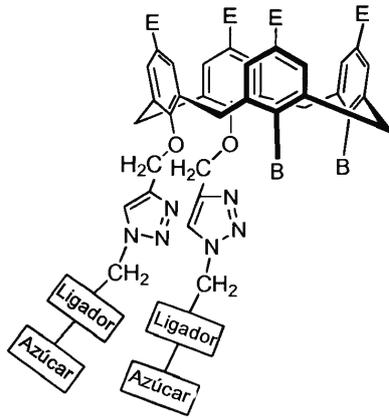
- $n = 1, m = 1, V = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2, U = \text{CH}_2,$
que corresponde al siguiente ligador: $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2;$
- 10 • $n = 1, m = 1, V = \text{C}_6\text{H}_4$ ("Ph"), $U =$ ausente,
que corresponde al siguiente ligador: $\text{CO-NH-C}_6\text{H}_4;$
- $n = 1, m = 1, V = \text{CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2, U = \text{CH}_2,$
que corresponde al siguiente ligador: $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2.$

Ventajosamente, la presente invención proporciona un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define previamente, en el que dos de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representan el grupo de fórmula:

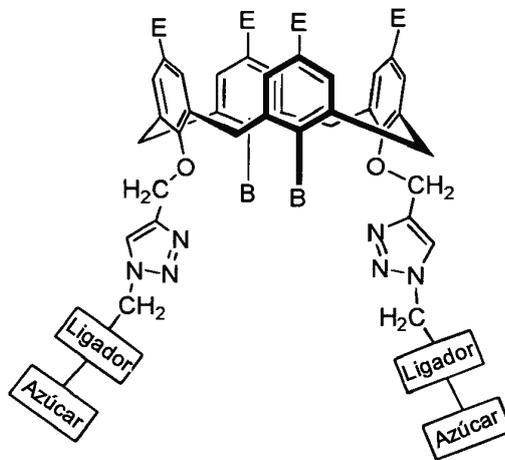


El compuesto glicosilado a base de calixareno (I) divalente así definido anteriormente se puede representar mediante uno de los siguientes patrones de sustitución:

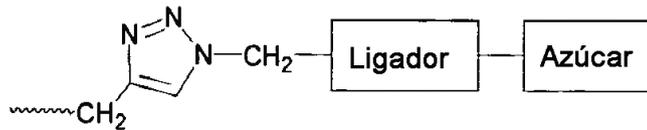
- 20 - el 1,2-disustituido:



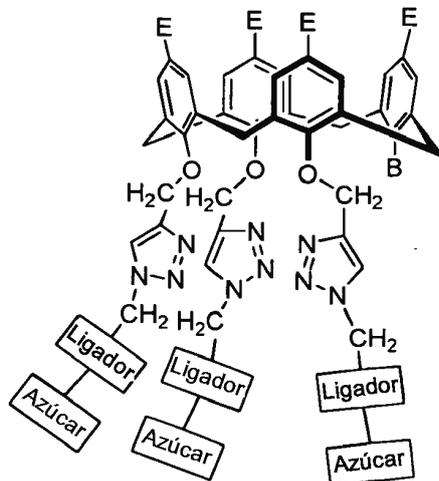
- el 1,3-disustituido



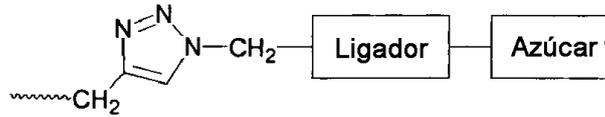
5 En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define previamente, en el que tres de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representan el grupo de fórmula:



El compuesto glicosilado a base de calixareno (I) trivalente así definido anteriormente se puede representar mediante la siguiente conformación trisustituida:

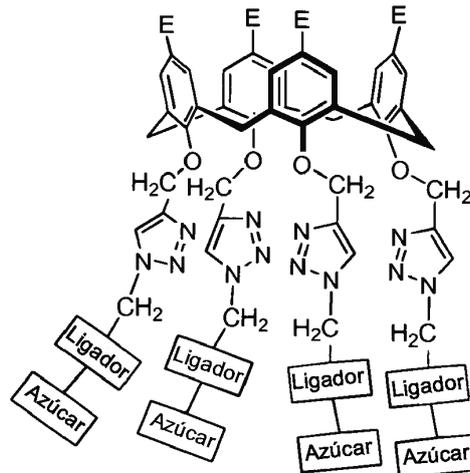


En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define previamente, en el los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representan el grupo de fórmula:

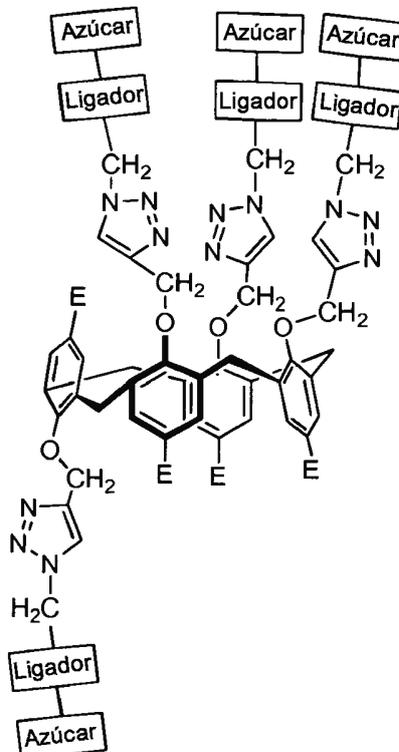


5 El compuesto glicosilado a base de calixareno (I) tetravalente así definido anteriormente se puede representar mediante una de las cuatro conformaciones siguientes:

- la conformación de cono:

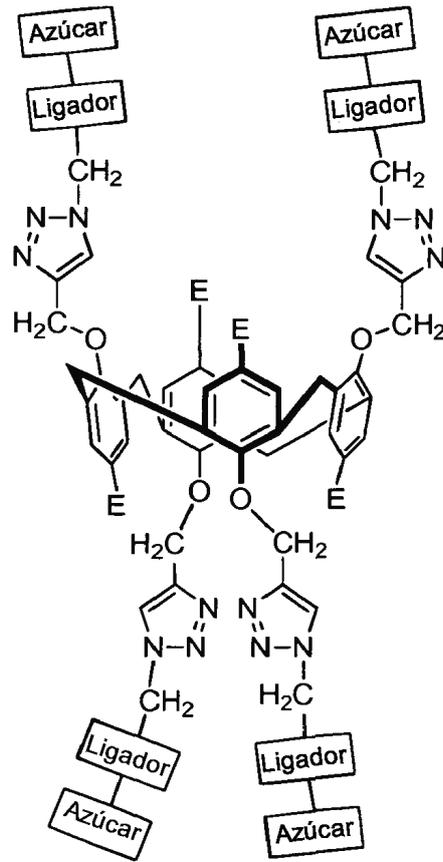


- la conformación de cono parcial:

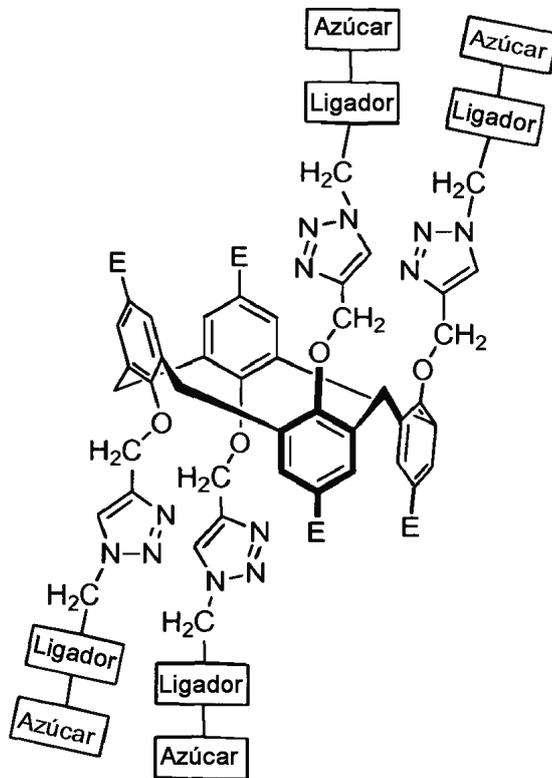


10

- la conformación 1,3-alterna:



- la conformación 1,2-alterna:



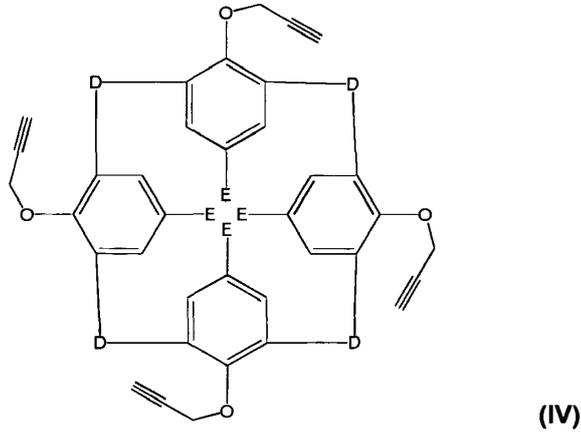
5 Ventajosamente, la presente invención proporciona un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define previamente en el que D representa un grupo $-\text{CH}_2-$, E representa un grupo alquilo que es un grupo terciario, y A definido en el grupo B del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representa un átomo de oxígeno.

Otra ventaja del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según la invención está en el hecho de que se puede obtener fácilmente, según metodologías sintéticas ajustables y variables.

Según todavía otro aspecto, la invención también proporciona un procedimiento para la preparación de un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define anteriormente, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

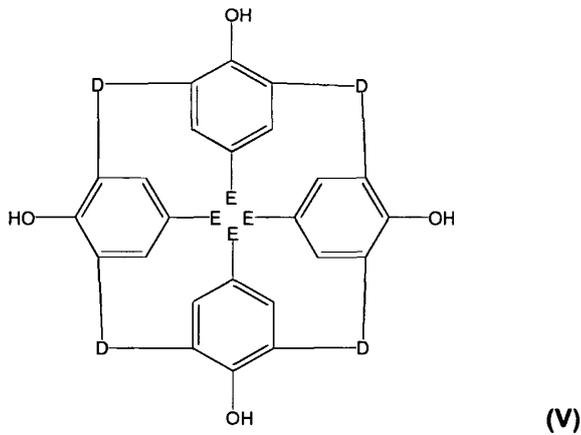
5

(a) Preparar un calix[4]areno propargilado de fórmula (IV):



en la que D y E son como se definen en la reivindicación 1,

mediante multipropargilación regioselectiva de un calix[4]areno de fórmula (V):



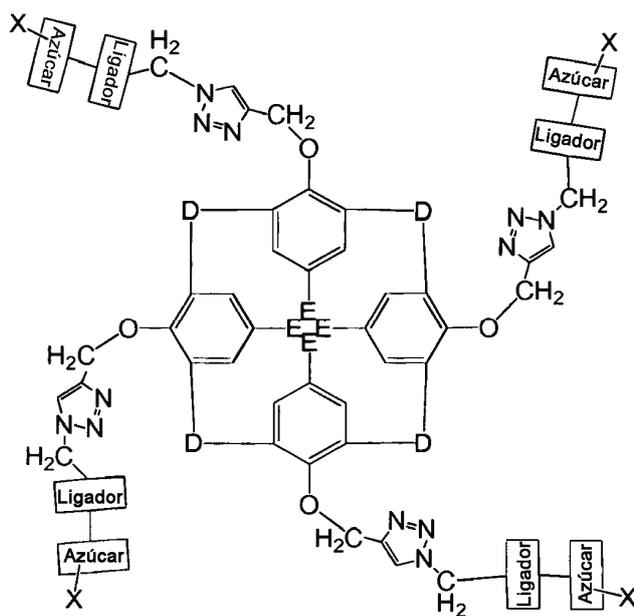
10

con un compuesto propargilado de fórmula (VI):



en presencia de una base, para obtener el calix[4]areno propargilado (IV),

(b) preparar un compuesto glicosilado a base de calixareno protegido de fórmula (II):



(II)

en la que

el ligador y el azúcar son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

5 X representa un grupo protector seleccionado del grupo que comprende acetato (CH_3CO), benzoato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$) o bencilo ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$), y este grupo protector está unido al átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo del azúcar (véase la fórmula del azúcar como se representa previamente),

mediante conjugación del calix[4]areno propargilado (IV) como se obtiene en la etapa previa con un derivado de hidrato de carbono de fórmula (III) que posee una funcionalidad azido próxima al extremo del ligador:



10 preparándose el mencionado hidrato de carbono mediante glicosilación con un ligador que posee una función alcohol en un extremo y una función azido en el otro extremo.

(c) Obtener el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 mediante desprotección de los grupos protectores del mencionado compuesto glicosilado a base de calixareno protegido de fórmula (II).

15 La base que se puede usar con los compuestos (V) y (VI) puede ser NaH en DMF (conformación de cono) o K_2CO_3 y después Cs_2CO_3 . Entonces se obtiene una mezcla de conformaciones de cono parcial y 1,3-alterna, que se pueden separar mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice, conduciendo a dicho calix[4]areno propargilado (IV).

20 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica caracterizada por que comprende un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define previamente, en combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

En todavía un aspecto adicional de la invención, la composición farmacéutica así definida también comprende un agente terapéutico útil como agente antiinfeccioso frente a patógenos que usan lectinas en las primeras etapas de infección.

25 Este agente terapéutico es, por ejemplo, un agente terapéutico para infección por *P. aeruginosa*, tal como infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, infección por quemaduras en medios hospitalarios, e infección de llagas en geriátricos.

La presente invención también proporciona un compuesto glicoconjugado a base de calixareno (I), o una composición farmacéutica como se define previamente, para uso como agente infeccioso dirigido contra otros patógenos que usan lectinas para la adhesión a células hospedantes, tales como el virus de la gripe.

30 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un compuesto glicoconjugado a base de calixareno (I), o una composición farmacéutica como se define previamente, para la fabricación de un fármaco destinado a prevenir o tratar infecciones bacterianas de patógenos que usan lectinas en las primeras etapas de infección.

Tal fármaco actúa como agente antiinfeccioso dirigido contra lectinas de patógenos.

En otro aspecto de la invención, los compuestos glicosilados a base de calixareno (I) mencionados anteriormente, y las composiciones farmacéuticas o fármacos que comprenden estos compuestos, se usan mediante la vía respiratoria o pulmonar.

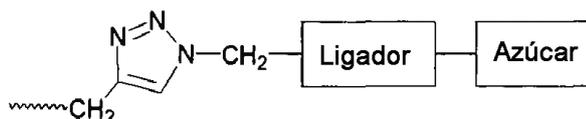
- 5 Estos compuestos, fármacos o composiciones se inhalan o instilan en el aparato respiratorio para prevenir o tratar infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en particular pacientes con CF o pacientes con respiración asistida y que a menudo son víctimas de infecciones intrahospitalarias.

10 En un aspecto adicional de la invención, los compuestos glicosilados a base de calixareno (I) mencionados anteriormente, las composiciones farmacéuticas o fármacos que comprenden estos compuestos se usan mediante la vía local o sobre una venda para prevenir o tratar infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en particular para quemaduras o escaras.

15 Las nuevas características de la presente invención serán manifiestas para los expertos en la técnica al examinar la siguiente descripción detallada de la invención. Sin embargo, se debería entender que la descripción detallada de la invención y los ejemplos específicos presentados, aunque indican ciertas realizaciones de la presente invención, se proporcionan solamente para fines ilustrativos, debido a que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán manifiestos para aquellos de pericia en la técnica a partir de la descripción detallada de la invención.

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos junto con los dibujos que se acompañan 1 a 7.

20 La figura 1a es un esquema de síntesis general que ilustra las estructuras químicas y la preparación del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) tetravalente en el que los cuatro grupos C representan el grupo de fórmula:



25 La figura 1b es un ejemplo particular del esquema de síntesis general de la figura 1a, en el que, en el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) tetravalente, D representa un grupo $-CH_2-$, E representa un grupo alquilo que es el grupo terc-butilo (*t*-Bu), A definido en el grupo B representa un átomo de oxígeno, el ligador, el azúcar y X son como se definen previamente. En las figuras 1a y 1b, el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) obtenido es tetravalente. El compuesto glicosilado a base de calixareno (I) monovalente, divalente o trivalente se obtienen sin embargo de la misma manera que el tetravalente. La alquilación selectiva de los grupos fenólicos se logra con una base en presencia de haluros de alquilo, y los grupos fenólicos restantes se propargilan entonces en las mismas condiciones que para la transformación de (V) en (IV).

30 La figura 2a representa esquemas de síntesis de azido-derivados de hidratos de carbono (III), denominados respectivamente "3" (en el que el ligador = $CO-NH-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2$) y "8" (en el que el ligador = $CO-NH-CH_2-CO-NH-CH_2-CH_2$). Los reactivos y las condiciones de las diferentes etapas se describen más abajo. Etapa a): $HOCH_2CH_2OCH_2CH_2Cl$, $SnCl_4$, CF_3CO_2Ag , CH_2Cl_2 , rt, 2 h; Etapa b): NaN_3 , nBu_4NI , DMF, $85^\circ C$, 16 h; Etapa c): H_2 , Pd-C al 10%, CH_2Cl_2 , rt, 16 h; Etapa d): $BrCH_2COBr$, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt, 12 h; Etapa e): NaN_3 , nBu_4NI , DMF, $85^\circ C$, 16 h; Etapa f): acetato de propargilo, CuI, iPr_2NEt , DMF, $110^\circ C$, microondas, 15 min.; Etapa g): MeOH, H_2O , Et_3N , rt, 16 h; Etapa h): $HOCH_2CH_2Cl$, $SnCl_4$, CF_3CO_2Ag , CH_2Cl_2 , rt, 2 h; Etapa i): N-cloroacetil-glicina, EDCI, HOBt, CH_2Cl_2/DMF , rt, 16 h.

40 La figura 2b representa un esquema de síntesis del azidoderivado de hidrato de carbono (III) denominado "12" (en el que el ligador = $CO-NH-C_6H_4$). Los reactivos y las condiciones de las diferentes etapas se describen más abajo. Etapa a): Ac_2O , C_5H_5N , DMAP, rt, 16 h; Etapa b): H_2 , Pd-C al 10%, CH_2Cl_2 , rt, 16 h; Etapa c): $BrCH_2COBr$, Et_3N , CH_2Cl_2 , rt, 2 h; Etapa d): NaN_3 , nBu_4NI , DMF, $50^\circ C$, 16 h; Etapa e) acetato de propargilo, CuI, iPr_2NEt , DMF, $110^\circ C$, microondas, 15 min.; Etapa f) MeOH, H_2O , Et_3N , rt, 16 h.

45 La figura 3a representa esquemas de síntesis de compuesto glicosilado a base de calixareno (I) tetravalente denominado "19" usando los azidoderivados de hidratos de carbono (III) denominados "3" preparados como se ilustra en la figura 2. La figura 3b representa esquemas de síntesis de glicomiméticos (I) denominados respectivamente "21" (véase fig. 3b-1), "23" (véase fig. 3b-2) y "25" (véase fig. 3b-3) usando el azidoderivado de hidrato de carbono "8". La fig. 3c representa esquemas de síntesis de glicomiméticos (I) denominados respectivamente "27" (véase fig. 3c-1), "29" (véase fig. 3c-2) y "31" (véase fig. 3c-3) usando el azidoderivado de hidrato de carbono "12".

50 La figura 4 representa curvas para el Ensayo de Lectina Ligado a Enzima (ELLA). Más particularmente, esta figura ilustra la comparación del efecto de competición de tres compuestos glicosilados (I) monovalentes

diferentes, denominados respectivamente 5, 10 y 14. La curva con el símbolo ■ representa el compuesto 5. La curva con el símbolo A representa el compuesto 10. La curva con el símbolo • representa el compuesto 14.

5 Las figuras 5a y 5b se refieren al compuesto glicosilado a base de calixareno (I) tetravalente, denominado 19, para la inhibición de la unión de LecA en un chip revestido de galactosa mediante SPR. Más particularmente, la figura 5a representa los sensogramas obtenidos con concentraciones crecientes del compuesto 19. La figura 5b representa la curva de inhibición derivada de los diferentes sensogramas y usada para el cálculo del valor IC50.

10 La figura 6 representa el termograma ITC de la interacción entre LecA y el glicocompuesto. La parte superior representa los datos de ITC en bruto, y la parte inferior la isoterma de unión para la unión del compuesto 19 a LecA.

La figura 7 representa el efecto protector de diferentes monosacáridos (glucosa, galactosa) y derivados (compuesto 14) en un modelo de ratones con infección por *P. aeruginosa*. La permeabilidad mide el deterioro de la barrera alveolar, es decir, los daños al tejido pulmonar provocados por la infección bacteriana.

15 EJEMPLO I

PREPARACIÓN DE COMPUESTO GLICOSILADO A BASE DE CALIXARENO (I)

20 El esquema de síntesis general usado en este ejemplo para preparar el compuesto glicosilado a base de calixareno de fórmula general (I) se ilustra en las Figuras 1a y 1b, en el que un calix[4]areno propargilado de fórmula (IV) se prepara mediante multipropargilación regioselectiva de un calix[4]areno de fórmula (V) con un compuesto propargilado de fórmula (VI), después el mencionado calix[4]areno propargilado de fórmula (IV) se conjuga con un derivado de hidrato de carbono de fórmula (III) a fin de obtener un compuesto glicosilado a base de calixareno protegido con acetilo de fórmula (II), que conduce, cuando se desprotege mediante hidrólisis, a compuesto glicosilado a base de calixareno (I).

25 Los esquemas sintéticos específicos que ilustran el esquema de síntesis general se ilustran en las Figuras 2a, 2b y en las figuras 3a, 3b, 3c.

Los compuestos preparados aquí más particularmente son compuesto glicosilado a base de calixareno (I) tetravalente, en el que:

- D representa un grupo $-\text{CH}_2-$,
- E representa un grupo alquilo que es el grupo terc-butilo,
- 30 - A definido en el grupo B representa un átomo de oxígeno,
- el azúcar definido en el grupo C es el β -D-galactosilo, y
- el ligador definido en el grupo C representa respectivamente:
 - $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$: véase compuesto "19";
 - $\text{CO-NH-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2$: véanse compuestos "21", "23" y "25";
 - 35 • $\text{CO-NH-C}_6\text{H}_4$: véanse compuestos "27", "29" y "31".

Los compuestos glicomiméticos tetravalentes 19, 21, 23, 25, 27, 29 tienen las siguientes conformaciones:

- conformación 1,3 alterna para los glicomiméticos 19, 25 y 31,
- conformación de cono para glicomiméticos 21 y 27,
- conformación de cono parcial para glicomiméticos 23 y 29.

40 Ahora se describen métodos experimentales generales para preparar estos compuestos glicosilados a base de calixareno 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31.

45 Todos los reactivos para la síntesis fueron comerciales (disponibles con la pureza más elevada para compuestos de grado reactivo) y se usaron sin purificación adicional. Los disolventes se destilaron sobre CaH_2 (CH_2Cl_2), Mg/I_2 (MeOH), Na/benzofenona (THF), o se adquirieron secos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en una atmósfera de argón. Las reacciones con activación de microondas se llevaron a cabo en un sistema Biotage Initiator. Los disolventes de RMN se adquirieron de Euriso-Top (Saint Aubin, Francia).

Los espectros de RMN se registraron a 293 K, excepto que se señale de otro modo, usando un espectrómetro de 300 MHz o 400 MHz. Los desplazamientos están referenciados con respecto a picos residuales de disolvente deuterado.

5 Para explicar las multiplicidades observadas, se usan las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete; q, cuadruplete, m, multiplete y bs, singlete ancho.

Las asignaciones de las señales completas a partir de RMN monodimensional y bidimensional se basa en correlaciones COSY, HSQC y HMBC.

10 Los espectros de infrarrojos se registraron usando un espectrómetro FT-IR con accesorio ATR. Los espectros de masas de alta resolución (LSIMS) se registraron en el modo positivo usando un espectrómetro Thermo Finnigan Mat 95 XL.

Los espectros de masas por ESI se registraron en el modo positivo usando un espectrómetro Thermo Finnigan LCQ. Los espectros de masas de alta resolución (HR-ESI-QTOF) se registraron usando un espectrómetro Bruker MicrOTOF-Q II XL.

15 Los espectros de masas de MALDI-ToF se registraron en modo de reflectrón de ion positivo usando un espectrómetro Voyager DE-STR (Applied Biosystem) con CHCA (ácido φ -ciano-4-hidroxicinámico, 10 g.l⁻¹ en MeOH) y NaI (10 g.l⁻¹ en acetona) como matriz.

La cromatografía de capa fina (TLC) se llevó a cabo en láminas de aluminio revestidas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck). Las placas de TLC se inspeccionaron mediante luz UV ($\lambda = 254$ nm) y se desarrollaron mediante tratamiento con una mezcla de H₂SO₄ al 10% en EtOH/H₂O (95:5 v/v), seguido de calentamiento.

20 La cromatografía en columna sobre gel de sílice se llevó a cabo con gel de sílice Si60 (40-63 μ m). La rotación óptica se midió usando un polarímetro Perkin Elmer.

1) Procedimiento general para cicloadiciones 1,3-dipolares (Método A)

25 Excepto que se indique de otro modo, el compuesto funcionalizado con alquino, yoduro de cobre, DIPEA y un azido derivado en DMF desgasificada se introdujeron en un vial Biotage Initiator de 2-5 ml. El vial se inundó con argón, y la disolución se sometió a ultrasonidos durante 30 segundos. El vial se cerró herméticamente con una tapa de tabique y se calentó a 110°C durante 15 min. bajo irradiación de microondas (nivel de absorción del disolvente: elevado). Después de destapar el vial, si el producto es parcialmente soluble en agua, la mezcla bruta se concentró y se co-evaporó con tolueno 3 veces antes de la cromatografía ultrarrápida. Si el producto no es soluble en agua en absoluto, la mezcla se diluyó con EtOAc (250 ml). La capa orgánica se lavó con porciones de 150 ml de HCl 1 N, con NaHCO₃ saturado, con agua, y con salmuera, sucesivamente. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporó. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice ultrarrápida para producir los cicloadductos deseados.

2) Procedimiento general para desacetilación (Método B)

35 Excepto que se indique de otro modo, el glicósido o glicoconjunto acetilado (1 eq.) se suspendió en MeOH destilado, agua ultra-pura y trietilamina ultra-pura (5:1:1, v/v/v). La mezcla se agitó en argón a temperatura ambiente durante 2 a 4 días. Los disolventes se evaporaron, se co-evaporaron con tolueno tres veces, y la espuma blanca resultante se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y se liofilizó para producir glicomiméticos puros.

a) 1-Azido-3-oxapent-5-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido ("2")

40 Se añadió gota a gota SnCl₄ (1M en CH₂Cl₂, 15,4 ml, 15,4 mmoles, 3 eq.) (en 60 min. - bomba de jeringa) a temperatura ambiente a una disolución agitada de 1 (2 g, 5,1 mmoles), trifluoroacetato de plata (1,7 g, 7,7 mmoles, 1,5 eq.) y 2-(2-cloroetoxi)etanol (0,957 g, 7,7 mmoles, 1,5 eq.) en diclorometano recientemente destilado (60 ml). La mezcla se protegió de la luz. Se observó desaparición del material de partida (monitorización mediante TLC) 10 minutos después de que se añadió todo el SnCl₄. La mezcla se transfirió en NaHCO₃ acuoso saturado (400 ml), y se comprobó que el pH era hasta 8. La disolución se agitó vigorosamente durante 15 min. La disolución bifásica se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron sucesivamente con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 150 ml), con agua (2 x 150 ml), con salmuera (150 ml) y se secaron (Na₂SO₄). Tras concentrar y eliminar totalmente el CH₂Cl₂ a alto vacío, el producto bruto (goma amarilla pálida) se disolvió en DMF anhídrico (50 ml). Se añadió azida sódica (1,66 g, 25,6 mmoles, 5 eq.) y yoduro de tetra-n-butilamonio (0,378 g, 1,0 mmoles, 0,2 eq.), y la mezcla se agitó a 80°C en argón durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta r.t., se filtró, y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con EtOAc para alcanzar un volumen total de 400 ml. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. (2 x 100 ml), con agua (2x100 ml), con salmuera (100 ml), y se secó. Tras concentrar, el residuo (goma amarilla a naranja) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (PE/EtOAc, 6:4) para producir el β -glicósido correspondiente funcionalizado con azido 2 como una goma incolora (1,348 g, 57% a lo largo de 2 etapas). R_f = 0,31 (PE:EtOAc, 6:4). [α]_D = -3,9° (c = 1, CH₂Cl₂).

b) 1-Azidoacetamido-3-oxapent-5-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosido ("3")

En un matraz de fondo redondo de 100 ml que contiene 2 (0,951 g, 2,06 mmoles) se añadieron en argón 40 ml de CH₂Cl₂ recientemente destilado. La mezcla se desgasificó con 3 ciclos de vacío/argón. Después, se añadieron 0,219 mg (0,21 mmoles, 0,1 eq.) de Pd/C (10% en peso), y la mezcla se sometió a 3 otros ciclos de vacío/argón. La disolución se sometió a una atmósfera de hidrógeno mediante 3 ciclos de vacío/hidrógeno y se agitó a r.t. durante 20 h. La reducción del resto azido se puede monitorizar mediante TLC (EtOAc). Si todavía está presente algo de material de partida después de 20 h, se pudo añadir Pd/C después de inundar el matraz con argón. Después de 3 ciclos de vacío/hidrógeno, la mezcla se pudo agitar a r.t. durante unas pocas horas más. Tras la desaparición total del material de partida, la mezcla se inundó con argón y se añadió Et₃N (575 μl, 4,12 mmoles, 2 eq.). Se añadió bromuro de bromoacetilo (214 μl, 2,47 mmoles, 1,2 eq.) gota a gota, y la mezcla se agitó durante 12 h. La mezcla se filtró a través de un tapón de celita (CH₂Cl₂) para eliminar el Pd/C. La mezcla bruta en CH₂Cl₂ (250 ml) se lavó con HCl 1N (2 x 100 ml), con NaHCO₃ saturado (2 x 100 ml), con agua (2 x 100 ml) y con salmuera (100 ml). Después del secado (Na₂SO₄), concentración y eliminación total de CH₂Cl₂ con alto vacío, el producto bruto (goma naranja pálida) se disolvió en DMF anhidra (30 ml). Se añadieron azida sódica (0,67 g, 10,3 mmoles, 5 eq.) y yoduro de tetra-n-butil amonio (0,152 g, 0,41 mmoles, 0,2 eq.), y la mezcla se agitó a 80°C en argón durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta r.t., se filtró, y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con EtOAc para alcanzar un volumen total de 300 ml. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. (2 x 100 ml), con agua (2 x 100 ml), con salmuera (100 ml) y se secó. Tras concentrar, el residuo (goma naranja) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc) para producir el glicósido funcionalizado con azido 3 como una goma incolora (590 mg, 57% a lo largo de 3 etapas).

$R_f = 0,37$ (EtOAc). $[\alpha]_D = -13,3^\circ$ (c = 1, CH₂Cl₂).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo) *m/z*: calculado para C₂₀H₃₀N₄NaO₁₂ [M + Na]⁺ 541,1752, encontrado 541,1744; calculado para C₂₀H₃₀N₂NaO₁₂ [M + Na - N₂]⁺ 513,1691, encontrado 513,1688.

c) 1-[(1,2,3-Triazol-4-acetoximetil-1-il)-acetamido]-3-oxapent-5-il 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosido ("4")

Obtenido como una espuma blanca (136 mg, 72%) siguiendo el Método A: 3 (158 mg, 0,30 mmoles, 1 eq.), acetato de propargilo (45 mg, 0,46 mmoles, 1,5 eq.), yoduro de cobre (5,8 mg, 0,1 eq.) y DIPEA (159 μl, 3 eq.) en DMF (3 ml). La mezcla se trató, la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂, y el producto bruto se purificó sobre gel de sílice (EtOAc) para producir el compuesto 4 puro.

$R_f = 0,16$ (EtOAc).

$[\alpha]_D = -30,8^\circ$ (c = 0,4, CH₂Cl₂).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo) *m/z*: calculado para C₂₅H₃₆N₄NaO₁₄ [M + Na]⁺ 639,2120, encontrado 639,2096.

d) 1-[(1,2,3-Triazol-4-hidroximetil-1-il)-acetamido]-3-oxapent-5-il β-D-galactopiranosido ("5")

Obtenido como un aceite incoloro (72 mg, 94%) siguiendo el Método B: 4 (117 mg, 1 eq.), MeOH (2 ml), agua (0,5 ml) y trietilamina (0,5 ml).

$[\alpha]_D = +2,9^\circ$ (c = 0,45, H₂O).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo) *m/z*: calculado para C₁₅H₂₆N₄NaO₉ [M + Na]⁺ 429,1586, encontrado 429,1592

e) 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-galactopiranosido ("6")

Se añadió SnCl₄ (1M en CH₂Cl₂, 38,4 ml, 38,4 mmoles, 3 eq.) gota a gota (en 120 min. - bomba de jeringa) a temperatura ambiente a una disolución agitada de 1 (5 g, 12,8 mmoles), trifluoroacetato de plata (4,2 g, 19,2 mmoles, 1,5 eq.) y 2-cloroetanol (1,3 ml, 19,2 mmoles, 1,5 eq.) en diclorometano recientemente destilado (150 ml). La mezcla se protegió de la luz. La desaparición del material de partida no se pudo observar como material de partida, y el compuesto deseado tiene la misma R_f . Después de 3 horas (1 hora después del final de la adición de SnCl₄), la mezcla se transfirió a NaHCO₃ acuoso saturado (750 ml) y se comprobó que el pH era hasta 8. La disolución se agitó vigorosamente durante 20 min. La disolución bifásica se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 150 ml). Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron sucesivamente con NaHCO₃ acuoso saturado (2 x 150 ml), con agua (2 x 150 ml), con salmuera (150 ml) y se secaron (Na₂SO₄). Tras la concentración y eliminación total de CH₂Cl₂ con alto vacío, el producto bruto (goma amarilla pálida) se disolvió en DMF anhidra (80 ml). Se añadieron azida sódica (4,3 g, 66,3 mmoles, 5 eq.) y yoduro de tetra-n-butilamonio (0,491 g, 1,3 mmoles, 0,1 eq.), y la mezcla se agitó a 70°C en argón durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta r.t., se filtró, y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con EtOAc para alcanzar un volumen total de 400 ml. La capa orgánica se lavó con NaHCO₃ ac. (2 x 100 ml), con agua (2 x 100 ml), con salmuera (100 ml) y se secó. Tras la concentración, el residuo (aceite amarillo) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (PE/EtOAc, 1:1) para producir el β-glicósido funcionalizado con azido correspondiente 6 como una goma incolora (4,186 g, 78% a lo largo de 2 etapas).

$R_f = 0,46$ (PE:EtOAc, 1:1).

f) 2-[(*N*-Cloroacetil)glicinamido]-etil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido ("7")

En un matraz de fondo redondo de 250 ml que contiene 6 (3,875 g, 9,28 mmoles) se añadieron en argón 150 ml de CH_2Cl_2 recientemente destilado. La mezcla se desgasificó con 3 ciclos de vacío/argón. Después, se añadieron 0,495 mg (0,46 mmoles, 0,05 eq.) de Pd/C (10% en peso), y la mezcla se sometió a otros 3 ciclos de vacío/argón. La disolución se sometió a una atmósfera de hidrógeno mediante 3 ciclos de vacío/hidrógeno, y se agitó a r.t. durante 20 h. La reducción del resto azido se puede monitorizar mediante TLC (PE/EtOAc, 1:1). Después de la desaparición total del material de partida, la mezcla se inundó con argón y se filtró a través de un tapón de celita (CH_2Cl_2) para eliminar el Pd/C. La mezcla bruta se concentró a vacío produciendo espuma gris. En un segundo matraz de fondo redondo de 250 ml que contiene *N*-cloroacetilglicina (2,11 g, 13,9 mmoles, 1,5 eq.), se añadieron en argón DMF anhidra (45 ml) y CH_2Cl_2 destilado (50 ml). La mezcla se enfrió hasta -10°C usando un baño de NaCl/hielo, y después se añadieron HOBt (2,51 g, 18,6 mmoles, 2 eq.) y EDCI (2,81 g, 18,6 mmoles, 2 eq.). La mezcla se agitó durante 40 minutos, y después se añadió gota a gota una disolución de la amina bruta en 55 ml de CH_2Cl_2 (en 2 h). La reacción se dejó calentar a r.t. y se agitó a r.t. durante 16 h. La mezcla bruta se concentró entonces, se diluyó en EtOAc (400 ml) y se lavó con HCl 1N (2 x 100 ml), con NaHCO_3 saturado (2 x 100 ml), con agua (2 x 100 ml) y con salmuera (100 ml). Después de secar (Na_2SO_4) y concentrar, el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc) para producir el glicósido funcionalizado con cloro 7 como una espuma blanca (2,612 g, 54% a lo largo de 2 etapas).

$R_f = 0,30$ (EtOAc). $[\alpha]_D = + 8,2^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).

ESI-MS (modo positivo) m/z : 547,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1070,3 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ HR-ESI-MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{ClN}_2\text{NaO}_{12}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 547,1307, encontrado 547,1306.

g) 2-[(*N*-Azidoacetamido)glicinamido]-etil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido ("8")

En un matraz de fondo redondo de 100 ml que contiene derivado de cloro 7 (2,535 g, 4,8 mmoles), azida sódica (1,57 g, 24,1 mmoles, 5 eq.) y yoduro de tetra-*n*-butilamonio (0,355 g, 1,0 mmoles, 0,2 eq.), se añadió DMF anhidra (40 ml). La mezcla se agitó a 80°C en argón durante 16 h. La TLC no permitió monitorizar la reacción ya que el material de partida y el compuesto deseado tienen polaridad similar. La mezcla se enfrió hasta r.t., se filtró, y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con EtOAc para alcanzar un volumen total de 400 ml. La capa orgánica se lavó con NaHCO_3 ac. (2 x 100 ml), con agua (2 x 100 ml), con salmuera (100 ml) y se secó (Na_2SO_4). Tras concentrar, el residuo (aceite amarillo) se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc), para producir el glicósido funcionalizado con azido correspondiente 8 como una espuma blanca (2,00 g, 78%).

$R_f = 0,30$ (EtOAc). $[\alpha]_D = + 3,0^\circ$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{NaO}_{12}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 554,1705, encontrado 554,1715.

h) 2-*N*-[(1,2,3-Triazol-4-acetoximetil-1-il)-acetamido]glicinamido-etil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido ("9")

Obtenido como una espuma blanca (176 mg, 99%) siguiendo el Método A: 8 (150 mg, 0,28 mmoles, 1 eq.), acetato de propargilo (41 mg, 0,42 mmoles, 1,5 eq.), yoduro de cobre (5,3 mg, 0,1 eq.) y DIPEA (146 μl , 3 eq.) en DMF (3 ml). La mezcla bruta se eliminó por evaporación y se co-evaporó 3 veces con tolueno. El producto bruto resultante 9 se purificó sobre gel de sílice (EtOAc, después EtOAc/MeOH, 9:1) mediante dos cromatografías ultrarrápidas sucesivas, produciendo compuesto puro.

$R_f = 0,50$ (EtOAc/MeOH, 9:1). $[\alpha]_D = + 4,3^\circ$ ($c = 1,1$, CH_2Cl_2).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{NaO}_{14}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 652,2073, encontrado 652,2076.

i) 2-*N*-[(1,2,3-Triazol-4-hidroximetil-1-il)-acetamido]glicinamido-etil β -D-galactopiranosido ("10")

Obtenido como un polvo liofilizado blanco (82 mg, 78%) siguiendo el Método B: 9 (160 mg, 1 eq.), MeOH (5 ml), agua (1 ml) y trietilamina (1 ml). Tras agitar a r.t. durante 2 días y concentrar, la mezcla se disolvió en agua ultrapura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 10 puro.

$[\alpha]_D = + 4,2^\circ$ ($c = 0,55$, H_2O).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{NaO}_9$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 442,1540, encontrado 442,1544.

j) 4-(Azidoacetamido)fenil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- β -D-galactopiranosido ("12")

En un matraz de fondo redondo de 250 ml que contiene 11 (4,07 g, 13,51 mmoles) y DMAP (20 mg) se añadieron en argón 50 ml de piridina. Después, se añadieron gota a gota 35 ml de Ac_2O . La mezcla se agitó a r.t. durante 16 h. La mezcla bruta se diluyó en EtOAc (800 ml) y se lavó con HCl 1N (2 x 300 ml), con NaHCO_3 saturado (2 x 300 ml), con

agua (2 x 300 ml) y con salmuera (300 ml). Después de secar (Na_2SO_4) y concentrar, el residuo se cristalizó en PE y se filtró y se secó para producir 5,75 g del intermedio acetilado puro (91%). Después, en un matraz de fondo redondo de 1 l que contiene el p-nitrofenil-galactopiranosido acetilado, se añadió en atmósfera de argón CH_2Cl_2 recientemente destilado. La mezcla se desgasificó con 3 ciclos de vacío/argón. Después, se añadieron 0,634 mg (0,60 mmoles, 0,05 eq.) de Pd/C (10% en peso), y la mezcla se sometió a otros 3 ciclos de vacío/argón. La disolución se sometió a una atmósfera de hidrógeno mediante 3 ciclos de vacío/hidrógeno, y se agitó a r.t. durante 16 h. La reducción del grupo nitro se puede monitorizar mediante TLC (PE/EtOAc, 1:1). Después de la desaparición total del material de partida, la mezcla se inundó con argón, se enfrió hasta 0°C, y se añadió Et_3N (2,0 ml, 14,32 mmoles, 1,2 eq.). Se añadió gota a gota bromuro de bromoacetilo (1,24 ml, 14,32 mmoles, 1,2 eq.), y la mezcla se agitó durante 1 h a 0°C. La mezcla se dejó calentar a r.t. durante 1 h y se filtró a través de un tapón de celita (CH_2Cl_2) para eliminar el Pd/C. La mezcla bruta en CH_2Cl_2 (600 ml) se lavó con HCl 1 N (2 x 250 ml), con agua (2 x 250 ml) y con salmuera (250 ml). Después de secar (Na_2SO_4), concentrar y eliminar totalmente el CH_2Cl_2 con alto vacío, el derivado de bromuro bruto (sólido amarillo pálido) se disolvió en DMF anhidra (80 ml). Se añadió azida sódica (4,1 g, 62,6 mmoles, 5 eq.) y yoduro de tetra-n-butilamonio (0,46 g, 1,25 mmoles, 0,1 eq.), y la mezcla se agitó a 50°C en argón durante 16 h. La mezcla se enfrió hasta r.t., se filtró, y el sólido se lavó con EtOAc. El filtrado se diluyó con EtOAc para alcanzar un volumen total de 600 ml. La capa orgánica se lavó con NaHCO_3 ac. (2 x 200 ml), con agua (2 x 200 ml), con salmuera (200 ml) y se secó. Tras concentrar, el residuo (sólido amarillo pálido) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (PE/EtOAc, 1:1), seguido de cristalización (CH_2Cl_2 /PE), para producir el glicósido funcionalizado con azido 12 como un sólido blanco (5,229 g, 74% a lo largo de 4 etapas).

$R_f = 0,29$ (PE/EtOAc, 1:1). $[\alpha]_D = + 6,6^\circ$ (c = 1,3, CH_2Cl_2).

ESI-MS (modo positivo) m/z : 545,0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1066,4 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ HR-ESI-MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{NaO}_{11}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 545,1496, encontrado 545,1496

k) 4-[(1,2,3-Triazol-4-acetoximetil-1-il)-acetamido]fenil 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-galactopiranosido ("13")

Obtenido como una espuma blanca (350 mg, 98%) siguiendo el Método A: 12 (300 mg, 0,57 mmoles, 1 eq.), acetato de propargilo (84 mg, 0,86 mmoles, 1,5 eq.), yoduro de cobre (10,9 mg, 0,1 eq.) y DIPEA (300 μl , 3 eq.) en DMF (4 ml). La mezcla bruta se diluyó en EtOAc (300 ml), y la capa orgánica se lavó con HCl 1N (2 x 100 ml), con NaHCO_3 saturado (2 x 100 ml), con agua (2 x 100 ml) y con salmuera (100 ml). Después de secar (Na_2SO_4) y concentrar, el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc) produciendo compuesto 13 puro.

$[\alpha]_D = + 8,2^\circ$ (c = 1, CH_2Cl_2).

ESI-MS (modo positivo) m/z : 621,1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 643,0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 1262,3 $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_{13}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 643,1841, encontrado 643,1858.

l) 4-[(1,2,3-Triazol-4-hidroximetil-1-il)-acetamido]fenil β -D-galactopiranosido ("14")

Obtenido como un polvo liofilizado blanco (206 mg, 95%) siguiendo el Método B: 13 (335 mg, 1 eq.), MeOH (10 ml), agua (2 ml) y trietilamina (2 ml). Tras agitar a r.t. durante 2 días y concentrar, la mezcla se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 14 puro.

$[\alpha]_D = - 18,8^\circ$ (c = 0,43, H_2O)

ESI-MS (modo positivo) m/z : 433,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. ESI-MS (modo negativo) m/z : 409,1 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 433,1 $[\text{M} + \text{Cl}]^-$. HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_8$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 433,1330, encontrado 433,1324.

m) Glicomimético ("18")

Obtenido como una espuma blanca (154 mg, 89%) siguiendo el Método A: 17 (48 mg, 60,1 μmoles , 1 eq.) 3 (187 mg, 361 μmoles , 6 eq.), yoduro de cobre (6 mg, 30 μmoles , 0,5 eq.) y DIPEA (52 μl , 300 μmoles , 5 eq.). Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc:MeOH, 1:0 y después 95:5).

$R_f = 0,45$ (EtOAc:MeOH, 95:5). $[\alpha]_D = - 2,5$ (c = 1,26, CH_2Cl_2).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo): m/z calculado para $\text{C}_{136}\text{H}_{185}\text{N}_{16}\text{O}_{52}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 2874,2318, encontrado 2874,2306, calculado para $\text{C}_{136}\text{H}_{186}\text{N}_{16}\text{O}_{52}$ $[\text{M} + 2\text{H}]^{++}$ 1437,6196, encontrado 1437,6260.

n) Glicomimético ("19")

Obtenido como una espuma blanca (108 mg, 99%) siguiendo el Método B: 18 (142 mg, 1 eq.), MeOH (2 ml), agua (0,5 ml) y trietilamina (0,5 ml). Tras agitar a r.t. durante 2 días y concentrar, la mezcla se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 19 puro.

$[\alpha]_D = - 0,5$ (c = 1,1/DMSO).

HR-ESI-QTOF MS (modo positivo): m/z calculado para $C_{104}H_{152}N_{16}Na_2O_{36}$ $[M + 2Na]^{++}$ 1123,5170, encontrado 1123,5226.

o) Glicomimético ("20")

5 Obtenido como una espuma blanca (103 mg, 56%) siguiendo el Método A: 15 (50 mg, 63 μ moles, 1 eq.), 8 (200 mg, 380 μ moles, 6 eq.), yoduro de cobre (6 mg, 31 μ moles, 0,5 eq.) y DIPEA (54 μ l, 310 μ moles, 5 eq.). Irradiación por microondas: 35 min., 110°C. Sin tratamiento, la mezcla bruta se concentró, se co-evaporó con tolueno y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice ($CHCl_3$:MeOH, 1:0 y después 9:1).

$R_f = 0,01$ (EtOAc:MeOH, 9:1). $[\alpha]_D = -1,2$ ($c = 1,0$, CH_2Cl_2).

10 HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $C_{136}H_{182}N_{20}O_{52}$ $[M + 2H]^{++}$ 1463,6100, encontrado 1463,6159, calculado para $C_{136}H_{181}KN_{20}O_{52}$ $[M + H + K]^{++}$ 1482,5880, encontrado 1482,5885.

p) Glicomimético ("21")

Obtenido como una espuma blanca (72 mg, 92%) siguiendo el Método B: 20 (102 mg, 1 eq.), MeOH (2 ml), agua (1 ml) y trietilamina (1 ml). Tras agitar a r.t. durante 3 días y concentrar, la mezcla se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 21 puro.

15 $[\alpha]_D = -0,4$ ($c = 0,68$ /DMSO).

HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $C_{104}H_{149}N_{20}O_{36}$ $[M + H]^+$ 2254,0438, encontrado 2254,0430, calculado para $C_{104}H_{148}N_{20}Na_2O_{36}$ $[M + 2Na]^{++}$ 1149,5075, encontrado 1149,5126, calculado para $C_{104}H_{150}N_{20}O_{36}$ $[M + 2H]^{++}$ 1127,5255, encontrado 1127,5309.

q) Glicomimético ("22")

20 Obtenido como una espuma blanca (111 mg, 81%) siguiendo el Método A: 16 (37,7 mg, 47 μ moles, 1 eq.) 8 (142 mg, 282 μ moles, 5,7 eq.), yoduro de cobre (2,5 mg, 23 μ moles, 0,5 eq.) y DIPEA (41 μ l, 235 μ moles, 5 eq.) en DMF (2,5 ml). Irradiación por microondas: 30 min., 110°C. Sin tratamiento, la mezcla bruta se concentró, se co-evaporó con tolueno y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM:MeOH, 1:0 y después 85:15).

$R_f = 0,4$ (EtOAc:MeOH, 90:10).

25 $[\alpha]_D = -0,9$ ($c = 1,0$, CH_2Cl_2).

HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $C_{136}H_{180}N_{20}Na_2O_{52}$ $[M + 2Na]^{++}$ 1485,5920, encontrado 1485,5934.

r) Glicomimético ("23")

30 Obtenido como una espuma blanca (102 mg, 79%) siguiendo el Método B: 22 (166 mg, 1 eq.), MeOH (2 ml), agua (1 ml) y trietilamina (1 ml). Tras agitar a r.t. durante 1 día y concentrar, la mezcla se co-evaporó tres veces en tolueno, se precipitó en H₂O, MeOH, acetona. Tras filtrar, el compuesto se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 23 puro.

$[\alpha]_D = -1,5$ ($c = 1,14$, DMSO).

35 HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $C_{104}H_{149}KN_{20}O_{36}$ $[M + H + K]^{++}$ 1146,5035, encontrado 1146,5028.

s) Glicomimético ("24")

40 Obtenido como una espuma blanca (110 mg, 59%) siguiendo el Método A: 17 (50 mg, 63 μ moles, 1 eq.), 2 (200 mg, 380 μ moles, 6 eq.), yoduro de cobre (6 mg, 31 μ moles, 0,5 eq.) y DIPEA (54 μ l, 310 μ moles, 5 eq.). Irradiación por microondas: 15 min., 110°C. Sin tratamiento, la mezcla bruta se concentró, se co-evaporó con tolueno y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (EtOAc:MeOH, 1:0 y después 9:1). Algunas veces se pudo requerir una segunda cromatografía ultrarrápida ($CHCl_3$:MeOH, 1:0 y después 95:5). $R_f = 0,52$ (EtOAc:MeOH, 9:1).

$[\alpha]_D = +1,5$ ($c = 1,0$, CH_2Cl_2).

HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) m/z : calculado para $C_{136}H_{180}N_{20}NaO_{52}$ $[M + H]^+$ 2948,1948, encontrado 2498,1957, calculado para $C_{136}H_{180}N_{20}Na_2O_{52}$ $[M + 2Na]^+$ 1485,5920, encontrado 1485,5954.

45 t) Glicomimético ("25")

Obtenido como una espuma blanca (76 mg, 90%) siguiendo el Método B: 24 (112 mg, 1 eq.), MeOH (2 ml), agua (0,5 ml) y trietilamina (0,5 ml). Tras agitar a r.t. durante 3 días y concentrar, la mezcla se co-evaporó tres veces en tolueno, se precipitó en MeOH/Et₂O acetona. Tras filtrar, el compuesto se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 25 puro.

- 5 HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) *m/z*: calculado para C₁₀₄H₁₅₀N₂₀O₃₆ [M + 2H]⁺⁺ 1127,5255, encontrado 1127,5322, calculado para C₁₀₄H₁₄₈N₂₀Na₂O₃₆ [M + 2Na]⁺⁺ 1149,5075, encontrado 1149,5134, calculado para C₁₀₄H₁₄₉N₂₀O₃₆ [M + H]⁺ 2254,0438, encontrado 2254,0513.

u) Glicomimético ("26")

- 10 Obtenido como una espuma blanca (253 mg, 70%) siguiendo el Método A: 15 (100 mg, 0,125 mmoles, 1 eq.), 12 (391 mg, 0,749 mmoles, 6 eq.), yoduro de cobre (12 mg, 62 μmoles, 0,5 eq.) y DIPEA (109 μl, 0,624 mmoles, 5 eq.). Irradiación por microondas: 45 min., 110°C. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (PE:EtOAc, 4:6 y después EtOAc, y después EtOAc:MeOH, 95:5).

[α]_D = + 1,5 (c = 0,68, CH₂Cl₂).

- 15 MALDI-TOF MS (modo reflectrón de ion positivo): calculado para C₁₄₄H₁₆₈N₁₆NaO₄₈ [M + Na]⁺ 2912,11, encontrado 2912,03.

v) Glicomimético ("27")

- 20 Obtenido como una espuma blanca (129 mg, 81%) siguiendo el Método B: 26 (207 mg, 1 eq.), MeOH (10 ml), agua (2 ml) y trietilamina (2 ml). Tras agitar a r.t. durante 1 día y concentrar, la mezcla se co-evaporó tres veces en tolueno. El compuesto se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 27 puro.

MALDI-TOF MS (modo reflectrón de ion positivo): calculado para C₁₁₂H₁₃₆N₁₆NaO₃₂ [M + Na]⁺ 2239,94, encontrado 2239,84.

w) Glicomimético ("28")

- 25 Obtenido como una espuma blanca (271 mg, 75%) siguiendo el Método A: 16 (100 mg, 0,125 mmoles, 1 eq.), 12 (391 mg, 0,749 mmoles, 6 eq.), yoduro de cobre (12 mg, 62 μmoles, 0,5 eq.) y DIPEA (109 μl, 0,624 μmoles, 5 eq.). Irradiación por microondas: 15 min., 110°C. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (PE:EtOAc, 4:6 y después EtOAc, y después EtOAc:MeOH, 95:5).

[α]_D = + 3,2 (c = 1,45, CH₂Cl₂).

- 30 MALDI-TOF MS (modo reflectrón de ion positivo): calculado para C₁₄₄H₁₆₈N₁₆NaO₄₈ [M + Na]⁺ 2912,11, encontrado 2912,20.

x) Glicomimético ("29")

- 35 Obtenido como una espuma blanca (124 mg, 78%) siguiendo el Método B: 28 (207 mg, 1 eq.), MeOH (4 ml), agua (1 ml) y trietilamina (1 ml). Tras agitar a r.t. durante 3 días y concentrar, la mezcla se co-evaporó tres veces en tolueno. El compuesto se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 29 puro.

[0]_D = - 7,1 (c = 1,15, DMSO).

HR-ESI-QTOF-MS (modo positivo) *m/z*: calculado para C₁₁₂H₁₃₇N₁₆NaO₃₂ [M + H + Na]⁺⁺ 1120,4736, encontrado 1120,4744, calculado para C₁₁₂H₁₃₇KN₁₆O₃₂ [M + H + K]⁺⁺ 1128,4605, encontrado 1128,4605, calculado para C₁₁₂H₁₃₆KN₁₆NaO₃₂ [M + K + Na]⁺⁺ 1139,4515, encontrado 1139,4527.

- 40 y) Glicomimético ("30")

Obtenido como una espuma blanca (307 mg, 85%) siguiendo el Método A: 17 (100 mg, 0,125 mmoles, 1 eq.), 12 (391 mg, 0,749 mmoles, 6 eq.), yoduro de cobre (12 mg, 62 μmoles, 0,5 eq.) y DIPEA (109 μl, 0,624 mmoles, 5 eq.). Irradiación por microondas: 15 min., 110°C. Se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (PE:EtOAc, 4:6 y después EtOAc, y después EtOAc:MeOH, 95:5).

- 45 [α]_D = + 8,1 (c = 0,80, CH₂Cl₂).

MALDI-TOF MS (modo reflectrón de ion positivo): calculado para C₁₄₄H₁₆₈N₁₆NaO₄₈ [M + Na]⁺ 2912,11, encontrado 2912,10.

z) Glicomimético ("31")

Obtenido como una espuma blanca (150 mg, 73%) siguiendo el Método B: 30 (268 mg, 1 eq.), MeOH (10 ml), agua (2 ml) y trietilamina (2 ml). Tras agitar a r.t. durante 1 día y concentrar, la mezcla se co-evaporó tres veces en tolueno. El compuesto se disolvió en agua ultra-pura (5 ml) y después se liofilizó para producir el glicósido desacetilado 31 puro.

5 $[\alpha]_D = -9,0$ ($c = 0,77$, DMSO).

EJEMPLO II

USO DEL COMPUESTO GLICOSILADO A BASE DE CALIXARENO (II) PARA INHIBIR LA UNIÓN A GLICOCONJUGADOS NATURALES PRESENTES EN CÉLULAS

1) Condiciones experimentales

10 A fin de evaluar el potencial *in vitro* del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) para inhibir la unión a glicoconjugados naturales presentes en la célula, se han aplicado cuatro métodos diferentes que se describen más abajo. Los compuestos 5, 10 y 14 usados en los métodos 1-4 son compuestos de referencia.

Método (1)

Inhibición de hemaglutinación (IHA) (o Ensayos de Inhibición de Hemaglutinación (HIA))

15 La lectina LecA aglutina eritrocitos puesto que están cubiertos de glicoconjugados. Los glicomiméticos inhiben esta aglutinación.

Se ha evaluado para cada compuesto la concentración mínima capaz de llevar a cabo la inhibición. El método no es muy cuantitativo pero imita el sistema natural.

20 Más particularmente, los ensayos de inhibición de hemaglutinación se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos con forma de U. Los eritrocitos de conejo se compraron a Biomerieux y se usaron sin lavado posterior. Los eritrocitos se diluyeron hasta una disolución al 4% en NaCl (150 mM). Se prepararon disoluciones de lectina de 2 mg/ml en Tris/HCl 20 mM, NaCl 100 mM y CaCl₂ 100 μM. La unidad de hemaglutinación (HU) se obtuvo en primer lugar mediante la adición de 25 μl de la disolución al 4% de eritrocitos a alícuotas de 25 μl de diluciones de lectina secuenciales (dos veces). La mezcla se incubó a 25°C durante 60 minutos. La HU se midió como la concentración mínima de lectina requerida para evitar la hemaglutinación. Para los siguientes ensayos de inhibición de lectina, se usaron concentraciones de lectina de cuatro veces la de la unidad de hemaglutinación, es decir, una concentración de 6 μg/ml para LecA. Entonces se llevaron a cabo ensayos subsiguientes mediante la adición de 12,5 μl de dilución de lectina (a la concentración requerida) a 25 μl de diluciones secuenciales de glicoconjuntos, moléculas monoméricas, y controles. Estas disoluciones se incubaron entonces a 25°C durante 2 h, y después se añadieron 30 12,5 μl de disolución al 4% de eritrocitos, seguido de una incubación adicional a 25°C durante 30 minutos. La concentración inhibitoria mínima para cada molécula se determinó mediante detección a simple vista.

Los compuestos 5, 10, 14, 19, 21, 23, 25, 27, 29 y 31 se evaluaron frente a LecA según el método 1.

Método (2)

Experimentos de Ensayo de Lectina Ligado a Enzimas (ELLA)

35 Placas de 96 pocillos se cubrieron con polímero que presenta galactosa (que es el monosacárido al que se une LecA). Se añadió lectina marcada con biotina en presencia de glicomiméticos competidores. Se puede medir IC50.

Más particularmente, los experimentos de ELLA se realizaron usando placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc Maxisorb) revestidas con β-D-galactosa polimérica (5 μg/ml; Lectinity Holding, Inc., Moscú) diluida en tampón de carbonato, pH 9,6 (100 μl) durante 1 h a 37°C. Después de bloquear a 37°C durante 1 h con 100 μl por pocillo de 40 BSA al 3% (p/v) en PBS, las placas se incubaron a 37°C durante 1 h con 100 μl de LecA biotinilada a 0,1 μg/ml en presencia de diluciones en serie de inhibidores. Después de lavar con T-PBS (PBS que contiene 0,05% de Tween), se añadieron 100 μl de conjugado de estreptavidina-peroxidasa (dilución 1:10000; Boehringer-Mannheim) y se dejaron durante 1 h a 37°C. El color se desarrolló usando 100 μl por pocillo de tampón de fosfato/citrato 0,05 M que contiene dihidrocloruro de O-fenilendiamina (0,4 mg/ml) y urea-peróxido de hidrógeno (0,4 mg/ml) (Sigma-Aldrich). 45 La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μl de H₂SO₄ al 30%. La absorbancia se leyó a 490 nm usando un lector de placas de microtitulación (Bio-Rad; modelo 680).

Método (3)

Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)

50 Método equivalente pero llevado a cabo en canal miniaturizado sobre un chip que contiene galactosa en un aparato más sofisticado (Biacore 3000) que permite una determinación precisa de la IC50.

Más particularmente, los experimentos de inhibición de SPR se llevaron a cabo en un instrumento Biacore 3000 a 25°C. Las medidas se llevaron a cabo en 2 canales con 2 azúcares inmovilizados: α-L-fucosa (canal 1), α-D-galactosa (canal 2). La inmovilización de los azúcares se llevó a cabo a 25°C usando tampón de migración (HBS) a 5 μl/min. La inmovilización en cada canal (chip CM5) se llevó a cabo independientemente según lo siguiente. En primer lugar, el canal se activó inyectando una mezcla reciente de EDC/NHS (35 μl, 420 s). Después, se inyectó una disolución de estreptavidina (100 μg/ml en tampón de acetato de sodio pH 5) (50 μl, 600 s). Las especies reactivas que quedan se paralizaron inyectando etanolamina (1M, 35 μl, 420 s). Finalmente, se revistió una disolución del azúcar conjugado con poliacrilamida biotinilada (Lectinity, 200 μg/ml) sobre la superficie (50 μl, 600 s) a través de la interacción de estreptavidina-biotina. Este procedimiento condujo a 804 RU (fucosida) y 796 RU (galactosida) de azúcares inmovilizados en el canal 1 y 2 respectivamente. Los experimentos de inhibición se llevaron a cabo con el canal 2 galactosilado, y las gráficas representan datos restados (canal 2 – canal 1).

Se inyectó LecA usando tampón de migración que consiste en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 10 mM, Tween P20 0,005%, pH 7,4. Los estudios de inhibición consistieron en la inyección (150 μl, 10 μl/min., disociación: 120 s) de mezclas incubadas (>1 h, r.t.) de LecA (5 μM) y diversas concentraciones de inhibidor (diluciones en cascada de 2 veces). Para cada ensayo de inhibición, se inyectó LecA (5 μM) sin inhibidor para observar la adhesión completa de la lectina sobre la superficie revestida con azúcar (0% de inhibición). El chip de CM5 se regeneró completamente mediante inyecciones sucesivas de D-galactosa (2 x 30 μl, 100 mM en tampón de migración).

La unión se midió como UR a lo largo del tiempo después de restar el blanco, y los datos se evaluaron entonces usando el software BIAevaluation, versión 4.1. Para la evaluación de IC₅₀, la respuesta (ajustada a Req) se consideró como la cantidad de lectina unida a la superficie de azúcar en equilibrio en presencia de una concentración definida de inhibidor. Las curvas de inhibición se obtuvieron representando gráficamente el porcentaje de inhibición frente a la concentración de inhibidor (en una escala logarítmica) usando el software Origin 7.0 (OriginLab Corp.), y los valores de IC₅₀ se extrajeron del ajuste sigmoide de la curva de inhibición.

Método (4)

25 Microcalorimetría de valoración isotérmica (ITC)

El método permite una medición directa de la afinidad entre los glicomiméticos y la lectina LecA. Se mide la constante de disociación.

Más particularmente, se disolvió LecA liofilizada recombinante en tampón (Tris-HCl 0,1 M, CaCl₂ 6 μM, pH 7,5) y se desgasificó (véase Info. Sub. para detalles de la concentración). La concentración de proteínas se comprobó midiendo la densidad óptica usando un coeficiente de extinción molar teórico de 28000. Los ligandos de hidratos de carbono se disolvieron directamente en el mismo tampón, se desgasificaron, y se colocaron en la jeringuilla de inyección. La ITC se llevó a cabo con un microcalorímetro VP-ITC de MicroCal Incorporated. Se colocó PA-IL en la celda de muestras de 1,4478 ml, a 25°C. La valoración se llevó a cabo con inyecciones de 10 μl de ligandos de hidratos de carbono cada 300 s. Los datos se ajustaron con el software MicroCal Origin 7, según procedimientos estándar. Los datos ajustados produjeron la estequiometría (n), la constante de disociación (K_a) y la entalpía de unión (ΔH).

Otros parámetros termodinámicos (es decir, cambios en la energía libre, ΔG, y entropía, ΔS) se calcularon a partir de la ecuación: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a$, en la que T es la temperatura absoluta y R = 8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹. Para cada ligando evaluado, se realizaron dos o tres valoraciones independientes.

40 2) Resultados bioquímicos

Para los cuatro métodos mencionados anteriormente, cuanto más pequeño es el número, mejor es la eficiencia de los glicomiméticos.

Método 1

En la Tabla 1 a continuación se dan los resultados obtenidos mediante Inhibición de Hemaglutinación.

45 Tabla 1:

Monovalente	Tetraivalente		
10 000 μM Comp. 5			500 μM Comp. 19
2 500 μM Comp. 10	250 μM Comp. 21	250 μM Comp. 23	625 μM Comp. 25
250 μM Comp. 14	Hemólisis Comp. 27	Hemólisis Comp. 29	Hemólisis Comp. 31

Los valores dados en la tabla 1 son concentraciones inhibitoras de la aglutinación de eritrocitos inducida por lectina. El compuesto glicoconjugado monovalente 14 y los compuestos glicoconjugados tetravalentes 21 y 23 son los más eficientes. Se observa hemólisis de eritrocitos para los compuestos glicoconjugados tetravalentes 27, 29 y 31, indicando una posible toxicidad a la concentración usada.

5 Método 2

En la Tabla 2 a continuación se dan los resultados obtenidos por los Ensayos de Lectina Enlazados a Enzimas.

Tabla 2

Monovalente	Tetravalente		
250 μM Comp. 5			7 μM Comp. 19
300 μM Comp. 10	21 μM Comp. 21	7 μM Comp. 23	14 μM Comp. 25
46 μM Comp. 14	0,8 μM Comp. 27	0,9 μM Comp. 29	5 μM Comp. 31

10 Los valores dados en la tabla 2 son valores de IC_{50} para la inhibición de la unión de LecA marcada a un polímero galactosilado en un ensayo de placa de múltiples pocillos.

Entre los glicoconjugados monovalentes, el compuesto 14 es el inhibidor más eficiente (como se ilustra en la Figura 4). Todos los glicoconjugados tetravalentes inhiben la unión de LecA a la superficie galactosilada a baja concentración. Los compuestos más eficientes son 27 y 29, con una IC_{50} en el intervalo submicromolar.

Método 3

15 En la Tabla 3 a continuación se dan los resultados obtenidos mediante Resonancia de Plasmones Superficiales (valores de IC_{50}).

Tabla 3:

Monovalente	Tetravalente		
58.3 μM Comp. 5			1 μM Comp. 19
60 μM Comp. 10	Solubilidad a mejorar Comp. 21	1,1 μM Comp. 23	1,2 μM Comp. 25
2,6 μM Comp. 14	Solubilidad a mejorar Comp. 27	Solubilidad a mejorar Comp. 29	Solubilidad a mejorar Comp. 31

20 Los valores dados en la Tabla 3 son los valores de IC_{50} para la inhibición de la unión de LecA libre de marcador a una superficie de chip galactosilada usando Resonancia de Plasmones Superficiales.

25 Un ejemplo de sobras obtenidos para diferentes concentraciones de compuesto 19 se presenta en la Figura 5, junto con la curva inhibitora correspondiente. Entre los compuestos glicoconjugados monovalentes, sólo 14 da una fuerte inhibición de la unión. Para los compuestos tetravalentes, 19, 23 y 25 son inhibidores eficientes con una IC_{50} en el intervalo micromolar. Los otros compuestos tetravalentes fueron difíciles de evaluar con este método puesto que requiere disoluciones concentradas de ligandos, que fueron difíciles de obtener debido a limitación de la solubilidad.

Método 4

En la Tabla 4 a continuación se dan los resultados obtenidos mediante ITC.

Tabla 4:

Monovalente	Tetravalente		
107 μM Comp. 5			0,094 μM Comp. 19
180 μM Comp. 10	Solubilidad a mejorar Comp. 21	239 μM Comp. 23	202 μM Comp. 25

Monovalente	Tetraivalente		
5,8 μ M Comp. 14	Solubilidad a mejorar Comp. 27	Solubilidad a mejorar Comp. 29	Solubilidad a mejorar Comp. 31

Los valores dados en la Tabla 4 son los valores de la constante de disociación para la interacción en disolución de LecA y los calixarenos glicoconjugados. En la Figura 6 se presenta un termograma medido típico obtenido para el compuesto 19. Entre los compuestos glicoconjugados monovalentes, sólo 14 da una fuerte inhibición de la unión. Para los compuestos tetraivalentes, el compuesto 19 aparece como un inhibidor excelente con una constante de disociación de 94 nM. Algunos de los compuestos tetraivalentes fueron difíciles de ensayar con este método puesto que requiere disoluciones concentradas de ligandos, que fueron difíciles de obtener debido a limitación de solubilidad.

EJEMPLO III

10 ENSAYOS in vivo

1) Condiciones experimentales

Se anestesiaron brevemente a ratones con sevoflurano inhalado. Para cada ratón, se instilaron en los pulmones a través de una sonda nasogástrica insertada en la tráquea vía la orofaringe 50 l de un inóculo bacteriano de 5×10^8 CFU/ml. La permeabilidad de la barrera capilar alveolar se evaluó midiendo 125 I-albúmina residual instilada intratraquealmente como un trazador de proteína alveolar en los pulmones y su pérdida y acumulación en el plasma tras 6 h después de la infección. El instilado intratraqueal fue una mezcla de 1 μ Ci de albúmina marcada con 125 I y 5% de albúmina bovina junto con el inoculado de *P. aeruginosa* y diferentes monosacáridos o glicocompuestos. Se midió la radioactividad total en el instilado. Se inocularon cincuenta microlitros de instilado en los pulmones de cada ratón anestesiado. Seis horas después de la instilación, los ratones se anestesiaron con pentobarbital, administrado intraperitonealmente. La sangre se recogió mediante punción de la arteria carótida, y se llevó a cabo una esternotomía para recoger y medir la radioactividad en los pulmones, tráquea, y estómago. La cantidad de 125 I-albúmina que pasó a la circulación se calculó multiplicando la actividad en una muestra de sangre por el volumen de sangre.

2) Resultados biológicos

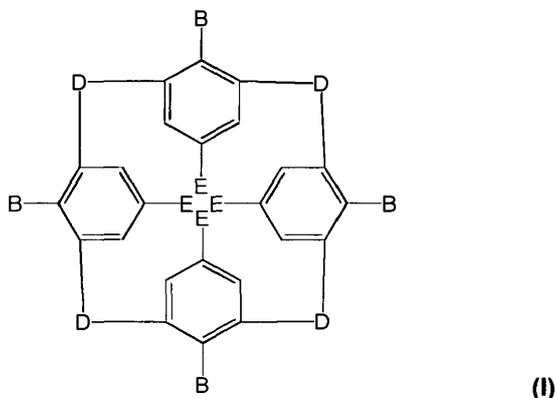
Se ha comparado el compuesto de referencia 14 con dos monosacáridos: glucosa y galactosa, en ensayos con modelos de animales. Los compuestos (glucosa, galactosa y compuesto 14) se coinstilaron en pulmones de los ratones junto con concentración infectante de *Pseudomonas aeruginosa*. La protección de estos compuestos ofrecida al pulmón se estimó midiendo la integridad de la barrera alveolar. Para ello, se hizo circular albúmina marcada en la sangre, y se estimó la cantidad que pasó a través de las barreras de alvéolos al pulmón.

La Figura 7 presenta el efecto protector de glucosa, galactosa y compuesto 14 en un modelo de ratones con infección por *P. aeruginosa*. La permeabilidad mide el deterioro de la barrera alveolar, es decir, los daños al tejido pulmonar provocados por la infección bacteriana.

El glicoconjugado monovalente, compuesto 14, parece ser más eficiente que la galactosa. Su coinstilación da como resultado una reducción aproximadamente de 50% de los daños pulmonares cuando se compara con el experimento de control con instilación de bacterias sin azúcar. El resultado indica que el compuesto 14 protege eficientemente los tejidos pulmonares de la destrucción por *P. aeruginosa*, resultando infección sistémica.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) que tiene la fórmula:



en la que

5 D se selecciona independientemente del grupo que comprende un grupo $-CH_2-$, un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo sulfinilo, o un grupo sulfonilo

E se selecciona independientemente del grupo que comprende un hidrógeno, un alquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un arilo que tiene de 6 a 20 átomos de carbono, un grupo dióxido de nitrógeno, un grupo azida, un grupo amino, un grupo guanidinio, un átomo de halógeno, un grupo $-CH_2R$ en el que R es un hidroxilo, un halogeno, un grupo amino, un grupo $N(\text{alquilo})_2$, un grupo $NH(\text{alquilo})$, o E representa un $-CO-R'$ en el que R' es un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un amino,

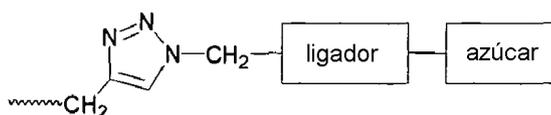
10

B representa un grupo A-C en el que

A se selecciona independientemente del grupo que comprende un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, un grupo NH o un grupo $(CH_2)_i$, siendo i un número entero de 1 a 10,

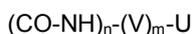
15 C se selecciona independientemente del grupo que comprende un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, un alquinilo,

o C es un grupo de fórmula:



en la que

20 el ligador es un grupo de fórmula:



en la que

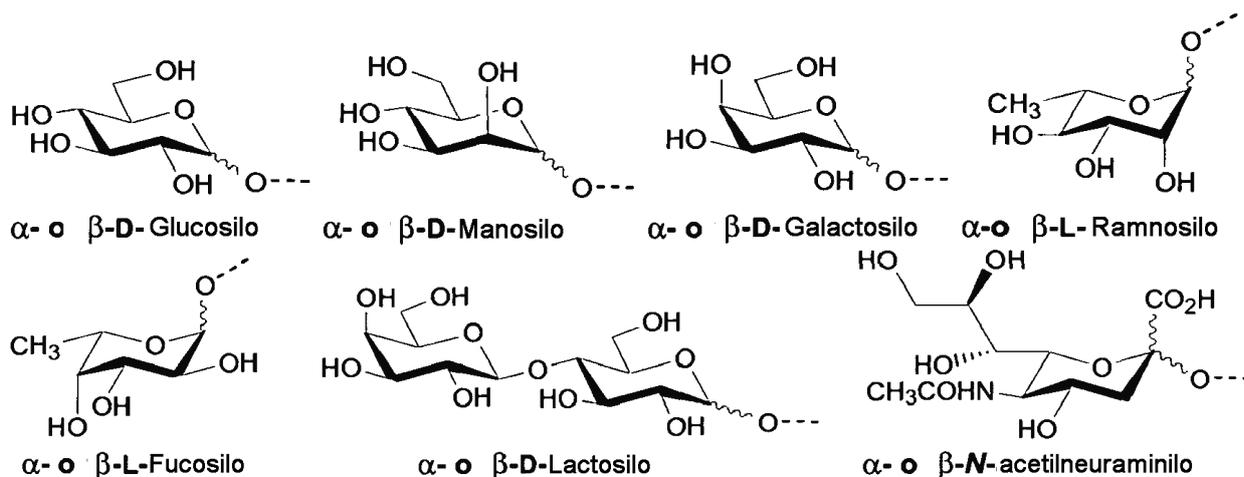
n es un número entero de 1 a 3,

V = CH_2 , C_6H_4 (fenilo "Ph"), $CH_2-CH_2-O-CH_2$, $CH_2-CO-NH-CH_2$,

25 m es un número entero de 1 a 15,

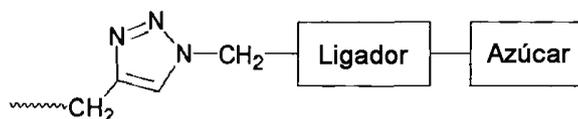
U está ausente o es CH_2 ,

el azúcar es un grupo que tiene al menos un resto de hidrato de carbono y se selecciona del grupo que comprende:



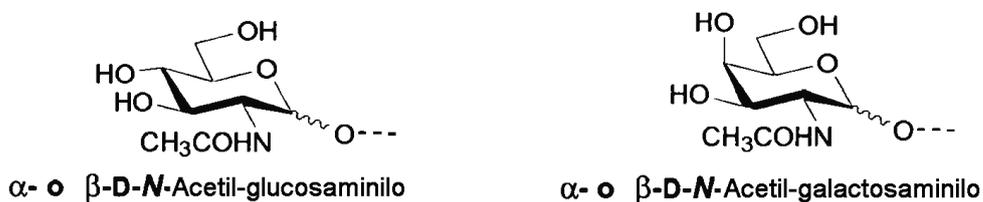
o sus derivados,

- 5 y en la que al menos uno de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representa el grupo de fórmula

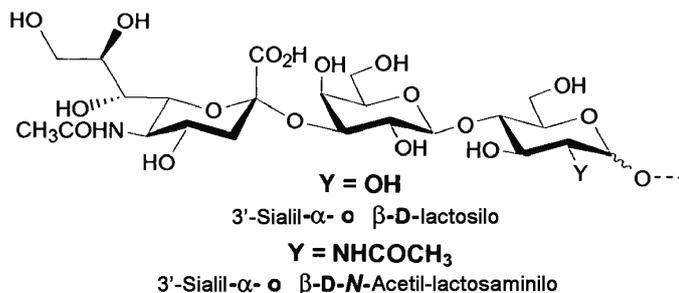
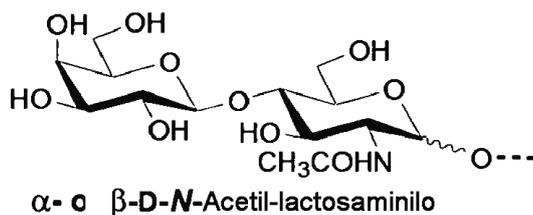


como se define anteriormente.

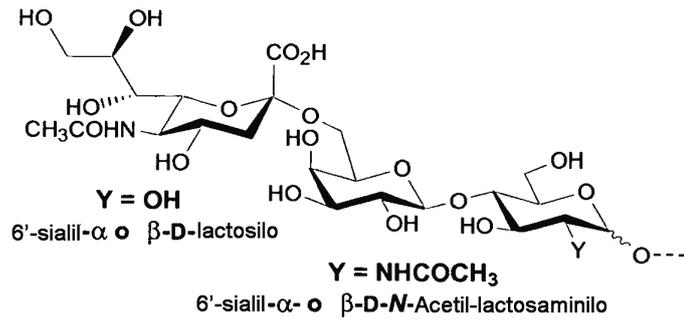
2. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según la reivindicación 1, en el que los derivados de azúcar en el grupo C se seleccionan del grupo que comprende:



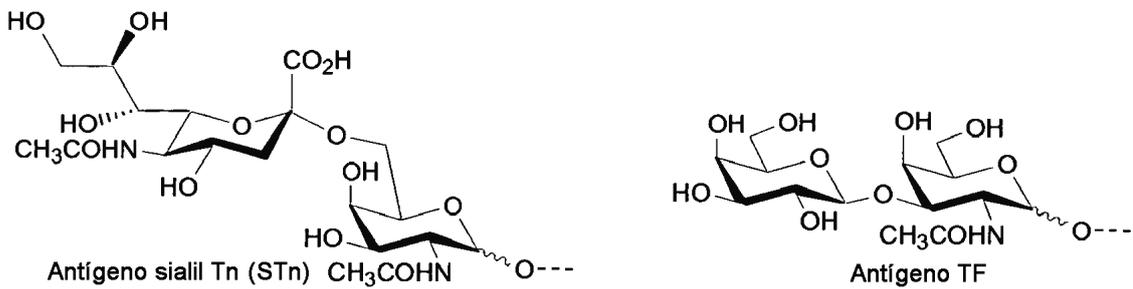
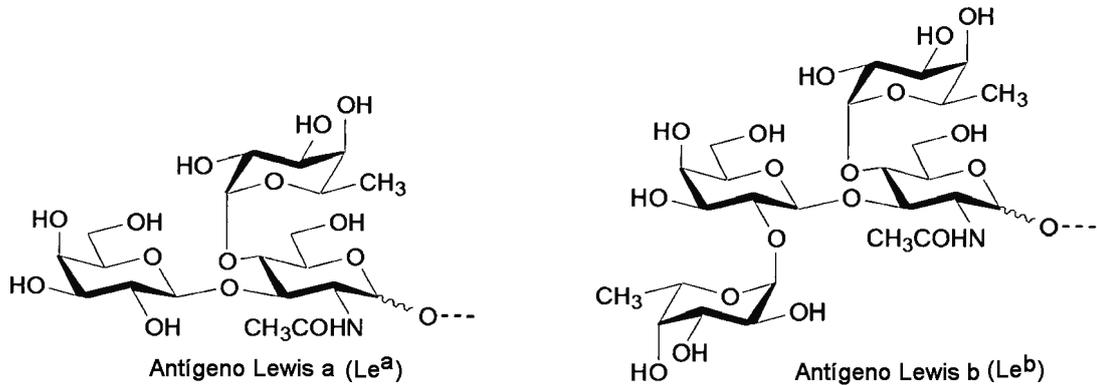
10



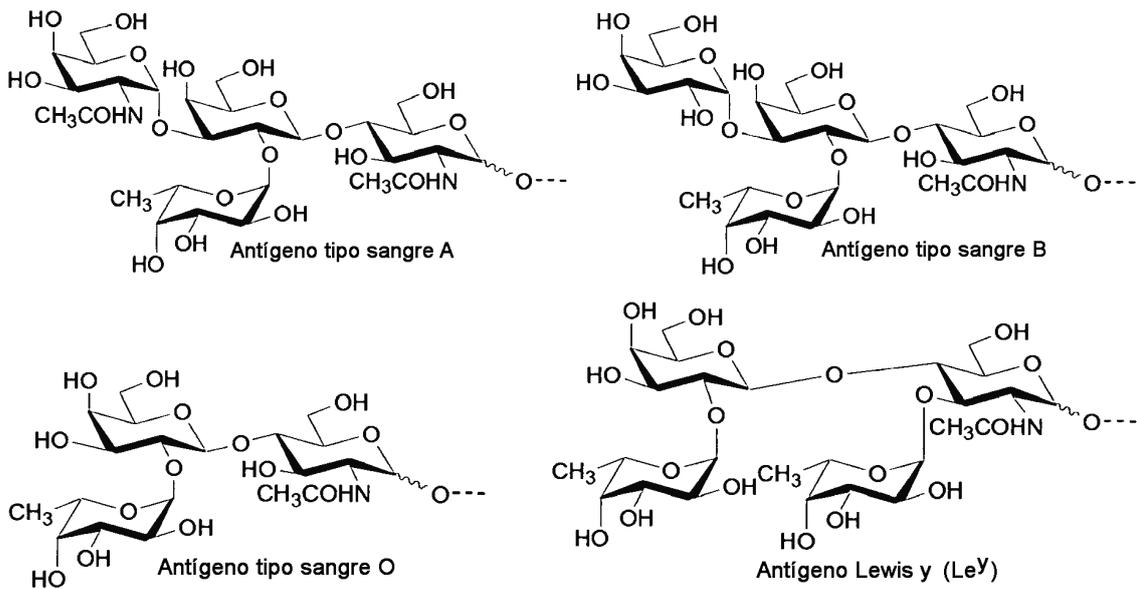
y

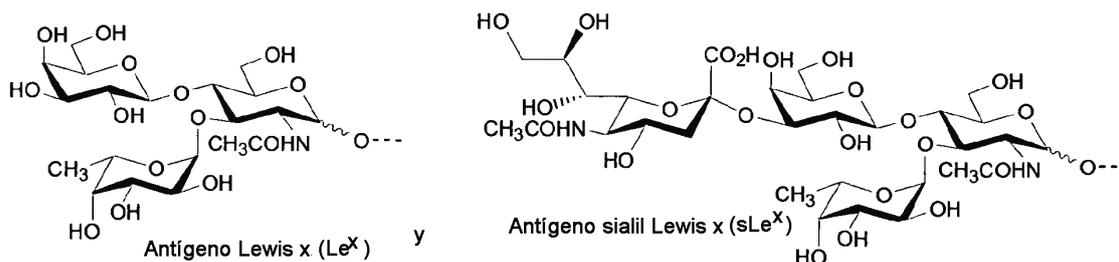


3. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según la reivindicación 1, en el que los derivados de azúcar en el grupo C se seleccionan del grupo que comprende:



5



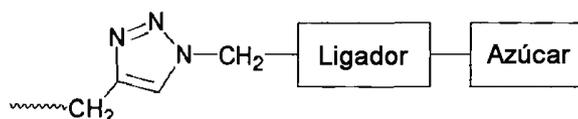


4. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según la reivindicación 1, en el que el azúcar definido en el grupo C se selecciona del grupo que comprende β-D-galactosilo, α-D-mannosilo y α-L-fucosilo.

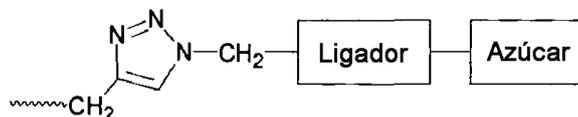
5. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ligador definido en el grupo C se selecciona del grupo que comprende:

- n = 1, m = 1, V = CH₂-CH₂-O-CH₂, U = CH₂,
- n = 1, m = 1, V = C₆H₄ ("Ph"), U = ausente,
- n = 1, m = 1, V = CH₂-CO-NH-CH₂, U = CH₂,

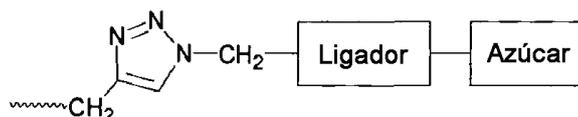
6. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dos de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representan el grupo de fórmula:



7. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que tres de los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representan el grupo de fórmula:



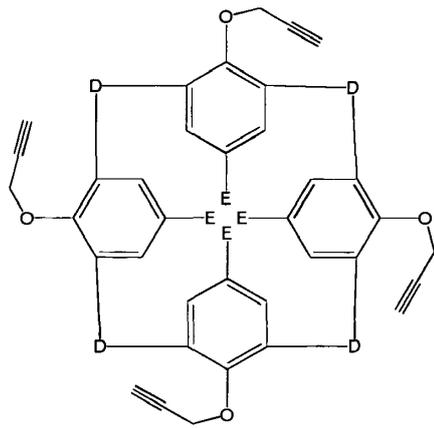
8. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los cuatro grupos C del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representan el grupo de fórmula:



9. Un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que D representa un grupo -CH₂-, E representa un grupo alquilo que es el grupo terc-butilo, y A definido en el grupo B del compuesto glicosilado a base de calixareno (I) representa un átomo de oxígeno.

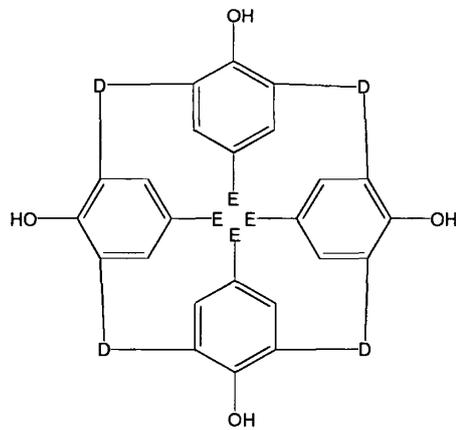
10. Un procedimiento para la preparación de un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- (a) Preparar un calix[4]areno propargilado de fórmula (IV):



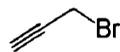
(IV)

en la que D y E son como se definen en la reivindicación 1,
mediante multipropargilación regioselectiva de un calix[4]areno de fórmula (V):



(V)

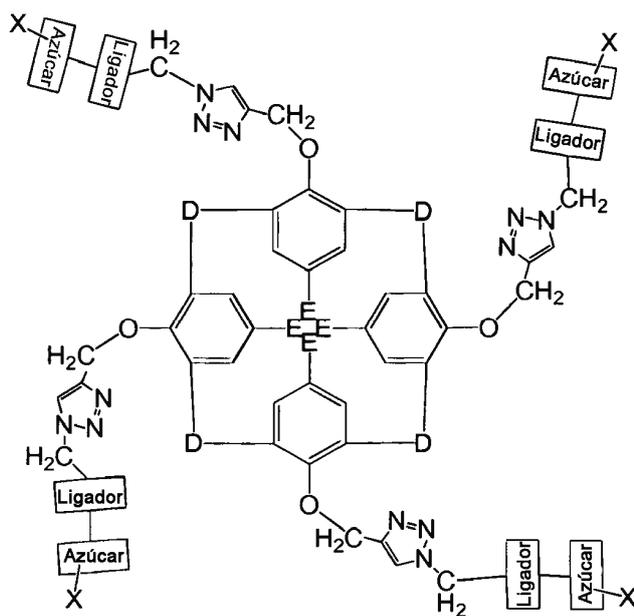
5 con un compuesto propargilado de fórmula (VI):



(VI)

en presencia de una base, para obtener el calix[4]areno propargilado (IV),

(b) preparar un compuesto glicosilado a base de calixareno protegido de fórmula (II):



en la que

el ligador y el azúcar son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,

5 X representa un grupo protector seleccionado del grupo que comprende acetato (CH₃CO), benzoato (C₆H₅CO) o bencilo (C₆H₅CH₂), y este grupo protector está unido al átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo del azúcar,

mediante conjugación del calix[4]areno propargilado (IV) como se obtiene en la etapa previa con un derivado de hidrato de carbono de fórmula (III) que posee una funcionalidad azido próxima al extremo del ligador:



10 preparándose el mencionado hidrato de carbono mediante glicosilación con un ligador que posee una función alcohol en un extremo y una función azido en el otro extremo.

(c) Obtener el compuesto glicosilado a base de calixareno (I) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 mediante desprotección de los grupos protectores del mencionado compuesto glicosilado a base de calixareno protegido de fórmula (II).

15 11. Una composición farmacéutica caracterizada por que comprende un compuesto glicosilado a base de calixareno (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en combinación con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

12. La composición según la reivindicación 11, caracterizada por que comprende además un agente terapéutico útil como agente antiinfeccioso frente a patógenos que usan lectinas en las primeras etapas de infección.

20

Figura 1a

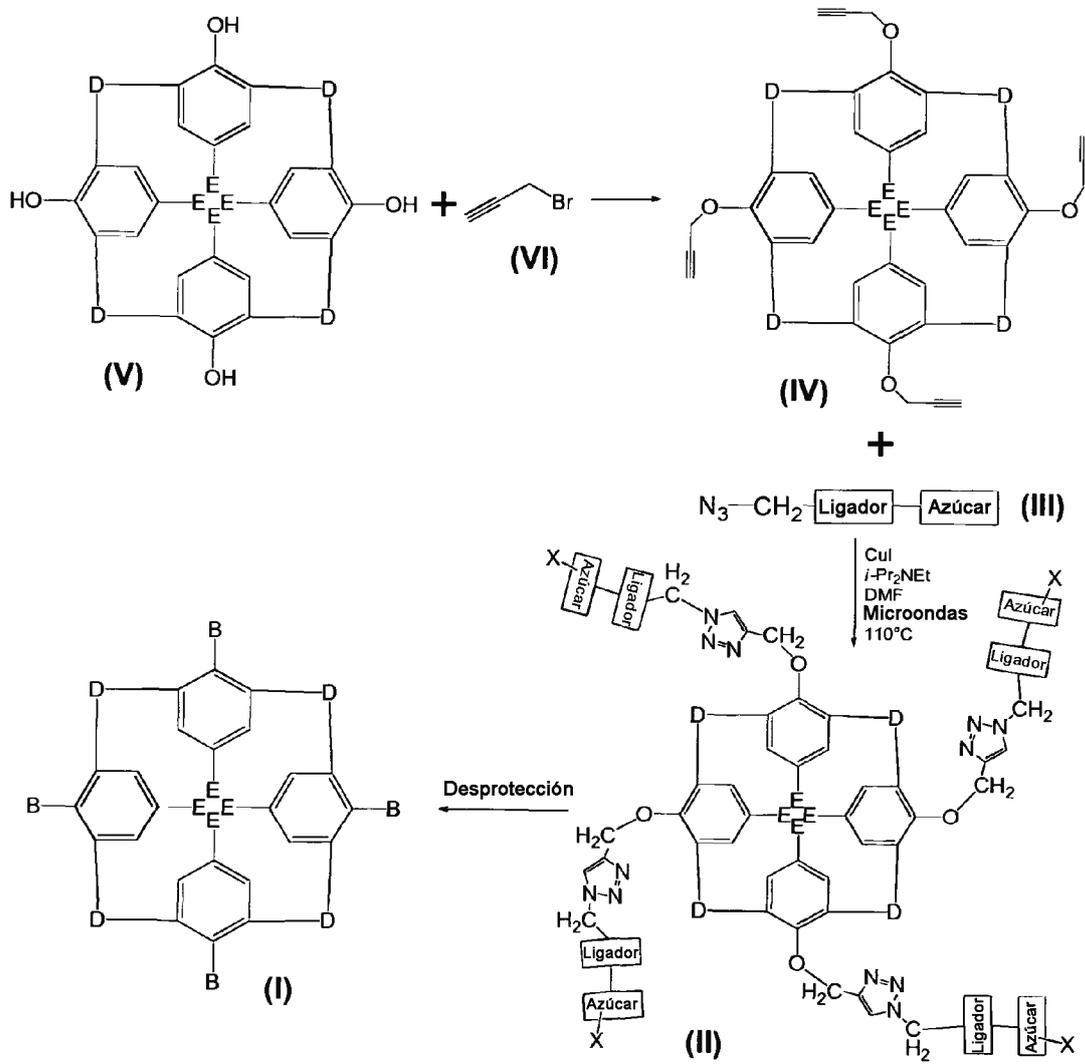


Figura 1b

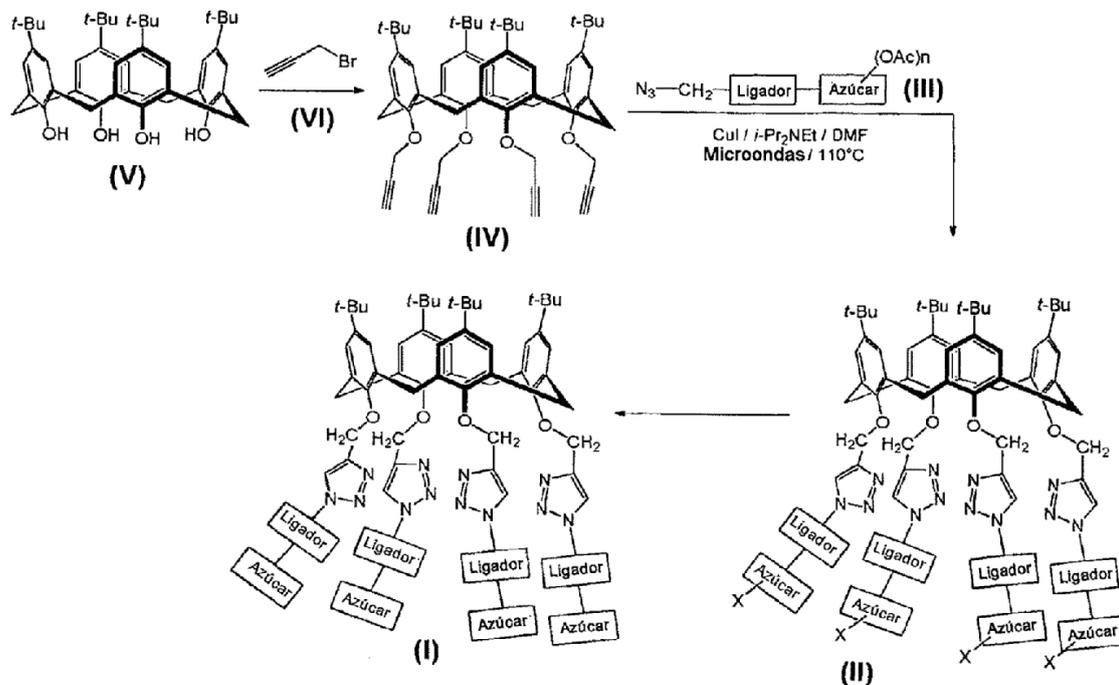


Figura 2a

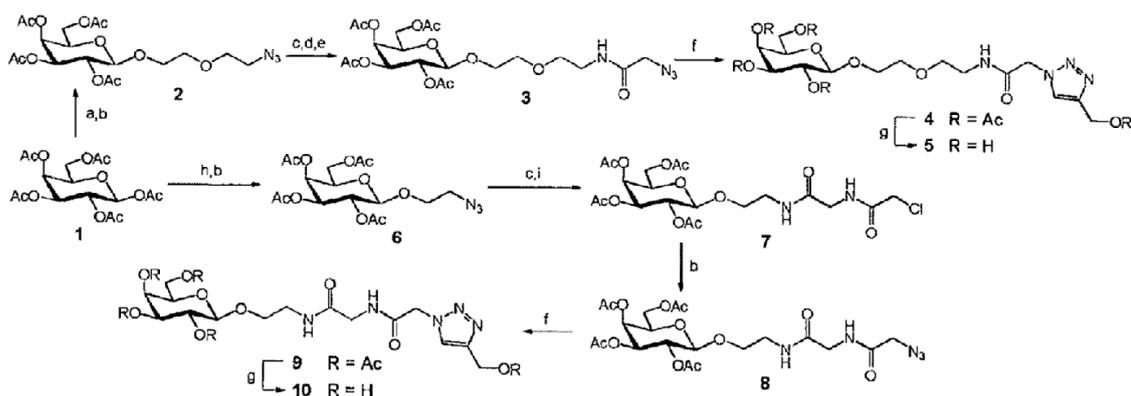


Figura 2b

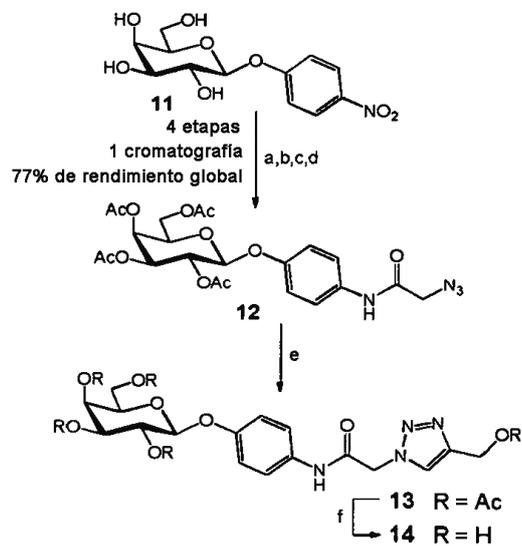


Figura 3a

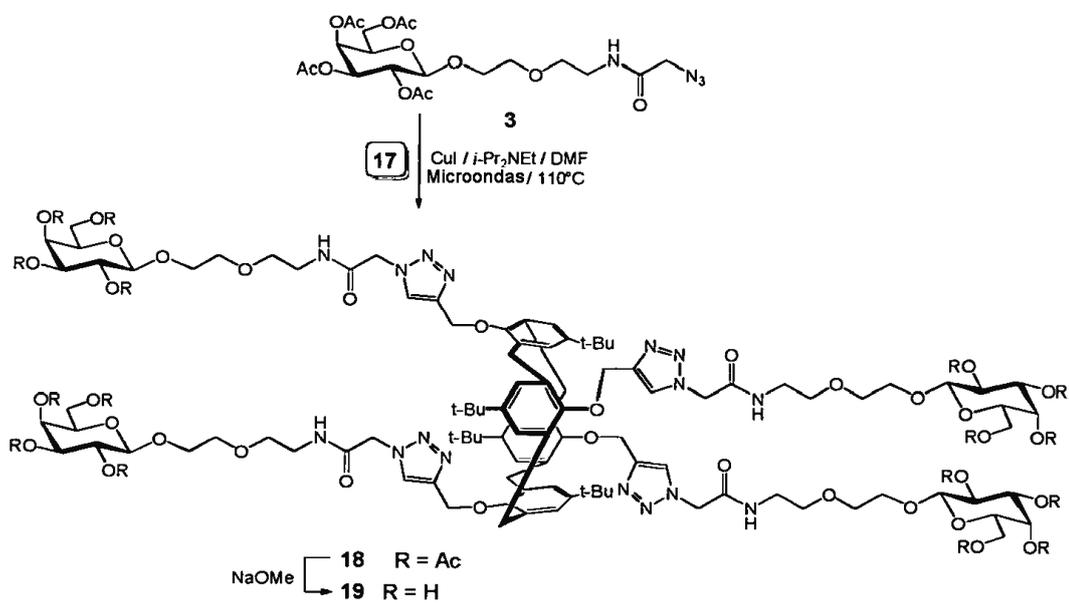
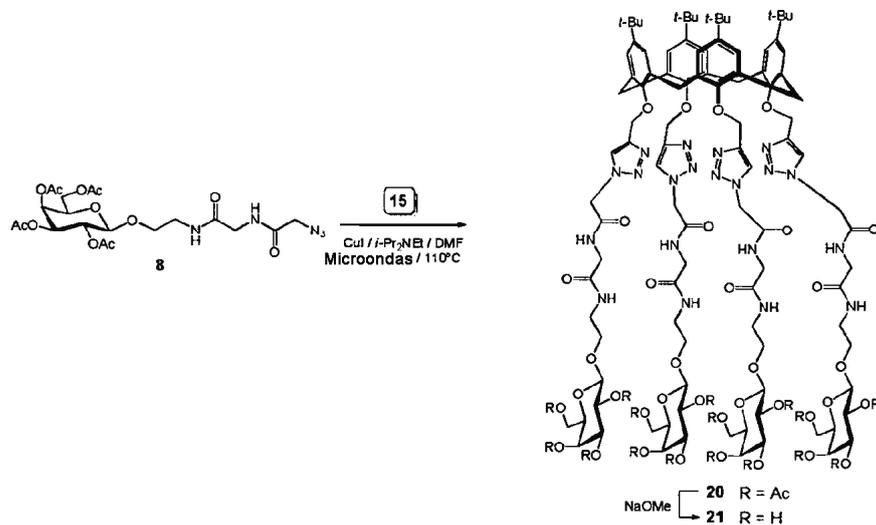
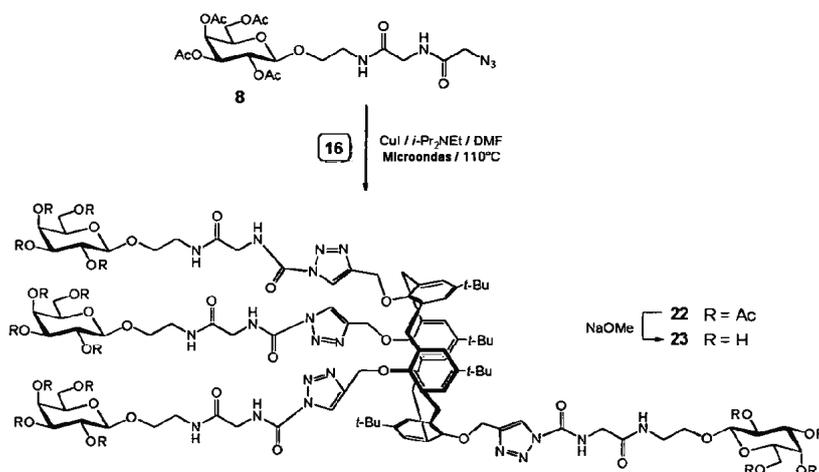


Figura 3b

(3b-1)



(3b-2)



(3b-3)

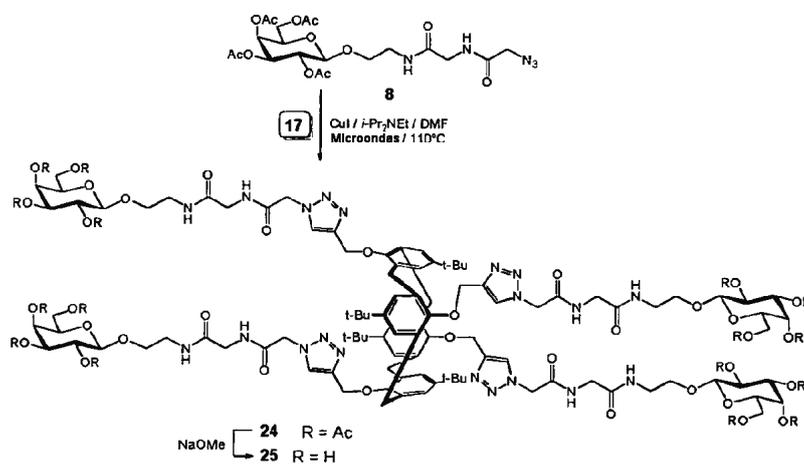


Figura 3c

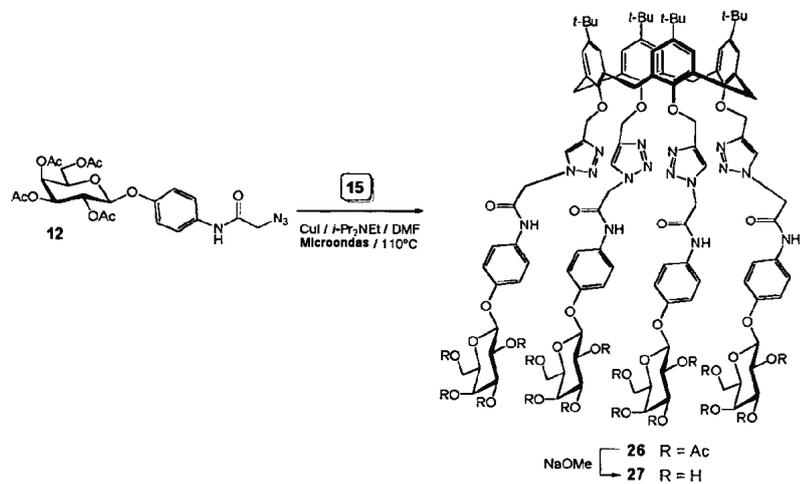
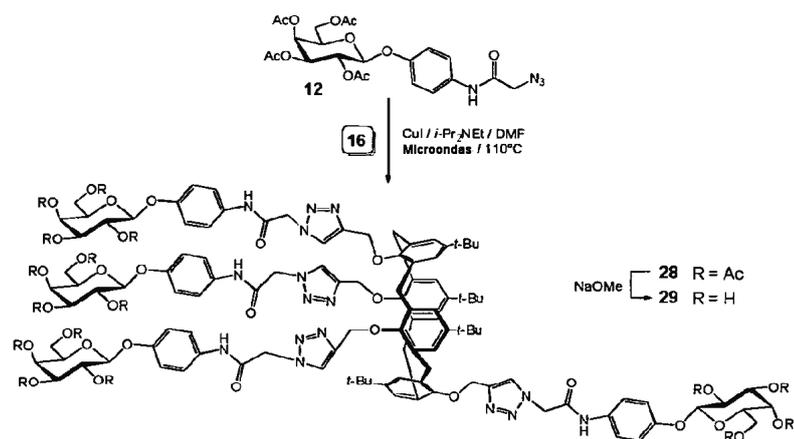
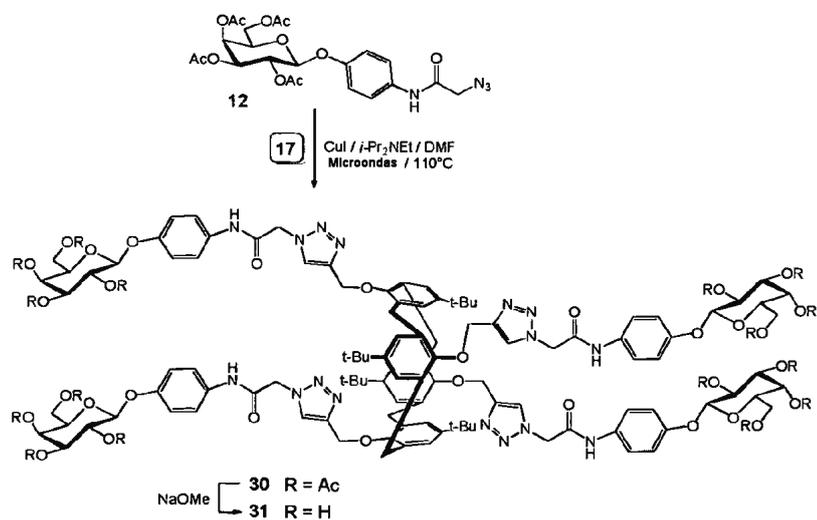
(3c-1)**(3c-2)****(3c-3)**

Figura 4

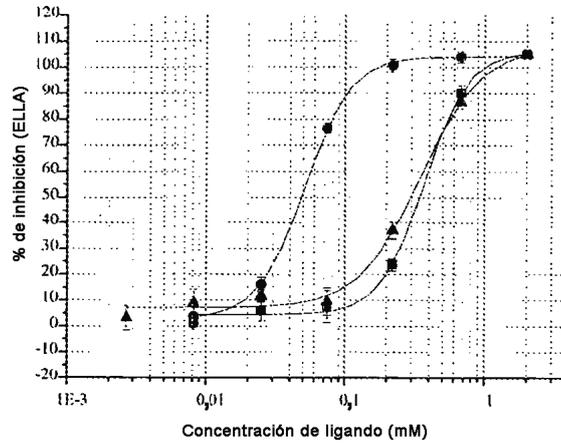


Figura 5a

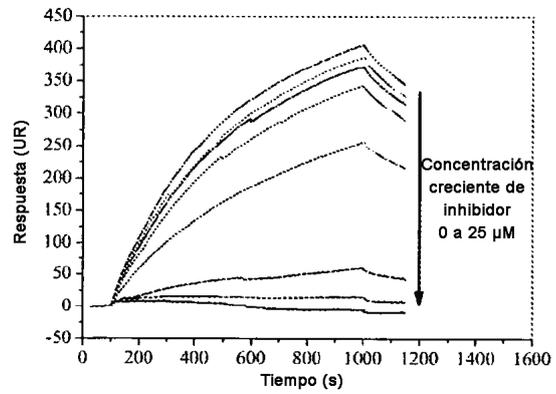


Figura 5b

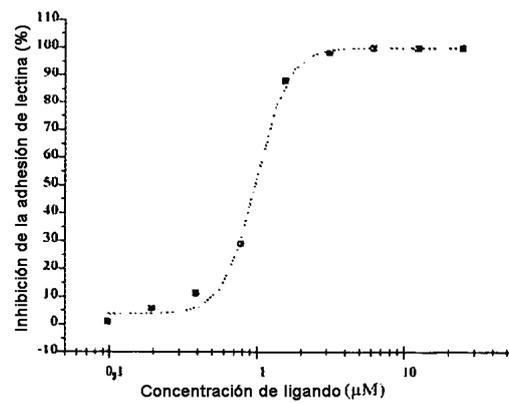


Figura 6

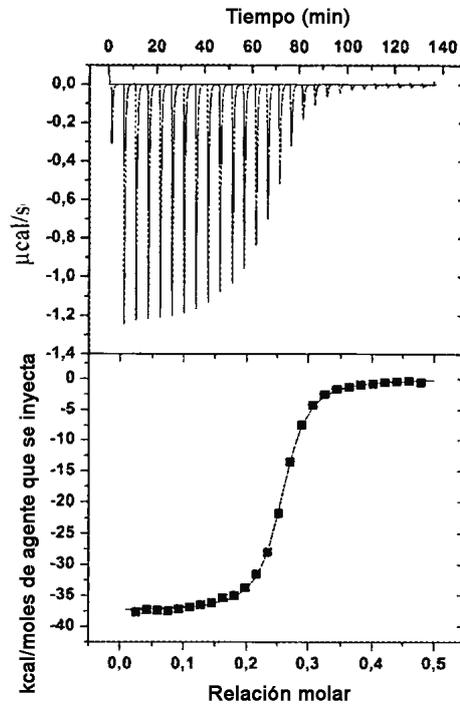


Figura 7

