

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 004**

51 Int. Cl.:

C07H 15/26 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.09.2014 PCT/EP2014/070110**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015 WO15040209**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2014 E 14771331 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 3049426**

54 Título: **Glicoclusters y su uso farmacéutico como antibacterianos**

30 Prioridad:

23.09.2013 EP 13306296

21.03.2014 FR 1452355

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

22.02.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

3, rue Michel-Ange

75794 Paris Cedex 16, FR y

UNIVERSITE DE MONTPELLIER (50.0%)

72 Inventor/es:

MORVAN, FRANÇOIS;

VASSEUR, JEAN-JACQUES;

LIGEOUR, CAROLINE;

CHEVOLOT, YANN;

SOUTEYRAND, ELIANE;

VIDAL, OLIVIER;

GOUDOT, ALICE y

VIDAL, SÉBASTIEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 656 004 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).

Glicoclusters y su uso farmacéutico como antibacterianos**Descripción**5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere a nuevos compuestos (I) o (II) del tipo glicocluster con residuos de galactosa en sus extremos. Tales compuestos han demostrado buena afinidad con la lectina 1 de *Pseudomonas aeruginosa*, que es un factor de virulencia de esta bacteria. La invención proporciona métodos simples y eficientes para la preparación de estos compuestos. También se dirige al uso médico de los compuestos (I) o (II) como inhibidores de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*, más específicamente como inhibidores de la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] *Pseudomonas aeruginosa* (PA) es un importante problema de salud pública debido a su impacto sobre las infecciones nosocomiales así como a su impacto sobre la mortalidad del paciente con fibrosis quística. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) es una bacteria gramnegativa, aeróbica, no fermentadora de la glucosa y móvil a través de flagelo polar monótono. Es un patógeno oportunista clínicamente importante, a menudo relacionado con infecciones hospitalarias, debido a su capacidad de sobrevivir durante largos períodos de tiempo, con requisitos nutricionales mínimos y con una alta tolerancia a las variaciones ambientales. PA es responsable del 10-30% de las infecciones adquiridas en el hospital (Floret, N. et al., (2009), Pathol. Biol. 57, 9-12). También es el patógeno más frecuente, que conduce progresivamente a la inflamación crónica y a la degradación del tracto respiratorio de pacientes con Fibrosis Quística (Lyczak, JB et al., (2002) Clinical Microbiology Reviews 15, 194-222). Actualmente, el uso de antibióticos es la única forma que puede ser efectiva contra la infección por PA. Sin embargo, a este respecto, la multiplicación bacteriana en una estructura de biopelícula parece dar una ventaja selectiva al patógeno (Stewart, PS y Costerton, JW (2001) Lancet 358, 135-138. Landry, R.M. et al., (2006) Mol. Microbiol. 59, 142 - 151).

30 [0003] En consecuencia, con respecto a la aparición de resistencia de la mayoría de las bacterias patógenas, especialmente PA, a antibióticos, el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos capaces de escapar de los mecanismos de resistencia o de nuevos modos de acción se ha convertido en un imperativo y es un importante desafío para la investigación para tratar o prevenir enfermedades infecciosas. Por lo tanto, la inhibición de la virulencia de PA se ha propuesto como una estrategia alternativa para abordar las infecciones basadas en PA.

35 [0004] La PA-IL, una lectina de unión a galactosa de PA, está implicada en su virulencia. La lectina 1 de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-IL, Lec A) es una lectina tetravalente con una forma casi rectangular con sitios de unión distantes de 71 Å en el lado largo, y 32 Å en el lado corto (Cioci, G. et al., (2003) FEBS Lett. 555, 297 - 301; Imberty, A., et al., (2004) Microb. Infect. 6, 221 - 228). La unión de PA-IL para galactósidos monovalentes se extiende en el rango micromolar (con la mayor afinidad por Fenilo-β-Gal) y está influenciada por la estructura del aglicón (Garber, N. et al., (1992) Biochim. Biophys. Acta 1116, 331 - 333; Chen, C.P. et al., (1998) Glycobiology 8, 7 - 16).

45 [0005] La unión de PA-IL puede alcanzar el rango nanomolar cuando se aprovecha el denominado efecto de agrupación (Lis, H. y Sharon, N. (1998) Chem. Rev. 98, 637-674; Lundquist, J.J., y Toone, E.J. (2002) Chem. Rev. 102, 555 - 578; Lee, YC y Lee, RT (1995) Acc. Chem. Res. 28, 321 - 327). Los ligandos de carbohidratos multivalentes pueden presentar una unión potenciada a la lectina diana por residuos de hidratos de carbono en comparación con el ligando monovalente. El alcance de la mejora es, entre otras cosas, una función de la topología, ya que los residuos deberían caber en los sitios múltiples de las lectinas.

50 [0006] S. Cecioni et al., Chem. EUR. J. 2009, 15, 13232 - 13240 describe glicoconjugados de calix[4]areno dirigidos a PA-IL. Sin embargo, los conjugados de calixareno son difíciles de preparar, con formación potencial de diastereoisómeros y toxicidad potencial de calixareno. F. Pertici et al., Chem. Commun., 2012, 48, 4008-4010 divulga derivados de di-galactosa como potentes inhibidores divalentes de lectina de LecA de *Pseudomonas aeruginosa*. El método de preparación de estos compuestos es largo y complicado. A. Ingerti et al., Chem. EUR. J. 2008, 14, 7490 - 7499 describe glicoclústers y su afinidad por FimH de *E. Coli* o PA-III de *Pseudomonas aeruginosa*. I. Deguise et al., New J. Chem., 2007, 31, 1321-1331, describe la síntesis de glicodendrimeros que contienen residuos de fucósidos y galactosidos y sus propiedades de unión a lectinas de PA-IL y PA-III de *Pseudomonas aeruginosa*. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 10631-10635 describe un inhibidor de dendrimeros de glicopéptido de biopelículas de lectina LecA y de *P. aeruginosa*. No menciona la inhibición de la adhesión de PA-IL.

60 [0007] Para competir eficazmente con los glicoconjugados de la superficie celular, los glicomiméticos deben presentar una fuerte afinidad con su diana. La baja afinidad de las interacciones de lectina-carbohidrato es una barrera en el desarrollo de compuestos glicomiméticos biológicamente activos, y la multivalencia ha permitido superar en parte esta dificultad. Sin embargo, si los resultados de la técnica anterior confirman el gran potencial de los glicomiméticos para prevenir la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* y para su uso en la prevención y el tratamiento de la infección bacteriana, sigue existiendo la necesidad de moléculas con una afinidad alta con PA-IL.

[0008] El diseño y la síntesis de tales compuestos no es fácil: la afinidad de un glucomimético por lectina depende no solo del número de grupos de carbohidrato exhibidos por la molécula y es capaz de interactuar con lectina PA-IL. También depende de su disposición en la molécula: la naturaleza, longitud y flexibilidad de los brazos enlazadores que unen los grupos de carbohidrato al resto de la molécula. Además, a causa de una síntesis complicada, muchos glucomiméticos de la técnica anterior son accesibles solo en pequeñas cantidades.

[0009] Sigue existiendo la necesidad de que las moléculas presenten una gran afinidad por las lectinas de patógenos, especialmente por PA-IL. En particular, sigue existiendo la necesidad de moléculas capaces de inhibir la adhesión de *P. aeruginosa*, inhibiendo así la formación de una biopelícula de *P. aeruginosa*. Tales moléculas deberían poder producirse por métodos simples y eficientes para dar acceso a un medicamento.

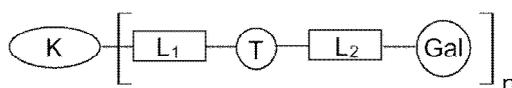
RESUMEN DE LA INVENCION

[0010] La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier divulgación que vaya más allá del alcance de dichas reivindicaciones solo tiene fines ilustrativos.

[0011] El objeto de la presente invención es aliviar al menos parcialmente los inconvenientes mencionados anteriormente.

[0012] La invención proporciona moléculas que presentan una fuerte afinidad por lectinas de patógenos, especialmente por PA-IL. Más particularmente, la invención se dirige a ligandos sintéticos hacia PA-IL para su inhibición. Más específicamente, la invención se dirige a compuestos que se dirigen a la inhibición de la adhesión de PA. Los grupos centrados en monosacáridos y los grupos similares a peines se sintetizaron con diferentes enlazadores que portaban un grupo arilo que separaba el núcleo y los residuos de galactosilo. Se describen métodos simples y eficientes para la preparación de estos compuestos. Dichos métodos podrían extrapolarse fácilmente a escala industrial.

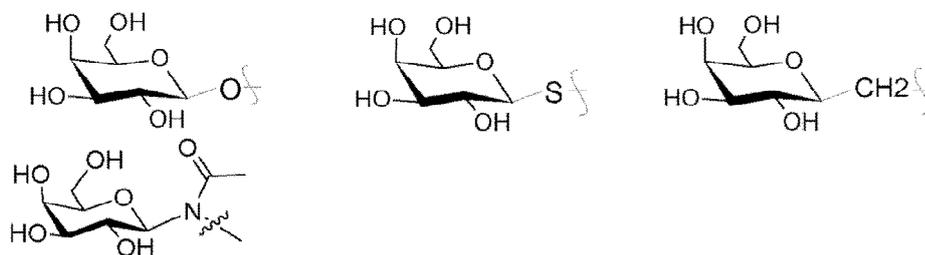
[0013] Este objetivo se logra con una molécula que responde a la fórmula (I):



(I)

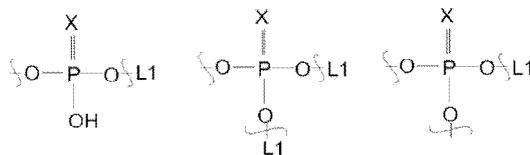
[0014] Donde

- n es un número entero seleccionado de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
- Gal representa un radical seleccionado de: galactopiranosilo, 1-tiogalactopiranosilo, 1-metilgalactopiranosilo, 1-N-acetilo-galactopiranosilo:

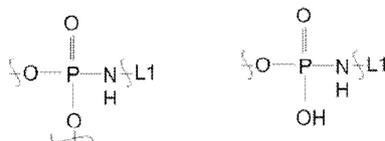


- K representa una molécula de fórmula (KI) o (KII) que comprende de 3 a 6 grupos fosfato o tiofosfato o fosforamidato (Pho) seleccionados de:

5



10



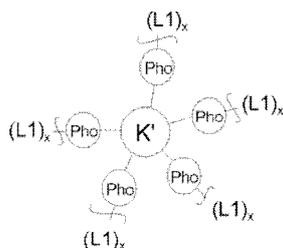
15

Donde X representa O o S,
 Uno o dos átomos de oxígeno del grupo fosfato están unidos por un enlace covalente a un brazo enlazador L1,

20

los grupos de fosfato o tiosfosfato o fosforamidato Pho estando vinculados al mismo centro K' representado en la fórmula (KI) aquí debajo:

25



30

(KI)

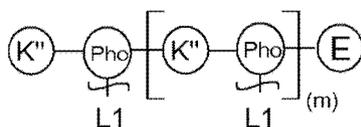
35

representando K' una molécula que comprende de 4 a 24 átomos de carbono, de 0 a 12 átomos de oxígeno, y el número correspondiente de átomos de hidrógeno,
 un átomo de oxígeno de Pho está unido por un enlace covalente a K',
 x = 1 o 2

40

o
 los grupos de fosfato o tiosfosfato o fosforamidato forman una cadena como se representa en la fórmula (KII) aquí debajo:

45



50

(KII)

55

donde K'' representa una molécula que comprende de 4 a 12 átomos de carbono, de 0 a 6 átomos de oxígeno, de 0 a 6 átomos de nitrógeno, y el número correspondiente de átomos de hidrógeno,
 E representa un grupo final que comprende de 0 a 12 átomos de carbono, de 0 a 6 átomos de oxígeno, de 0 a 6 átomos de nitrógeno, y el número correspondiente de átomos de hidrógeno,
 m representa un número entero seleccionado de 2, 3, 4, 5,
 dos átomos de oxígeno de Pho están unidos por un enlace covalente a grupos K'' o a E,

60

- L1 representa un brazo enlazador seleccionado de:

65

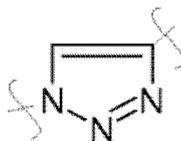
- un radical alquilo C1-C18 lineal, ramificado o cíclico, que comprende posiblemente uno o varios

- puentes de éter -O-,
- un di radical de poli(etilenglicol) que comprende de 2 a 6 unidades de etilenglicol,
- un di radical de polipilenoglicol) que comprende de 2 a 6 unidades de propilenglicol,

5 • T representa un grupo de conexión seleccionado de:

- un di-radical de triazol

10



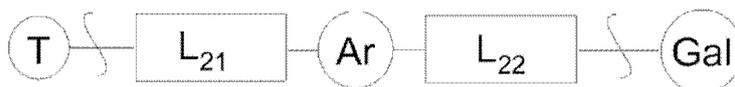
15

- un puente tio -S-

• L2 representa un brazo enlazador que responde a la fórmula $-L_{21}-Ar-L_{22}-$ representada aquí abajo:

20

25



30 Donde

L_{21} representa un di-radical de alquilo C1-C12 lineal, ramificado o cíclico, que posiblemente comprende uno o varios grupos seleccionados entre: un puente de amida -CO-NH-, un puente de éter -O-, un puente de tio -S-, un puente de amina -NH-,

35 Ar representa un di-radical aromático C6-C18 que incluye opcionalmente de uno a 6 heteroátomos,

L_{22} representa un enlace covalente o cuando Gal representa un radical seleccionado de: galactopiranosilo, 1-tiogalactopiranosilo, L_{22} puede ser un radical -CH₂-.

40 **[0015]** Las realizaciones preferidas comprenden una o más de las siguientes características:

40

[0016] Una molécula que responde a la fórmula (I), en la que se verifican una o varias de las siguientes condiciones:

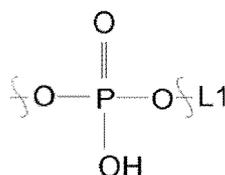
45

- Gal representa un radical β -D-galactopiranosilo, o un radical β -D-tio-1-galactopiranosilo, preferiblemente un β -D-galactopiranosilo,
- T representa un di radical de triazol
- L1 representa un brazo de engarce seleccionado de: una cadena alquilo lineal C2-C6, 1,1,1-(trishidroximetilo)etano, un di radical de poli(etilenglicol) que comprende 2 a 4 unidades de etilenglicol,
- L_{21} representa una cadena de alquilo lineal C1-C12 que comprende una función de amida -CO-NH- en su extremo conectado al grupo Ar,
- Ar representa un di-radical aromático C6-C12, preferiblemente Ar representa un grupo seleccionado entre: fenilo, naftalenilo, 1,4-bifenilo, incluso más preferiblemente Ar es fenilo,
- L_{22} representa un enlace covalente.

50

55 **[0017]** Una molécula que responde a la fórmula (I), en donde K se representa por la fórmula (KI), x = 1 K comprende de 3 a 5 grupos pendientes de Pho:

60

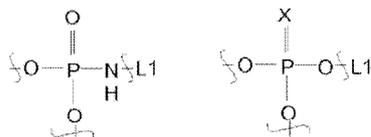


65

y K' representa un carbohidrato seleccionado de: una piranosa y una furanosa.

[0018] Una molécula que responde a la fórmula (I), en la que K' representa un carbohidrato seleccionado entre: manosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ribosa y lactosa.

[0019] Una molécula que responde a la fórmula (I), donde K se representa por la fórmula (KII), K'' representa un grupo de di-ilo de alcano lineal, ramificado o cíclico que comprende de 4 a 10 átomos de carbono y Pho es:



Donde X = O, S.

[0020] Una molécula que responde a la fórmula (I), en la que K'' representa un grupo seleccionado entre 1,4-dimetilciclohexilo, 1,4-dietilciclohexilo.

[0021] Una molécula que responde a la fórmula (I), seleccionada de entre:

(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal)₃

(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal)₄

(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal)₅

Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄

Gal(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄

Glc(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄

Man(POEG2MTzAcNPhe-O-Gal)₄

Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₈

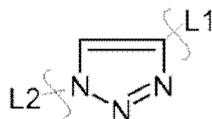
Man[POTHME(MTzAcNPhe-O-Gal)₂]₄

[0022] En donde DMCH representa dimetilciclohexano, Man representa manosa, Gal representa galactosa, Glc representa glucosa;

Pro representa 1,3-n-propilo, Hex representa 1,6-n-hexilo, EG2M representa metileno de dietilenglicol, THME

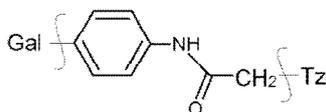
representa tris-(hidroximetil)etano;

Tz representa triazol



EG2 representa dietilenglicol,

AcNPhe representa acetamidofenilo:



M representa metileno,

Gal representa galactopiranosilo,
 PN representa el enlace de fosoramidato
 PO representa el enlace de fosfato.

5 **[0023]** La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 **[0024]** De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para inhalarse o instilarse en el tracto respiratorio.

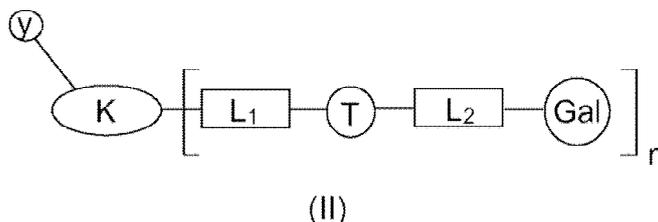
15 **[0025]** Según una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además al menos uno o más agentes antibacterianos diferentes o uno o más agentes de antivirulencia o uno o más fármacos que refuerzan la inmunidad innata del huésped

20 **[0026]** La invención también se dirige a un compuesto que responde a la fórmula (I) o (II), para uso para la prevención, retraso, atenuación y tratamiento terapéutico de infecciones debidas a patógenos microbianos, particularmente patógenos bacterianos.

25 **[0027]** De acuerdo con una realización preferida, el compuesto es para tratar, retrasar, atenuar o prevenir infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*.

30 **[0028]** De acuerdo con una realización preferida, el compuesto es para administración a pacientes con fibrosis quística, o pacientes bajo asistencia respiratoria.

35 **[0029]** Otro objeto de la invención es una molécula que responde a la fórmula (II):



40 K, n, Gal, T, L1, L2 tienen la misma definición que en la reivindicación 1 y en donde y representa un marcador, como una secuencia de ADN o un colorante fluorescente.

45 **[0030]** Otras características y ventajas de la invención aparecerán a partir de la siguiente descripción de realizaciones de la invención, dadas como ejemplos no limitantes, con referencia a los dibujos adjuntos enumerados a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031]

50 La Fig. 1 muestra la estructura general de algunos galactoclústers centrados en manosa con la naturaleza y la longitud de sus enlazadores. En el lado izquierdo, los vinculadores están vinculados al andamio. En el lado derecho, están vinculados al residuo de galactosilo.

La Fig. 2 muestra la estructura de los bloques de construcción para la síntesis de los galactoclústers

55 La Fig. 3a y 3b es un esquema que muestra la síntesis de glicoclústers **17a-e** y **18**. L2 se explican en el subtítulo de Fig.2.

La Fig. 4 muestra la estructura de controles de glicocluster de (DMCH-PNMTzEG3-O-Man)₃ **C1** negativo y (DMCH-PNMTzEG3-O-Gal)₄ **C2** positivo

La Fig. 5 es un gráfico que muestra la intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias ua) de glicoclústers **C1**, **C2**, **17a-e** y **18** unidos con Alexa 647-PA-IL en micromatriz.

60 La Fig. 6 es un esquema que ilustra un camino sintético hacia la estructura (I) con K respondiendo a la fórmula (KI)

Las Figs. 7a y 7b son esquemas que ilustran un camino sintético hacia la estructura (I) con K respondiendo a la fórmula (KII). La Fig. 7a ilustra la construcción de enlaces de fosoramidato. La Fig. 7b ilustra la construcción de enlaces de fosfotriéster o tionofosfodrililo.

65 La Fig. 8 es un esquema que ilustra la síntesis de clusters lineales (DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal)₂₋₅ (**22-25**) y (dT-PNMTzAcNPhe-O-Gal)₄ (**26**)

La Fig. 9 representa la estructura de los seis tetragalactoclústers centrados en hexosas sintetizados a partir de una manosa (**17d**, **18**), núcleo de galactosa (**27**, **29**) y núcleo de glucosa (**28**, **30**) y un conjugado de mono-TzAcNPhe-O-Galactosa (**31**).

Fig. 10: Unidad arbitraria de fluorescencia (a. u.) de glicoclústers lineales y centrados en hexosas (**DMCH-PNMTzEG3-O-Man**)₃ **C1**, (**DMCH-PNMTzEG3O-Gal**)₄ **C2** (**DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal**)₂₋₅ (**22-25**), (**dT-PNMTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**26**), **Man-** (**POProTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**17d**), **Gal-** (**POProTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**27**), **Glc-** (**POProTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**28**), **Man-(HexTzM-O-Gal)**₄ (**18**), **Gal-(HexTzM-O-Gal)**₄ (**29**) y **Glc-(HexTzM-O-Gal)**₄, (**30**) vinculado con alexa647-PA-IL.

Fig. 11: Estructura de propargilo di- o tetra-etilenglicol **1a**, **1b**, bis-pent-4-inilo **1c** y 2,2-(bis-propargiloximetilo)propilo **1d** fosforamiditas.

Fig. 12a y Fig.12b: Esquema de síntesis y estructuras de **Man(POEG2MTzEG3-O-Gal)**₄ (**36**), **Man(POEG2MTzAcNPhe-O-Gal)**₄ (**32**), **Man(POEG4MTzAcNPhe-O-Gal)**₄ (**33**), **Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)**₈ (**34**), **Man[POTHME(MTzAcNPhe-O-Gal)**₂]₄ (**35**), **Man(POProTzBuT-Gal)**₄ (**37**), **Man(POEG2MTzBuT-Gal)**₄ (**38**) y **Man[POTHME(MTzBuT-Gal)**₂]₄ (**39**).

Fig. 13: Esquema de síntesis de *N*³-(4-azido-butilo)-*N*¹-(2',3',4',6'-tetra-O-acetilo-galactosa)-timina **4f**.

Fig. 14: Unidad arbitraria de fluorescencia (a. u.) de glicoclústers lineales y centrados en hexosas unidas con alexa647-PA-IL.

Fig. 15: Esquema de síntesis de **G1 Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)**₄, **G2 (Man(POEG2MTzAcNPhe-O-Gal)**₄) y **G3 (Man(POProTzEG3-O-Gal)**₄).

Fig. 16: Curvas ELLA de los galactomiméticos G1 (▲), G2 (●), G3 (x) y monómeros Gal-O-Me (■) y Gal-O-Phe-NO₂ (♦). % de inhibición (ordenada) - Concentración (abscisa, mM)

Fig. 17a y 17b: Datos de microcalorimetría. El gráfico de ITC (medido por VP-ITC, Microcal) se obtuvo a partir de la titulación de PA-IL con glicomiméticos G1-3. Los gráficos en los paneles inferiores muestran la cantidad total liberada en función de la concentración total de ligando para la titulación que se muestra en los paneles superiores. Las líneas continuas representan el mejor ajuste de mínimos cuadrados para los datos experimentales utilizando un modelo de un solo sitio. Kcal/mol de inyectante (ordenado) - Concentración (relación molar).

Fig. 18: Ensayos de adhesión bacteriana. Porcentaje de inhibición de la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) en células NCI-H292 con concentración variable de galactomiméticos **G1** (Man (POProTzPhe-O-Gal)₄) inhibidor. % Inhibición (ordenada) - Concentración (abscisa, mM)

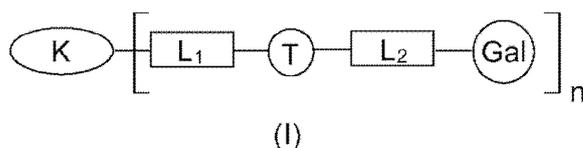
La Fig. 19 es un esquema que ilustra la síntesis de galactósidos de O-bifenilo, O-naftilo 5 y 6.

La Fig. 20 es un esquema que ilustra la síntesis de galactósidos de S-bifenilo, S-naftilo 5S y 6S.

La Fig. 21 es un esquema que ilustra la síntesis de glicoclústers G1-G24.

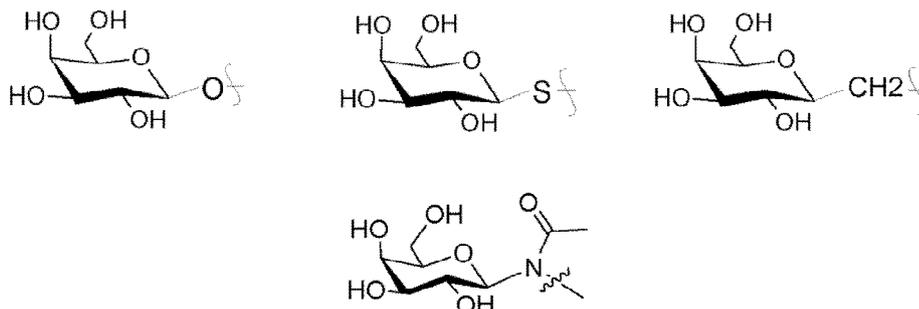
DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0032] La descripción proporciona moléculas que responden a la fórmula (I):



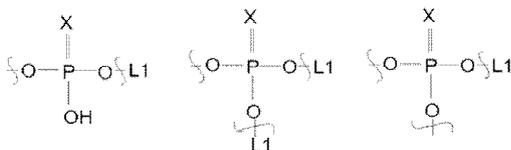
Donde

- n es un número entero seleccionado de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
- Gal representa un radical seleccionado de: galactopiranosilo, 1-tiogalactopiranosilo, 1-metilgalactopiranosilo, 1-N-acetilo-galactopiranosilo:



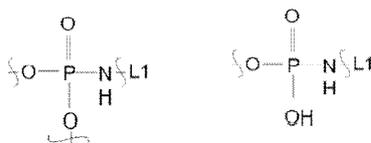
- K representa una molécula de fórmula (KI) o (KII) que comprende de 3 a 6 grupos de fosfato o tiofosfato o fosforamidato (Pho) seleccionados de:

5



10

15



20

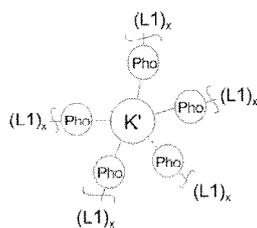
Donde X representa O o S, Uno o dos átomos de oxígeno del grupo de fosfato están unidos por un enlace covalente a un brazo enlazador L1,

de acuerdo con una primera realización, la molécula de fórmula (I) es un grupo centrado en el núcleo:

25

los grupos de fosfato o tiofosfato o fosforamidato están todos vinculados a un mismo centro K' como se representa en la fórmula (KI) aquí debajo:

30



35

(KI)

40

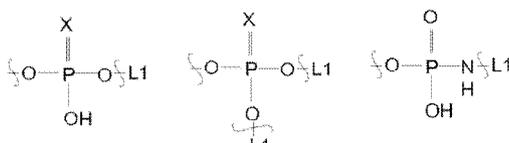
representando K' una molécula que comprende de 4 a 24 átomos de carbono, de 0 a 12 átomos de oxígeno, y el número correspondiente de átomos de hidrógeno, un átomo de oxígeno de Pho está unido por un enlace covalente a K',

45

[0033] El número de grupos de Pho unidos a K' puede variar de 1 a 9. Con el único fin de ilustración, se han representado 5 grupos de Pho en la Figura (KI).

[0034] En (KI) los grupos Pho se conectan al núcleo K' a través de un enlace de fosfato o fosfato de tio y se seleccionan de:

50



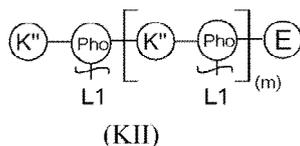
55

[0035] En (KI), x = 1 o 2, ya que los grupos de fosfato y tiofosfato se pueden unir a uno o dos grupos Gal a través de brazos enlazadores -L1-T-L2-.

60

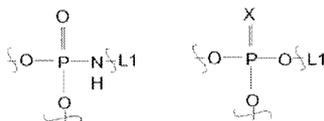
según una segunda realización, la molécula de fórmula (I) es un grupo similar a un peine: los grupos de fosfato o tiofosfato o fosforamidato forman una cadena como se representa en la fórmula (KII) a continuación:

65



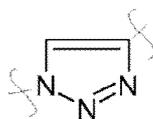
10 donde K'' representa una molécula que comprende de 4 a 12 átomos de carbono, de 0 a 6 átomos de oxígeno, de 0 a 6 átomos de nitrógeno, y el número correspondiente de átomos de hidrógeno,
E representa un grupo final que comprende de 0 a 12 átomos de carbono, de 0 a 6 átomos de oxígeno, de 0 a 6 átomos de nitrógeno, y el número correspondiente de átomos de hidrógeno,

15 **[0036]** De acuerdo con esta realización, K'' y E pueden ser, por ejemplo, un di-radical de alcano o de ciclo-alcano, un di-radical de alquilenglicol, un di-radical de carbohidrato o un di-radical de nucleótido, un di-radical de aralquilo incluyendo al menos dos grupos -CH₂- entre el anillo aromático y -O- de Pho,
E también puede ser H,
m representa un número entero seleccionado de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
dos átomos de oxígeno de Pho están unidos por un enlace covalente a grupos K'' o a E,
20 Pho se selecciona de:



30 **[0037]** Y X es O o S,

- L1 representa un brazo enlazador seleccionado de:
 - un di-radical de alquilo C1-C18 lineal, ramificado o cíclico, que comprende posiblemente uno o varios puentes de éter -O-,
 - un di radical poli(etilenglicol) que comprende de 2 a 6 unidades de etilenglicol,
 - un di radical poli(propilenglicol) que comprende de 2 a 6 unidades de propilenglicol,
- T representa un grupo de conexión seleccionado de:
 - un di-radical de triazol



- un puente tio -S-
- L2 representa un brazo enlazador que responde a la fórmula -L₂₁-Ar-L₂₂- representada aquí-bajo:



Donde

60 L₂₁ representa un radical de alquilo C1-C12 lineal, ramificado o cíclico, que posiblemente comprende uno o varios grupos seleccionados entre: un puente de amida -CO-NH-, un puente de éter -O-, un puente de tio -S-, un puente de amina -NH-,
Ar representa un di-radical aromático C6-C18 opcionalmente que incluye uno a 6 heteroátomos,
L₂₂ representa un enlace covalente o cuando Gal representa un radical seleccionado de: galactopiranosilo, 1-tiogalactopiranosilo, L₂₂ puede ser un radical -CH₂-.

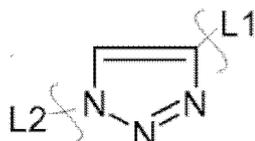
65

[0038] De acuerdo con una variante favorita, Gal representa un radical β -D-galactopiranosilo, o un radical β -D-tio-1-galactopiranosilo. Preferiblemente, en la fórmula (I), Gal representa un β -D-galactopiranosilo.

[0039] De acuerdo con una variante favorita, T representa un di radical de triazol.

[0040] El radical de triazol es no simétrico. En la fórmula (I), el átomo de nitrógeno del anillo de triazol se puede unir a L1 y el átomo de carbono está ligado a L2 o el átomo de nitrógeno se puede unir a L2 y el átomo de carbono está ligado a L1.

[0041] Preferiblemente, como se ilustra en las moléculas descritas en la parte experimental, la conexión es



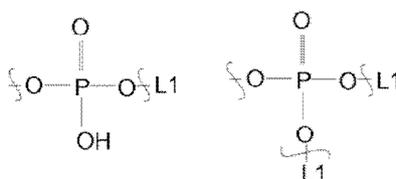
[0042] De acuerdo con una variante favorita, L1 representa un brazo de engarce seleccionado de: una cadena de alquilo lineal C2-C6, 2,2-bis(metiloximetilo)etilo, un di-radical poli(etilenglicol) que comprende de 2 a 4 unidades de etilenglicol.

[0043] De acuerdo con una variante favorita, L₂₁ representa una cadena de alquilo lineal C1-C12 que comprende una función amida -CO-NH- en su extremo conectado al grupo Ar. La conexión a través del enlace amida puede ser alquilo-CO-NH-Ar o Ar-CO-NH-alquilo. Preferiblemente, como se ilustra en la parte experimental, la conexión es alquilo-CO-NH-Ar.

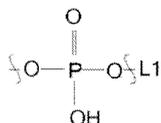
[0044] Según una variante favorita, Ar representa un di-radical aromático C6-C12, preferiblemente Ar representa un grupo seleccionado entre: fenilo, naftalenilo, 1,4-bifenilo, incluso más preferiblemente Ar es fenilo y está sustituido en la posición 1,4.

[0045] De acuerdo con una variante favorita, L₂₂ representa un enlace covalente.

[0046] De acuerdo con una primera realización, K está representado por la fórmula (KI). Preferiblemente, de acuerdo con esta variante, K comprende 3, 4 o 5 grupos pendientes de Pho:



[0047] Incluso más preferiblemente, de acuerdo con esta variante, x = 1, K comprende 3, 4 o 5 grupos Pho pendientes:

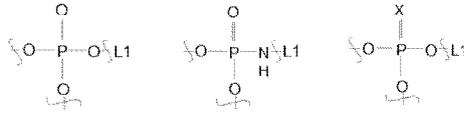


[0048] K' puede representar un poli-radical de alcano lineal, ramificado o cíclico. K' puede representar un poli radical de alcano lineal, ramificado o cíclico. K' también puede representar un poli-radical de carbohidrato lineal, ramificado o cíclico.

[0049] Ventajosamente, de acuerdo con esta variante, K' representa un carbohidrato seleccionado entre: una piranosa y una furanosa. Incluso más preferiblemente, de acuerdo con esta variante, K' representa un carbohidrato seleccionado entre: manosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ribosa y lactosa.

[0050] De acuerdo con otra realización, K está representado por la fórmula (KII). Preferiblemente, de acuerdo con esta variante, K'' representa un grupo de alcano di-ilo lineal, ramificado o cíclico que comprende de 4 a 10 átomos de carbono y Pho es:

5

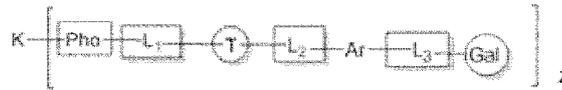


10

[0051] Incluso más preferiblemente, de acuerdo con esta variante, "K" representa un grupo seleccionado entre 1,4-dimetilciclohexilo, 1,4-dietilciclohexilo.

[0052] El objeto de la presente invención también se consigue con una molécula que responde a la fórmula (II):

15

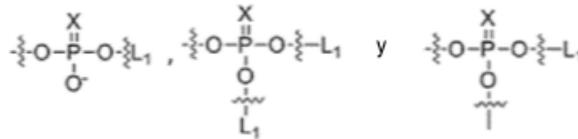


20

Donde

- K representa un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en manosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ribosa y lactosa
- Pho representa un grupo de fósforo seleccionado del grupo que consiste en:

25



30

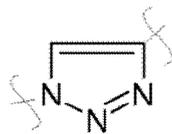
35

Donde X representa O o S,
Uno o dos átomos de oxígeno del grupo de fosfato están unidos por un enlace covalente a un brazo enlazador L1,

40

- L1 representa un brazo de engarce seleccionado del grupo que consiste en:
 - un di radical C₁-C₃ lineal o ramificado, un di radical C₄-C₆ lineal, ramificado o cíclico, un di radical C₇-C₁₂ lineal, ramificado o cíclico que comprende posiblemente uno o varios puentes de éter -O-,
 - un di-radical poli(etilenglicol) que comprende 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de etilenglicol,
 - un di-radical de polipilenoglicol) que comprende 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de propilenglicol,
- T representa un grupo de conexión seleccionado de:
 - un di-radical de triazol

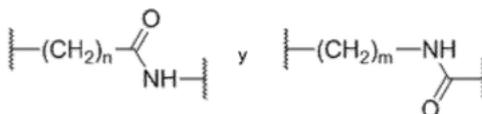
50



55

- L2 representa un brazo de engarce seleccionado del grupo que consiste en

60

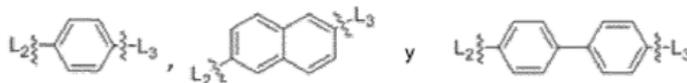


65

n y m representan un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4 o 5

- Ar se selecciona del grupo que consiste en fenilo, naftalenilo y 1,4-bifenilo

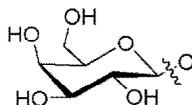
5



10

- L3 representa O, S o -CH2
- Gal representa el radical β-D-galactopiranosilo:

15



20

[0053] Se observa que el grupo -O- corresponde a L3.

- z es un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10

25

[0054] De acuerdo con una variante favorita, K representa la manosa bajo la forma D-mannopiranosilo.

[0055] De acuerdo con una variante favorita L1 representa un grupo Pro (1,3-n-propilo), EG2M (metileno de dietilenglicol), EG3M (metileno de trietilenglicol), EG4M (metileno de tetraetilenglicol).

30

[0056] De acuerdo con una variante preferida Ar es el grupo fenilo.

[0057] De acuerdo con una variante favorita z es 3 o 4.

35

[0058] Las moléculas favoritas que responden a la fórmula (I) o (II) se enumeran a continuación:



40



45



50



55



60



65



	Man(POEG ₄ MTzAcNPhe-S-Gal) ₄
	Man(POProTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
5	Man(POEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
	Man(POEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
10	Man(POEG ₄ MTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
	Man(POProTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
	Man(POEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
15	Man(POEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
	Man(POEG ₄ MTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
20	Man(PSProTzAcNPhe-O-Gal) ₄
	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄
	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄
25	Man(PSEG ₄ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄
	Man(PSProTzAcNPhe-S-Gal) ₄
30	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-S-Gal) ₄
	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-S-Gal) ₄
	Man(PSEG ₄ MTzAcNPhe-S-Gal) ₄
35	Man(PSProTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
40	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
	Man(PSEG ₄ MTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
	Man(PSProTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
45	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
50	Man(PSEG ₄ MTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
	(DMCH-POMTzAcNPhe-O-Gal) ₃
	(DMCH-POMTzAcNPhe-O-Gal) ₄
55	(DMCH-POMTzAcNPhe-O-Gal) ₅
	(DMCH-POMTzAcNPhe-S-Gal) ₃
	(DMCH-POMTzAcNPhe-S-Gal) ₄
60	(DMCH-POMTzAcNPhe-S-Gal) ₅
	(DMCH-POMTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₃
65	(DMCH-POMTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄

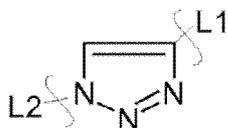
	(DMCH-POMTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₅
	(DMCH-POMTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₃
5	(DMCH-POMTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
	(DMCH-POMTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₅
10	(DMCH-PSMTzAcNPhe-O-Gal) ₃
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-O-Gal) ₄
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-O-Gal) ₅
15	(DMCH-PSMTzAcNPhe-S-Gal) ₃
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-S-Gal) ₄
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-S-Gal) ₅
20	(DMCH-PSMTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₃
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₄
25	(DMCH-PSMTzAcNPhe-CH ₂ -O-Gal) ₅
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₃
30	(DMCH-PSMTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₄
	(DMCH-PSMTzAcNPhe-CH ₂ -S-Gal) ₅
	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄
35	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄
	Man(EG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄
	Man(EG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄
40	Man(EG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄
	Man(EG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄
45	Man(PSEG ₃ MTzAcNPh-Gal) ₄
	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄
	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄
50	Man(PSEG ₃ MTzAcNPh-SGal) ₄
	Man(PSEG ₂ MTzAcNPh-Gal) ₄
55	Man(PSEG ₂ MTzAcNPh-SGal) ₄
	Man(EG ₂ MTzAcNPh-SGal) ₄
	Man(EG ₃ MTzAcNPh-SGal) ₄
60	Man(EG ₃ MTzproNCONapht-OGal) ₄
	Man(EG ₃ MTzproNCOBisphe-OGal) ₄
65	Man(PSEG ₃ MTzproNCOBisphe-OGal) ₄

- Man(PSEG₂MTzproNCOBisphe-OGal)₄
 Man(EG₂MTz AcNPh-Gal)₄
 5 Man(PSEG₃MTzproNCONapht-OGal)₄
 Man(EG₃MTz AcNPh-Gal)₄
 10 Man(PSEG₂MTzproNCONapht-OGal)₄
 Man(EG₂MTzproNCOBisphe-OGal)₄
 Man(EG₂MTzproNCONapht-OGal)₄
 15 (DMCH-POProTzAcNPhe-OGal)₄
 (DMCH-PSPProTzAcNPhe-OGal)₄
 (DMCH-PODMCHMTzAcNPhe-OGal)₄
 20 (DMCH-PSDMCHMTzAcNPhe-OGal)₄
 (DMCH-POProTzAcNPhe-SGal)₄
 25 (DMCH-PSPProTzAcNPhe-SGal)₄
 (DMCH-PODMCHMTzAcNPhe-SGal)₄
 (DMCH-PSDMCHMTzAcNPhe-SGal)₄
 30 (DMCH)-POProTzProNCOBisphe-OGal)₄
 (DMCH-PSPProTzProNCOBisphe-OGal)₄
 35 (DMCH-PODMCHMTzProNCOBisphe-OGal)₄
 (DMCH-PSDMCHMTzProNCOBisphe-OGal)₄
 (DMCH-POProTzProNCOBisphe-SGal)₄
 40 (DMCH-PSPProTzProNCOBisphe-SGal)₄
 (DMCH-PODMCHMTzProNCOBisphe-SGal)₄
 45 (DMCH-PSDMCHMTzProNCOBisphe-SGal)₄
 (DMCH-POProTzProNCONapht-Ogal)₄
 (DMCH-PSPProTzProNCONapht-Ogal)₄
 50 (DMCH-PODMCHMTzProNCONapht-Ogal)₄
 (DMCH-PSDMCHMTzProNCONapht-Ogal)₄
 55 (DMCH-POProTzProNCONapht-SGal)₄
 (DMCH-PSPProTzProNCONapht-SGal)₄
 (DMCH-PODMCHMTzProNCONapht-SGal)₄
 60 (DMCH-PSDMCHMTzProNCONapht-SGal)₄

[0059] En donde DMCH representa 1,4-dimetilciclohexilo, Man representa manosa, Glc representa glucosa; Pro representa 1,3-n-propilo, Hex representa 1,6-n-hexilo, THME representa tris-(hidroximetilo)etano; Tz representa triazol

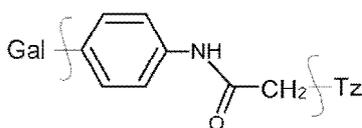
65

5



10
 15
 PN representa un enlace de fosforamidato
 PO representa un enlace fosfato
 PS representa el enlace de fosfortioato
 EG2 representa dietilenglicol,
 EG3 representa trietilenglicol
 EG4 representa tetraetilenglicol
 AcNPhe representa acetamidofenilo:

20



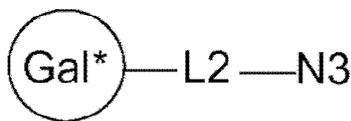
25
 30
 M representa metileno,
 -O-Gal representa galactopiranosilo,
 S-Gal representa 1-tiogalactopiranosilo
 -CH₂-O-Gal representa 1-metilengalactopiranosilo
 -CH₂-S-Gal representa 1-metilentiogalactopiranosilo
 -NAc-Gal representa 1-N-acetilgalactopiranosilo

[0060] Los glicoclústers lineales (DMCH) tienen enlaces de fosforamidato (PN), enlaces de fosfotriéster (PO) o enlaces de tionofosfotriéster (PS) y enlaces de hexosa (Man, Gal, Glc) tienen enlaces de fosfato (PO) o enlaces de tionofosfato (PS).

35 [0061] La preparación de estas moléculas se describe de manera detallada en la parte experimental aquí debajo.

40 [0062] La Figura 6 ilustra un esquema de preparación de moléculas que responden a la fórmula (I) en donde K es una estructura central representada por la fórmula (KI). Esquemáticamente, el núcleo K' funcionalizado con OH se injerta en un soporte sólido (⊗) en el paso 1). Sin embargo, este paso no es obligatorio y la síntesis se puede lograr en solución. A continuación, en el paso 2) HC≡C-enlazadores funcionalizados L1. Los grupos Pho se injertan en funciones de hidroxilo nacidas por K'. En La Figura 6 solo se ilustra un injerto por grupo Pho, pero se pueden operar uno o dos injertos en Pho. En el paso 3) se logra una reacción química de clic

45



50

55 [0063] Donde Gal* representa un residuo Gal con grupos protectores sobre funcionalidades OH. Los modos operativos detallados se ilustran en la Figura 1 y en la parte experimental. Alternativamente, podría usarse un residuo Gal sin grupo protector. El triazol Tz se forma a través de esta reacción con la siguiente sustitución:

60



[0064] La sustitución opuesta se puede obtener por inversión de residuos de N3 y alcino.

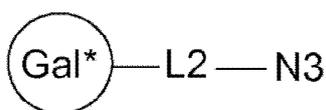
65 [0065] Se puede obtener un enlace tioéter en reemplazo de Tz de una manera conocida haciendo reaccionar un tiol

con un halógeno, notablemente con un bromo.

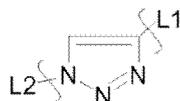
[0066] En el paso 5), los grupos protectores se eliminan de Gal si está presente y, cuando es necesario, se escinde la unión con el soporte sólido.

[0067] Las Figuras 7a y 7b ilustran un esquema de preparación de moléculas que responden a la fórmula (I) en la que K es una estructura de peine representada por la fórmula (KII).

[0068] En La Figura 7a, de forma esquemática, el fragmento H-fosfonato K" se hace reaccionar con el grupo final E en un soporte sólido  en el paso 1). A continuación, en el paso 2) el grupo de protección R (dimetoxitritilo) de K" se elimina. En el paso 3) un segundo fragmento de H-fosfonato K" se hace reaccionar y en el paso se retira 4) el grupo R. Los pasos 3) y 4) se repiten para obtener el valor deseado (m). En el paso 5) el HC≡C-enlazador funcionalizado L1 se injerta en los grupos de Pho, y el fosfato se transforma en un fosforamidato. En el paso 6) una reacción química modular se consigue con



[0069] Endonde Gal* representa un residuo de Gal con grupos protectores sobre las funcionalidades OH. Alternativamente, un residuo de Gal sin grupo protector podría ser utilizado. El triazol Tz se forma a través de esta reacción con la siguiente sustitución:

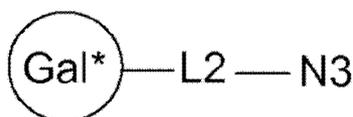


[0070] La sustitución opuesta puede obtenerse por inversión de N3 y residuos de alquino.

[0071] Alternativamente, un enlace de éter tio se puede obtener en sustitución de Tz de una manera conocida por reacción de un tiol con un halógeno, en particular con un bromo.

[0072] En el paso 7), los grupos protectores se eliminan de Gal si está presente y el enlace al soporte sólido se hidroliza.

[0073] Según una variante, la síntesis se puede lograr en un soporte sólido usando fosforamidita funcionalizada por K" alquino-L1 como se describe en la Figura 7b. En el paso 1) un derivado de K" alquino se hace reaccionar con el soporte sólido de grupo terminal y oxidado a un fosfatotriester o un tionofosfatotriester. En el paso 2) el grupo protector R se elimina y en el paso 3) un segundo derivado de K" alquino se añade y se oxida, después de la eliminación de R en el paso 4), los pasos 3) y 4) se repiten para obtener el valor deseado (m). En el paso 5) una reacción química modular se consigue con



[0074] En donde Gal* representa un residuo de Gal con grupos protectores sobre las funcionalidades OH. Alternativamente, podría ser utilizado un residuo de Gal sin grupo protector. El Tz de triazol se forma a través de esta reacción con la siguiente sustitución:



[0075] La sustitución opuesta puede obtenerse por inversión de N3 y residuos de alquino. En este caso una

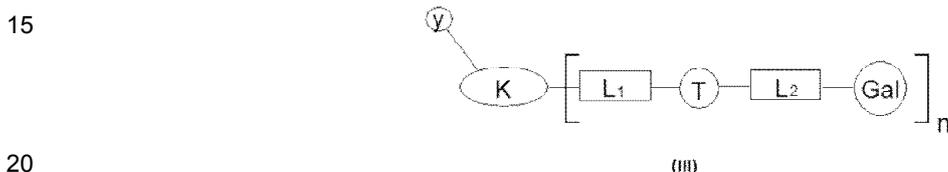
fosforamidita de bromo o una fosforamidita de tosilo se prepara primero y luego se convierte en una fosforamidita de azido por sustitución por un reactivo de azida.

5 [0076] Alternativamente, un enlace de éter tio se puede obtener en sustitución de Tz de una manera conocida por reacción de un tiol con un halógeno, en particular con un bromo.

[0077] En el paso 6), los grupos protectores se eliminan de Gal (si existe) y el enlace al soporte sólido se hidroliza.

10 [0078] Según una variante preferida, la síntesis se consigue en un soporte sólido mediante injerto previo del primer grupo K" de la cadena sobre un soporte sólido.

[0079] La divulgación también proporciona moléculas que responden a la fórmula (II):



Donde

25 K, n, Gal, T, L1, L2 tienen el mismo significado que anteriormente y en donde y representa un marcador. Un marcador puede ser por ejemplo una secuencia de ADN o un colorante fluorescente.

[0080] Tal molécula se puede utilizar para propósitos de prueba, en particular para fines de diagnóstico.

30 [0081] Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la fórmula general (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0082] Tal excipiente es bien conocido por el profesional experto y se adapta, entre otros parámetros, de acuerdo con el modo de administración.

35 [0083] Dichas composiciones farmacéuticas se formulan ventajosamente para administrarse por vías oral, tópica, transdérmica, sublingual, rectal, parenteral incluyendo vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea, con dosis individuales adecuadas para el paciente a tratar. Preferiblemente, el fármaco se administra por la forma respiratoria o pulmonar.

40 [0084] Estos compuestos (I) o (II), y composiciones farmacéuticas que los comprenden, están formulados para ser inhalados o infundidos en el tracto respiratorio para tratar o prevenir infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en particular en pacientes con fibrosis quística, o pacientes bajo asistencia respiratoria, que a menudo son víctimas de infecciones nosocomiales.

45 [0085] Alternativamente, los compuestos (I) o (II) y las composiciones farmacéuticas que los comprenden se pueden utilizar por vía tópica, en o debajo de un apósito o un vendaje para prevenir o tratar infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, en particular para quemaduras o úlceras de decúbito.

50 [0086] Las composiciones según la invención pueden ser sólidos, líquidos incluyendo soluciones, emulsiones o suspensiones, o en forma de un gel/crema y presentarse en formas farmacéuticas corrientemente utilizadas en medicina humana, como por ejemplo, soluciones, emulsiones, comprimidos simples o recubiertos de azúcar, cápsulas de gelatina, gránulos, supositorios, preparaciones inyectables, pomadas, cremas, geles; que se preparan según los métodos usuales. Los ingredientes activos se pueden incorporar utilizando excipientes que se utilizan habitualmente en estas composiciones farmacéuticas, tales como talco, goma árabe, lactosa, almidón, estearato de magnesio, vehículos acuosos o no acuosos, cuerpos grasos de origen animal o vegetal, derivados de parafina, glicoles, diversos agentes humectantes, dispersantes o emulsionantes, conservantes.

60 [0087] La dosis diaria total de los compuestos para uso de acuerdo con esta invención, administrada en dosis únicas o divididas, puede estar en cantidades de, por ejemplo, de 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día.

65 [0088] El nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores, incluyendo el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, la duración y la vía de administración, los niveles de absorción intestinal y la reabsorción y de excreción, la combinación con otros medicamentos y la gravedad de la afección particular a tratar.

[0089] Los compuestos (I) o (II), y composiciones farmacéuticas que los comprenden, son útiles como agentes antibacterianos para la prevención, el retraso, la atenuación y el tratamiento terapéutico de infecciones debidas a patógenos microbianos, en particular infecciones por patógenos que utilizan lectinas en los primeros pasos de la infección, y más particularmente infecciones por una bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

[0090] La descripción se dirige a un compuesto de fórmula (I) o (II) o una composición farmacéutica que lo comprende, para su uso para la prevención, el retraso, la atenuación y/o la inhibición de la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

[0091] Más específicamente, la invención está dirigida a un compuesto de fórmula (I) o (II) o una composición farmacéutica que lo comprende, para su uso para la prevención, el retraso, la atenuación y/o la inhibición de la formación de una biopelícula producida por una bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

[0092] La invención se dirige además a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la fórmula general (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipiente y al menos uno o más otros agentes antibacterianos o con uno o más de otros agentes de antivirulencia o con uno o más fármacos de refuerzo de la inmunidad innata de huesped.

[0093] Más específicamente, la invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de la fórmula general (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o excipiente y al menos un antibiótico.

[0094] Otro objeto de la invención es el uso de los compuestos (I) en la prevención de retardo, atenuación y el tratamiento de infecciones bacterianas en animales humanos o, en asociación con uno o más fármacos y más específicamente con uno o más agentes antibacterianos o con uno o más agentes de antivirulencia o con uno o más fármacos de refuerzo de la inmunidad innata de huesped.

[0095] Una composición que comprende al menos un compuesto de la fórmula general (I) o (II) se puede utilizar para el material capaz de capturar *Pseudomonas aeruginosa*.

EXPERIMENTAL

Nomenclatura:

[0096] La nomenclatura utilizada para los glicoclústers ilustrados en la parte experimental: Cada glicocluster está constituido por un andamio (K), un primer enlazador (L1) un grupo de conexión (T), un segundo enlazador (L2) y un derivado de galactosa (Gal): K-(L1-T-L2-Gal)_n.

[0097] Los andamios utilizados son DMCH (dimetilciclohexano), Man(manosa), Gal(galactosa), Glc(glucosa) o dT (timidina);

PN representa un enlace de fosoramidato

PO representa enlace de fosfato

PS representa enlace de fosforotioato

L1: Pro (1,3-n-propilo), Hex (1,6-hexilo), EG2M (metileno de dietilenglicol), EG3M (metileno de trietilenglicol), EG4M (metileno de tetraetilenglicol), THME tris-(hidroximetilo)etano ;

T: triazol Tz;

L2: Pro (1,3-n-propilo), EG2 (dietilenglicol), EG3 (trietilenglicol), DMCH (1,4-Dimetilciclohexano), AcNPhe (acetamidafenilo), M (metileno), pero (N3-butilo-timina).

-O-Gal representa galactopiranosilo

-S-Gal representa 1-tiogalactopiranosilo

-CH₂-O-Gal representa 1-metilenegalactopiranosilo

-CH₂-S-Gal representa 1-metilenetiogalactopiranosilo

-NAc-Gal representa 1-N-acetilgalactopiranosilo

Glicoclústers lineales (DMCH) tienen fosoramidato (PN), fosfotriéster (PO) o enlaces de tionofosfotriéster (PS) y unos centrados por hexosa (Man, Gal, Glc) tienen enlaces de fosfato (PO) o enlaces de tionofosfato (PS).

I- Experimental - procedimientos generales:

[0098] Las síntesis de fosoramiditas 1 (Meyer, A. et al., (2010) J. Org. Chem. 75, 6689-6692), 2 (Lietard, J. et al., (2008) J. Org. Chem. 73, 191-200; Lietard, J. et al, Meyer, A., Vasseur, J. J., y Morvan, F. (2007) Tetrahedron Lett 48, 8795-8798), **1a** y **1d** (Gerland, B. et al., (2012) Bioconjugate Chem. 23, 1534-1547) y **1e** (Ligeour, C. et al., (2012) Eur. J. Org. Chem., 1851-1856) y soporte sólido azida **5** (pourceau, G. et al., (2009) J. Org. Chem. 74, 6837-6842) fueron reportados previamente. Derivados de carbohidratos **3** (Hasegawa, T. et al., (2007) Org. Biomol. Chem. 5 (15), 2404-2412), **4a** (Joosten, JAF et al., (2004) J. Med. Chem. 47, 6499-6508), **4b** (Szurmai, Z. et al., (1989) Acta Chimica Hungarica-Models in Chemistry 126, 259-269), **4c**, (pourceau, G. et al., (2009) J. Org. Chem. 74, 1218-1222), **4d** (Cecioni, S. et al., (2012) Chem. Eur. J. 18, 6250-6263), **4e** (Szurmai, Z. et al., (1989)), **6** (Hasegawa, T.,

et al. (2007)), 1-propagilo-O-galactopiranosilo y -glucopiranosilo (Mereyala, H.B., y Gurralla, S.R. (1998) Carbohydr. Res. 307, 351-354) se prepararon según la literatura.

5 **[0099] 3,6,9,12-Tetraoxa-pentadecan-14-in-1-ilo 2-cianoetilo *N,N*-diisopropilo fosforamidita 1c:** 2-Cianoetilo-*N,N*-diisopropilclorofosforamidita (720 mg, 3,0 mmol) se añadió a una solución de 3,6,9,12-tetraoxa-pentadecan-14-in-1-ol (600 mg, 2,6 mmol), tamices moleculares de 3Å y *N,N*-diisopropiletilamina (DIEA) (1,3 mL, 7,4 mmol) en diclorometano anhidro (40 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, se añadieron 2 ml de H₂O y luego se evaporó la solución. El residuo seco se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (80% de EtOAc en ciclohexano que contenía 3% de trietilamina) para dar el compuesto del título **1c** (901 mg, 81%)
10 como un aceite claro. *Rf*: 0,9 (EtOAc). ¹H RMN ¹³C RMN ³¹P RMN y HR-ESI-QToF MS están en conformidad con la estructura.

(2',3',4',6'-Tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilo)-timina 20:

15 **[0100]** Se añadió *N,O*-bis(trimetilsililo) acetamida (BSA) (1,5 mL, 6,1 mmol) a una suspensión de la timina (327 mg, 2,6 mmol) y galactosa penta-O-acetato (1,09 g, 2,56 mmol) en dicloroetano (25 mL). La mezcla se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 20 min. Después de la adición de TMSOTf (2,2 mL, 12,1 mmol) la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 2h30. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y los disolventes se evaporaron en vacío para dar un aceite, que se diluyó en acetato de etilo (100 mL) y se lavó con una
20 solución acuosa saturada de NaHCO₃ (100 mL) y salmuera (2 x 100 mL). Después de secarse con Na₂SO₄, se filtró y se concentró, el aceite resultante se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (EtOAc/ciclohexano, 8: 2, v/v) para proporcionar el compuesto deseado **20** (782 mg, 67%) como una espuma blanca. ¹H RMN ¹³C RMN y HR-ESI-QToF MS están en conformidad con la estructura.

25 **1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilo)-3-(4-bromobutilo)-timina 21:**

[0101] Una solución de (2',3',4',6'-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilo)-timina **20** (350 mg, 0,77 mmol) en dimetilformamida anhidra (4 mL) se agitó durante 5 minutos con carbonato potásico (318 mg, 2,30 mmol). Después, se añadió 1,4-dibromobutano (919 mL, 7,7 0 mmol) y la mezcla se hirvió a reflujo durante 4 h y a 70°C durante la
30 noche. Después se concentró la mezcla de reacción para dar un aceite, que se diluyó en diclorometano (20 mL) y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (20 mL) y salmuera (2 x 20 mL). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (EtOAc/ciclohexano, 4: 6) para proporcionar el compuesto deseado **21** (270 mg, 59%) como una espuma de color amarillo pálido. ¹H RMN ¹³C RMN y HR-ESI-MS QToF se ajustan a la estructura.

35 **1-(2',3',4',6'-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilo)-3-(4-azidobutilo)timina 4f:**

[0102] Una solución de **21** (231 mg, 0,39 mmol) en dimetilformamida anhidra (3 mL) se agitó a 100°C durante 24 h con azida de sodio (203 mg, 3,12 mmol). Después de la adición de diclorometano (10 mL), la reacción se lavó con
40 salmuera (3 x 20 mL). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para proporcionar el producto deseado (214 mg, 99%) como un aceite incoloro. ¹H RMN ¹³C RMN y HR-ESI-MS QToF se ajustan a la estructura.

[0103] La inmovilización en soporte sólido de azida 5 de hexosas de 1-O-propargilo por Cu(I) azida de alquino catalizada de cicloadición 1,3-dipolar. Una solución acuosa de hexosa de 1-O-propargilo (α-manosa **6**, β-galactosa, β-glucosa) (100 mM, 175 μL), las soluciones acuosas recién preparadas de CuSO₄ (100 mM, 14 μL) y ascorbato de sodio (500 mM, 14 μL), agua (147 μL) y MeOH (350 μL) se añadieron a 3,5 mmol de soporte sólido de azida **5**. La mezcla resultante se trató en un tubo sellado con un sintetizador de microondas a 60°C durante 45 min (tiempo de premezcla: 30 s). La temperatura se controló con una sonda interna de infrarrojos. La solución se retiró, y los granos de CPG se lavaron con H₂O (3 X 2 mL), MeOH (3 X 2 mL) y CH₃CN (3 x 2 mL), y se secó proporcionando
50 hexosa en un soporte sólido.

[0104] Procedimiento general para la introducción de fosforamiditas de alquinilo o bromohexilo de hidroxilos de hexosa. Derivados de hexosa en un soporte sólido (escala de 1 μmol) se trataron por la química de la fosforamidita, en un sintetizador de ADN, con fosforamiditas de alquinilo o fosforamidita de 6-bromohexilo **2**. Sólo pasos de
55 acoplamiento y oxidación se llevaron a cabo. Para la etapa de acoplamiento, bencilmercaptotetrazol se utilizó como activador (0,3 M en CH₃CN anhidro) y fosforamidita **1**, **2** ó **1a-e** (0,2 M en CH₃CN anhidro), se introdujo tres veces (120 μmol) con un tiempo de acoplamiento de 180 s. La oxidación se llevó a cabo con una solución comercial de yoduro (0,1 M I₂, THF/piridina/agua 90: 5: 5) durante 15 s.

60 **[0105] Procedimiento general para azidación.** Los oligonucleótidos sobre soporte sólido que llevan las hexosas de tetrabromohexilo (1 μmol) se trataron con una solución de TMG-N₃ (31,6 mg, 200 equiv) y NaI (30 mg, 200 equiv) en DMF (1 mL) durante 1 h a 65°C. Las perlas se lavaron con DMF (3 X 2 mL), H₂O (3 X 2 mL) y CH₃CN (3 X 2 mL) y después se secaron mediante el lavado con argón.

65 **[0106] Procedimiento general para la elongación de secuencias de ADN y etiquetado con Cy3.** Las secuencias de ADN se sintetizaron en los andamios sobre soporte sólido en la escala de 1 μmol en un sintetizador de ADN (ABI

394) por la química de fosforamidita estándar. Para la etapa de acoplamiento, bencilmercaptotetrazol se utilizó como activador (0,3 M en CH₃CN anhidro), fosforamiditos de nucleósidos disponibles comercialmente (0,09 M en CH₃CN anhidro) se introdujeron con un tiempo de acoplamiento de 20 s y amidita Cy3 (0,06 M en CH₃CN anhidro) con un tiempo de acoplamiento de 180 s. El paso de protección terminal se llevó a cabo con anhídrido acético usando solución comercial (Tapa A: Ac₂O/piridina/THF, 10:10:80 y Tapa B: 10% de N-metilimidazol en THF) durante 15 s. Cada oxidación se realizó durante 15 s. La destitilación se realizó con 2,5% DCA en CH₂Cl₂ durante 35 s.

[0107] Procedimiento general para la desprotección de los oligonucleótidos en un soporte sólido. Las perlas de CPG que llevan oligonucleótidos modificados se transfirieron a un vial de tapón de rosca de 4 ml y se trataron con 2 ml de amoniaco acuoso concentrado durante 15 h a temperatura ambiente y se calentó a 55°C durante 2 h. Para cada compuesto, los sobrenadantes se retiraron y se evaporaron a sequedad. Los residuos se disolvieron en agua.

Procedimiento general para la elongación por química de hidrógenofosfonato

[0108] El alargamiento se realizó en un sintetizador de ADN (ABI 394) utilizando un ciclo de la química del H-fosfonato a partir de un soporte sólido de 1,3-propanodiol (1 μmol). La etapa de destitilación se realizó con 2,5% DCA en CH₂Cl₂ durante 35 s. Entonces DiMetanolCicloHexano (DMCH) monoéster de H-fosfonato **9** (Bouillon et al (2006), J. Org Chem 71, 4700-4702) o timidina monoéster de H-fosfonato disponible comercialmente (60 mM en CH₃CN/C₅H₅N anhidro 1: 1 v/v) y cloruro de pivaloilo como activador (200 mM en anhidro CH₃CN/C₅H₅N 1: 1 v/v) se pasaron 6 veces a través de la columna alternativamente durante 5 s, (exceso 30 molar). El ciclo se repitió como se requiere para proporcionar los andamios deseados con 2 a 5 motivos DMCH o 4 motivos dT.

Procedimiento general para la oxidación amidativa

[0109] Los diésteres andamios H-fosfonato-soporte sólido (1 μmol) se trataron de ida y vuelta utilizando dos jeringas, con 2 mL de una solución de 10% de propargilamina en CCl₄/C₅H₅N (1: 1 v/v) durante 30 min. Las perlas de CPG se lavaron con C₅H₅N (2 X 2 mL) y CH₃CN (3 X 2 mL) y después se secaron mediante el lavado con argón. A continuación, el alargamiento de los oligonucleótidos y etiquetado con Cy3 se realizó mediante la química de la fosforamidita como se describe anteriormente.

Procedimiento general para la reacción de CuAAC

[0110] Procedimiento para la introducción de derivados de D-galactosa de azida 4a-f: A una solución de oligonucleótido 5'-fluorescente-3'-alquino (100 nmol en 100 ml de H₂O) se añadieron galcosas de azida **4a-f** (3 equiv. por función de alquino, 100 mM en MeOH), 1 mg de nanopolvos de Cu(0), tampón de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,7 (25 μL), agua y MeOH para obtener un volumen final de 250 μL (agua MeOH, 1: 1, v/v). El tubo que contiene la preparación resultante se selló y se colocó en un iniciador de sintetizador de microondas de Biotage con un tiempo de premezcla de 30 s a 60°C durante 60 min.

[0111] Procedimiento para la introducción de 1-O-propargilo-D-galactosa 3: A una solución de oligonucleótido de tetra azidohexilo centrado por 5'-fluorescente-3'-hexosa (100 nmol en 100 μL de H₂O) se añadieron 1-O-propargilo 2,3,4-tri-O-acetilo-D-Galactosa **3** (5 equiv. por función de azida, 100 mM en MeOH), 1 mg de nanopolvos de Cu(0), tampón de acetato de trietilamonio 0,1 M, pH 7,7 (25 mL), agua y MeOH para obtener un volumen final de 250 μL (agua MeOH, 1: 1, v/v). El tubo que contiene la preparación resultante se selló y se colocó en un baño de aceite con agitación magnética a 60°C durante 60 min.

[0112] 1-(4-nitro-bencilo)-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido **8**: Bajo atmósfera de nitrógeno, a eterato de trifluoruro de boro de dietilo a 0°C (1,5 mL, 12 mmol) se añadió gota a gota en una solución de pentaacetato de β-D-galactosa (1,561 g, 4 mmol) y alcohol p-nitrobencilo (1,225 g, 8 mmol) en 20 ml de CH₂Cl₂. Después de unos minutos, la mezcla se calentó a reflujo y se mantuvo en agitación durante 7 h. Después, la reacción se inactivó con agua y se extrajo con CH₂Cl₂. Se recogió la capa de CH₂Cl₂, se secó con Na₂SO₄, y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0 a 15% AcOEt en ciclohexano) para dar el producto como un sólido blanco (1,148 g, 59%). R_f = 0,36 (AcOEt/ciclohexano, 1: 1, v/v). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,21 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-10, H-12), 7,47 (d, J = 8,9 Hz, 2H, H-9, H-13), 5,42 (dd, J = 3,4 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 5,32 (dd, J = 10,5 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 5,04 (dd, J = 10,5 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 5,02-4,72 (2xd, J = 13,2 Hz, 2H, H-7), 4,60 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1), 4,21 (dd, J = 11,2 y 6,5 Hz, 1H, H-6), 4,15 (dd, J = 11,2 y 6,5 Hz, 1H, H-6), 3,94 (dt, J = 0,8 y 6,5 Hz, 1H, H-5), 2,17 (s, 3H, CH₃CO), 2,06 (s, 6H, 2xCH₃CO), 1,99 (s, 3H, CH₃CO). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,3, 170,2, 169,5 (4 x CO-Ac), 147,7 (C-11), 144,6 (C-8), 127,7 (C-9), 123,8 (C-10), 100,8 (C-1), 71,1 (C-5), 70,9 (C-3), 69,6 (C-7), 68,9 (C-2), 67,1 (C-4), 61,4 (C-6), 20,9, 20,8, 20,8, 20,7 (4 x CH₃-Ac). HRMS (ESI +): Calculado para C₂₁H₂₅NO₁₂Na [M + Na]⁺506,1274, encontrado 506,1282. [α]_D20 = - 19,1° (c 0,9, MeOH).

[0113] Procedimiento general para la hidrógenoólisis (Método A). Compuesto **8** o **91**, **2** o **103**, **4** se disolvió en CH₂Cl₂ destilada a la que se añadió 10% de paladio sobre carbón (10% p/p). Se burbujeó gas de hidrógeno en la mezcla de reacción hasta desaparecer los materiales de partida a juzgar por TLC. La mezcla de reacción se filtró sobre una almohadilla de celite y se lavó con CH₂Cl₂. Los productos brutos se purificaron por cromatografía en

columna ultrarrápida en gel de sílice para proporcionar el producto deseado.

[0114] Procedimiento general para la síntesis de 4-bromoacetamido-arilo-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido (Método B). Una solución de 11 o 12 (1 eq.) en CH₂Cl₂ destilada se lavó abundantemente con argón, se enfrió a 0° C, y se añadió Et₃N (1,4 eq.). Se añadió bromuro de bromoacetilo (1,3 eq.) Gota a gota y la mezcla se agitó durante 1 h a 0°C. La mezcla se dejó calentar hasta temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla en bruto en CH₂Cl₂ se lavó con HCl 1 N (2 x 25 mL), agua (2 x 25 mL) y salmuera (25 mL). Después del secado (Na₂SO₄), la concentración y la eliminación total de CH₂Cl₂ bajo vacío, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para proporcionar el producto deseado.

[0115] Procedimiento general para la síntesis de 4-azidoacetamido-arilo-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido (Método C). Una solución de 14 o 15 o 16 (1 eq.) y TMGN3 (3 eq.) en CH₃CN anhidro se agitó a 80°C durante 15 minutos bajo la asistencia de microondas. Después de la concentración a vacío, el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice para proporcionar el producto deseado.

[0116] Procedimiento general para la desacetilación de hidratos de carbono (método D). El glicósido acetilado (4-(azidoacetamida)fenilo-β-D-galactósido, 5 17-19, y 28-29) se suspendió en MeOH o solución de 1,4 dioxano y amoniaco en 30% se añadió (1: 1, v/v). La mezcla se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 6 horas a 1 día. El disolvente se evaporó bajo vacío para proporcionar el producto deseado.

[0117] Procedimiento general para la glicosidación (Método E). A una solución de 7 (1 eq.), 22 o 23 (2 eq.), y tetrabutylamoniohidrógenosulfato (1 eq.) en CH₂Cl₂ a 0°C se añadió una solución 1 M. ac. de NaOH. La mezcla bifásica se agitó a ta durante 36 h, después se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con NaOH 1 M (2 x 30 mL) y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para proporcionar el producto deseado.

[0118] Procedimiento general para la azidación de biarilgalactopiranosidos (Método F.): 26 o 27 (1 eq) se disolvió en DMF anhidro, seguido de la adición de 1-etilo-3-(3'-dimetilaminopropilo)carbodiimida (1,6 eq.) y hidroxibenzotriazol (1,1 eq.). Se añadió 3-Azidopropilamina (2 eq.) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se concentró, después se inactivó con agua y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó con sulfato sódico, se concentró y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para proporcionar el producto deseado.

[0119] 1-(4-Amino-bencilo)-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido 11. Obtenido como un sólido blanco (412 mg, 45%) siguiendo el Método A: 8 (968 mg, 2,00 mmol), Pd/C 10% (96,8 mg), en CH₂Cl₂ destilada (30 mL). La mezcla se trató, la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y el producto crudo se purificó en gel de sílice (0 a 5% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar el producto puro. R_f = 0,43 (AcOEt/ciclohexano, 6: 4, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,02 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H-10, H-12), 6,60 (d, J = 8,1, 2H, H-9, H-13), 5,32 (d, J = 3,3 Hz, 1H, H-4), 5,18 (dd, J = 10,4 y 8,3 Hz, 1H, H-2), 4,91 (dd, J = 10,4, 3,3, 1H, H-3), 4,71-4,46 (2xd, J = 11,9, 2H, H-7), 4,42 (d, J = 7,9, 2H, H-1), 4,15 (d d, J = 11,2 y 6,5 Hz, 1H, H-6), 4,10 (dd, J = 11,2 y 6,5 Hz, 1H, H-6), 3,81 (t, J = 6,5, 1H, H-5), 2,09 (s, 3H, CH₃CO), 2,01 (s, 3H, CH₃CO), 1,94 (s, 3H, CH₃CO), 1,91 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,4, 170,2, 169,5 (4 CO Ac), 146,6 (C-11), 129,8 (C-8), 126,3 (C-9), 115,0 (C-10), 99,2 (C-1), 71,1 (C-5), 70,8 (C-3), 70,7 (C-7), 69,0 (C-2), 67,3 (C-4), 61,5 (C-6), 20,8, 20,8, 20,7, 20,6 (4 CH₃CO). HRMS (ESI +): Calculado para C₂₁H₂₈NO₁₀ [M + H] 454,1713, encontrado 454,1718. [α]_D20 = - 25,0° (c 0,4, MeOH).

[0120] 4-Amino-bencilo-1-tio-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido 12. Obtenido como un aceite incoloro (314 mg, 79%) siguiendo el Método A: 9 (425 mg, 0,851 mmol), Pd/C 10% (42,5 mg), en CH₂Cl₂ destilada (15 mL). La mezcla se trató, la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 5% de MeOH en CH₂Cl₂) para proporcionar el producto puro. R_f = 0,26 (AcOEt/ciclohexano, 6: 4, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,08 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H-9, H-13), 6,63 (d, J = 8,1 Hz, 2H, H-10, H-12), 5,40 (d, J = 3,3 Hz, 1H, H-4), 5,26 (t, J = 9,9 Hz, 1H, H-2), 4,96 (dd, J = 9,9 y 3,3 Hz, 1H, H-3), 4,27 (d, J = 9,9 Hz, 1H, H-1), 4,17 (dd, J = 11,3 y 6,6 Hz, 1H, H-6), 4,11 (dd, J = 11,3 y 6,6 Hz, 1H, H-6), 3,86 (d, J = 12,9 Hz, 1H, H-7), 3,81 (t, J = 6,6 Hz, 1H, H-5), 3,75 (d, J = 12,9 Hz, 1H, H-7), 2,14 (s, 3H, CH₃CO), 2,06 (s, 3H, CH₃CO), 2,01 (s, 3H, CH₃CO), 1,96 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,4, 170,2, 169,7 (4 CO Ac), 145,8 (C-11), 130,3 (C-9), 126,5 (C-8), 115,3 (C-10), 82,5 (C-1), 74,5 (C-5), 72,0 (C-3), 67,5 (C-4), 67,3 (C-2), 61,8 (C-6), 33,7 (7), 20,9, 20,8, 20,8, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI +): Calculado para C₂₁H₂₈NO₉S [M + H]⁺ 470,1485, encontrado 470,1489. [α]_D20 = -73,8° (c 1,0, MeOH).

[0121] 4-Bromoacetamidobencilo-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido 14. Obtenido como un aceite amarillo pálido (238 mg, 79%) siguiendo el Método B: 11 (239 mg, 0,527mmol), Et₃N (0,103 mL, 0,738 mmol), bromuro de bromoacetilo (0,059 mL, 0,685 mmol) en CH₂Cl₂ destilada (30 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 60% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,31 (AcOEt/ciclohexano, 6: 4, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,23 (s, 1H, H-14), 7,51 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-10, H-12), 7,26 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-9, H-13), 5,37 (dd, J = 3,4 y 0,9 Hz, 1H, H-4), 5,25 (dd, J = 10,4 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 4,97 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 4,85 - 4,59 (2xd, J = 12,2 Hz, 2H, H-7), 4,50 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1), 4,19 (dd, J = 11,2 y 6,5 Hz, 1H, H-6), 4,13 (dd, J = 11,2 y 6,5 Hz, 1H, H-6), 3,99 (s, 2H, H-16), 3,88 (dt, J = 0,9 y 6,5 Hz, 1H, H-

5), 2,13 (s, 3H, CH₃CO), 2,04 (s, 3H, CH₃CO), 2,00 (s, 3H, CH₃CO), 1,96 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,6, 170,4, 170,3, 169,6 (4 x CO-Ac), 163,8 (C-15), 137,0 (C-11), 133,7 (C-8), 128,7 (C-9), 120,2 (C-10), 100,0 (C-1), 71,1 (C- C-3), 71,0 (C- 5), 70,4 (C-7), 69,0 (C-2), 67,3 (4), 61,5 (C-6), 29,6 (C-16), 20,9, 20,8, 20,8, 20,7 (4 x CH₃-Ac). HRMS (ESI +): Calculado para C₂₃H₂₉BrNO₁₁ [M + H]⁺+574,0924, encontrado 574,0933. [α]_D20 = -13,1° (c 2,6, MeOH).

[0122] 4-Bromoacetamidobencilo-1-tio-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido 15: Se obtuvo como un aceite amarillo (367 mg, 93%) siguiendo el método B: 12 (314 mg, 0,669 mmol), Et₃N (0,130 mL, 0,937 mmol), bromuro de bromoacetilo (0,075 mL, 0,869 mmol) en CH₂Cl₂ destilada (10 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 40% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,28 (AcOEt/ciclohexano, 1: 1, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,23 (s, 1H, H-14), 7,47 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-10, H-12), 7,26 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-9, H-13), 5,37 (dd, J = 3,3 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 5,23 (t, J = 10,0 Hz, 1H, H-2), 4,94 (dd, J = 10,0 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 4,25 (d, J = 10,0 Hz, 1H, H-1), 4,12 (dd, J = 11,4 y 6,7 Hz, 1H, H-6), 4,05 (dd, J = 11,4 y 6,4 Hz, 1H, H-6), 3,98 (s, 2H, H-16), 3,90, 3,81 (2 xd, J = 13,0 Hz, cada 1H, H-7), 3,78 (m, 1H, H-5), 2,12 (s, 3H, CH₃CO), 2,03 (s, 3H, CH₃CO), 1,99 (s, 3H, CH₃CO), 1,93 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,6, 170,4, 170,2, 169,8 (4 CO Ac), 163,74 (C-15), 136,4 (C-11), 133,9 (C-8), 130,0 (C-9), 120,3 (C-10), 82,6 (C-1), 74,6 (C-5), 72,0 (C-3), 67,5 (C-4), 67,3 (C-2), 61,7 (C-6), 33,4 (C-7), 29,6 (C-16), 20,9, 20,8, 20,8, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): calculado para C₂₃H₂₉NO₁₀BrS [M + H]⁺ 590,0696, encontrado 590,0688. [α]_D20 = -56,7° (c 2,0, MeOH).

[0123] 4-Bromoacetamidofenilo-1-tio-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido 16: Una solución de 10 (497 mg, 1,02 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (20 mL) se desgasificó y después se añadió Pd/C 10% (49,7 mg). La solución se sometió a una atmósfera de hidrógeno y se agitó a ta durante 3 días. Después de la desaparición total de material de partida, la mezcla de 13 se lavó abundantemente con argón, se enfrió a 0°C, y se añadió Et₃N (0,043 mL, 0,308 mmol). Se añadió bromuro de bromoacetilo (0,025 mL, 0,286 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó durante 1 h a 0°C. La mezcla se dejó calentar a ta durante 1 h, después se filtró a través de un tapón de celite y se lavó con CH₂Cl₂. La mezcla en bruto en CH₂Cl₂ se lavó con HCl 1 N (2 X 25 mL), agua (2 X 25 mL) y salmuera (25 mL). Después del secado (Na₂SO₄), la concentración y la eliminación total de CH₂Cl₂ con vacío, el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0 a 30% AcOEt en ciclohexano) para dar el producto como un aceite amarillo (505,6 mg, 86% total). R_f = 0,33 (AcOEt/ciclohexano, 6: 4, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,15 (s, 1H, H-13), 7,52 (m, 2H, H-9, H-11), 7,51 (m, 2H, H-8, H-12), 5,40 (dd, J = 3,3 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 5,19 (t, J = 9,9 Hz, 1H, H-2), 5,04 (dd, J = 9,9 y 3,3 Hz, 1H, H-3), 4,65 (d, J = 9,9 Hz, 1H, H-1), 4,17 (dd, J = 11,4 y 6,9 Hz, 1H, H-6), 4,11 (dd, J = 11,4 y 6,9 Hz, 1H, H-6), 4,01 (s, 2H, H-15), 3,91 (dt, J = 0,8 y 6,9 Hz 1H, H-5), 2,11 (s, 3H, CH₃CO), 2,09 (s, 3H, CH₃CO), 2,05 (s, 3H, CH₃CO), 1,96 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,3, 170,2, 169,5 (4 CO Ac), 163,5 (C-14), 137,4 (C-10), 134,3 (C-8), 128,2 (C-7), 120,3 (C-9), 86,7 (C-1), 74,7 (C-5), 72,1 (C-3), 67,4 (C-4), 61,7 (C-6), 29,5 (C-15), 21,0, 20,8, 20,8, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): Calculado para C₂₂H₂₆NO₁₀NaSBr [M + Na]⁺ 598,0358, encontrado 598,0360. [α]_D20 = -13,0° (c 2,2, MeOH).

[0124] 4-Azidoacetamidobencilo-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-beta-D-galactopiranosido 17. Obtenido como un sólido blanco (148 mg, 94%) siguiendo el Método C: 14 (168 mg, 0,292 mmol), TMGN₃ (138,6 mg, 0,876 mmol) en CH₃CN anhidro (4 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 40% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,28 (AcOEt/ciclohexano, 1: 1, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,05 (s, 1H, H-14), 7,50 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-10, H-12), 7,24 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-9, H-13), 5,35 (d, J = 3,4 Hz, 1H, H-4), 5,23 (dd, J = 10,4 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 4,95 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 4,83 (d, J = 12,2 Hz, 1H, H-7), 4,57 (d, J = 12,2 Hz, 1H, H-7), 4,48 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1), 4,17 (dd, J = 11,2 y 6,4 Hz, 1H, H-6), 4,13 (dd, J = 11,2 y 6,4 Hz, 1H, H-6), 4,10 (s, 2H, H-16), 3,85 (t, J = 6,4 Hz, 1H, H-5), 2,12 (s, 3H, CH₃CO), 2,03 (s, 3H, CH₃CO), 1,98 (s, 3H, CH₃CO), 1,94 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,4, 170,3, 170,1, 169,4 (4 CO Ac), 164,6 (C-15), 136,6 (C-11), 133,4 (C-8), 128,6 (C-9), 120,0 (C-10), 99,8 (C-1), 70,9 (C-3), 70,8 (C-5), 70,2 (C-7), 68,9 (C-2), 67,1 (C-4), 61,3 (C-6), 53,0 (C-16), 20,8, 20,7, 20,7, 20,6 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): calculado para C₂₃H₂₉N₄O₁₁ [M + H]⁺+537,1833, encontrado 537,1840. [α]_D20 = -18,0° (c 1,0, MeOH).

[0125] 4-Azidoacetamidobencilo-β-D-galactopiranosido 3. HRMS (ESI+): calculado para C₁₅H₂₁N₄O₇ [M + H]⁺+369,1410, encontrado 369,1411.

[0126] 4-Azidoacetamidobencilo-1-tio-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido 18. Obtenido como cristales de color marrón claro (99 mg 94%) siguiendo el método C: comenzando para 15 (112 mg, 0,190 mmol), TMGN₃ (90,2 mg, 0,570 mmol) en CH₃CN anhidro (5 mL). La mezcla se trató y el producto crudo se purificó sobre gel de sílice (0 a 40% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado R_f = 0,26 (AcOEt/ciclohexano, 1: 1, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,20 (s, 1H, H-14), 7,50 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-10, H-12), 7,27 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-9, H-13), 5,39 (d, J = 3,3 Hz, 1H, H-4), 5,25 (t, J = 10,0 Hz, 1H, H-2), 4,96 (dd, J = 10,0 y 3,3 Hz, 1H, H-3), 4,28 (d, J = 10,0 Hz, 1H, H-1), 4,13 (dd, J = 11,4 y 6,7 Hz, 1H, H-6), 4,10 (s, 2H, H-16), 4,07 (dd, J = 11,4 y 6,7 Hz, 1H, H-6), 3,92, 3,81 (2xd, J = 13,0 Hz, cada 1H, H-7), 3,80 (d, J = 6,7 Hz, 1H, H-5), 2,14 (s, 3H, CH₃CO), 2,05 (s, 3H, CH₃CO), 2,01 (s, 3H, CH₃CO), 1,95 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,4, 170,3, 170,1, 169,7 (4CO Ac), 164,9 (C-15), 136,1 (C-11), 133,6 (C-8), 129,8 (C-9), 120,2 (C-10), 82,4 (C-1), 74,4 (C-5), 71,2 (C-3), 67,4 (C-4), 67,09 (C-2), 61,6 (C-6), 52,90 (C-16), 33,3 (C-7), 20,8, 20,7, 20,7, 20,6 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): Calculado para C₂₃H₂₉N₄O₁₀S [M + H]⁺+553,1604, encontrado 553,1621. [α]_D20 = -53,4° (c 1,0, MeOH).

[0127] 4-Azidoacetamidobencilo-1-tio-β-D-galactopiranosido 4. HRMS (ESI+): Calculado para C₁₅H₂₁N₄O₆S [M + H]⁺ 385,1182, encontrado 385,1185.

[0128] 4-Azidoacetamidofenilo-1-tio-2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosido (19). Se obtuvo como aceite incoloro (56 mg 55%) siguiendo el método C: 16 (109 mg, 0,189 mmol), TMGN3 (89,7 mg, 0,567 mmol) en CH₃CN anhidro (4 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó sobre gel de sílice (0 a 40% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado R_f = 0,28 (AcOEt/ciclohexano, 6: 4, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,08 (s, 1H, H-13), 7,51 (m, 2H, H-9, H-11), 7,49 (m, 2H, H-8, H-12), 5,39 (dd, J = 3,3 y 0,9 Hz, 1H, H-4), 5,18 (t, J = 9,9 Hz, 1H, H-2), 5,03 (dd, J = 9,9 y 3,3 Hz, 1H, H-3), 4,64 (d, J = 9,9 Hz, 1H, H-1), 4,16 (dd, J = 11,4 y 6,9 Hz, 1H, H-6), 4,13 (s, 2H, H-15), 4,09 (dd, J = 11,4 y 6,9 Hz, 1H, H-6), 3,90 (dt, J = 0,8 y 6,69 Hz, 1H, H-5), 2,10 (s, 3H, CH₃CO), 2,08 (s, 3H, CH₃CO), 2,03 (s, 3H, CH₃CO), 1,95 (s, 3H, CH₃CO). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,3, 170,1, 169,5 (4 CO Ac), 164,7 (C-14), 137,3 (C-10), 134,2 (C-8), 128,0 (C-7), 120,4 (C-9), 86,7 (C-1), 74,6 (C-5), 72,1 (C-3), 67,4 (C-4), 61,7 (C-6), 53,08 (C-15), 20,9, 20,8, 20,7, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): Calculado para C₂₂H₂₇N₄O₁₀S [M + H]⁺ 539,1448, encontrado 539,1450. [α]_D²⁰ = -12,3° (c 1,3, MeOH).

[0129] 4-Azidoacetamidofenilo-1-tio-β-D-galactopiranosido 2. HRMS (ESI+): Calculado para C₁₄H₁₉N₄O₆S [M + H]⁺ 371,1025, encontrado 371,1031.

[0130] Bencilo 4'-(2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilooxi)-bifenilo-4-carboxilato 24. Obtenido como un sólido blanco (2,189 g, 99%) después del Método E: 7 (1,439 g, 3,5 mmol), bencilo 4'-hidroxi-bifenilo-4-carboxilato 226 (2,464 g, 7,05 mmol), tetrabutilamoniohidrógenosulfato (1,188 g, 3,5 mmol) en agua destilada CH₂Cl₂ (15 mL), una solución de 1 M ac. de NaOH (5 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó sobre gel de sílice (0 a 30% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado R_f = 0,39 (AcOEt/ciclohexano, 1: 1, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,13 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-13, H-15), 7,60 (d, J = 8,5 Hz, 2H, H-12, H-16), 7,56 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-9, H-17), 7,46 (d, J = 7,2 Hz, 2H, H-22, H-26), 7,40 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-23, H-25), 7,34 (t, J = 7,2 Hz, 1H, H-24), 7,10 (d, J = 8,8 Hz, 2H, H-8, H-18), 5,52 (dd, J = 10,4 y 8,0 Hz, 1H, H-2), 5,48 (dd, J = 3,4 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 5,39 (s, 2H, H-20), 5,14 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 5,11 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,25 (dd, J = 11,2 y 7,0 Hz, 1H, H-6), 4,18 (dd, J = 11,2 y 6,4 Hz, 1H, H-6), 4,09 (ddd, J = 7,0 y 6,4 y 0,8 Hz, 1H, H-5), 2,19 (s, 3H, COCH₃), 2,08 (s, 3H, COCH₃), 2,07 (s, 3H, COCH₃), 2,02 (s, 3H, COCH₃). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,4, 170,3, 170,2, 169,5 (4 CO Ac), 166,4 (C-19), 157,2 (C-7), 145,1 (C-11), 136,3 (C-21), 135,3 (C-10), 130,4 (C-13), 128,9 (C-14), 128,7 (C-23), 128,6 (C-9), 128,4 (C-24), 128,3 (C-22), 126,9 (C-12), 117,5 (C-8), 99,7 (C-1), 71,3 (C-5), 71,0 (C-3), 68,8 (C-2), 67,0 (C-4), 66,8 (C-20), 61,5 (C-6), 20,9, 20,8, 20,7, 20,6 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): Calculado para C₃₄H₃₄O₁₂Na [M + Na]⁺ 657,1948, encontrado 657,1948. [α]_D²⁰ = +6,0° (c 1,2, 1,4-dioxano).

[0131] Ácido 4'-(2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilooxi)-bifenilo-4-carboxílico 26. Obtenido como un sólido blanco (691 mg, 37%) después de Método A: 24 (2,189 g, 3,45 mmol), Pd/C 10% (219 mg), en CH₂Cl₂ destilada (30 mL). La mezcla se trató, la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 50% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,44 (MeOH/CH₂Cl₂, 1: 9, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,17 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-13, H-15), 7,65 (d, J = 8,4 Hz, 2H, H-12, H-16), 7,58 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-9, H-17), 7,11 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-8, H-18), 5,53 (dd, J = 10,4 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 5,48 (d, J = 3,4 Hz, 1H, H-4), 5,15 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 5,12 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1), 4,26 (dd, J = 11,4 y 7,0 Hz, 1H, H-6), 4,19 (dd, J = 11,4 y 6,4 Hz, 1H, H-6), 4,11 (m, 1H, H-5), 2,20 (s, 3H, COCH₃), 2,09 (s, 3H, COCH₃), 2,08 (s, 3H, COCH₃), 2,03 (s, 3H, COCH₃). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 171,3 (C-19), 170,5, 170,4, 170,3, 169,5 (4 CO Ac), 157,3 (C-7), 145,8 (C-11), 135,2 (C-10), 131,0 (C-13), 128,7 (C-9), 127,9 (C-14), 127,0 (C-12), 117,5 (C-8), 99,7 (C-1), 71,3 (C-5), 71,0 (C-3), 68,8 (C-2), 67,0 (C-4), 61,5 (C-6), 20,9, 20,8, 20,7, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): Calculado para C₂₇H₂₈O₁₂Na [M + Na]⁺ 567,1478, encontrado 567,1489. [α]_D²⁰ = +6,6° (c 1,1, 1,4-dioxano).

[0132] Bencilo 4'-(2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosilooxi)-bifenilo-4-carboxílico 3-azido-propilo-amida 28. Obtenido como un sólido blanco (47 mg, 74%) siguiendo el Método F: 26 (131 mg, 0,102 mmol), 1-etilo-3-(3'-dimetilaminopropilo)carbodiimida (25,3 mg, 0,163 mmol), hidroxibenzotriazol (15,1 mg, 0,112 mmol), 3-azidopropilamina (20,4 mg, 0,204 mmol) en DMF anhidro (5 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó sobre gel de sílice (0 a 50% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,34 (MeOH/CH₂Cl₂, 2:98, v/v). 1H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,81 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H-13, H-15), 7,58 (d, J = 8,2 Hz, 2H, H-12, H-16), 7,52 (d, J = 8,6 Hz, 2H, H-9, H-17), 7,06 (d, J = 8,7 Hz, 2H, H-8, H-18), 6,46 (t, J = 5,7 Hz, 1H, H-20), 5,49 (dd, J = 10,4 y 8,0 Hz, 1H, H-2), 5,45 (d, J = 3,4 Hz, 1H, H-4), 5,11 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 5,08 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,22 (dd, J = 11,3 y 6,7 Hz, 1H, H-6), 4,15 (dd, J = 11,3 y 6,7 Hz, 1H, H-6), 4,08 (t, J = 6,7 Hz, 1H, H-5), 3,56 (q, J = 6,4 Hz, 2H, H-21), 3,44 (t, J = 6,4 Hz, 2H, H-23), 2,17 (s, 3H, COCH₃), 2,06 (s, 3H, COCH₃), 2,04 (s, 3H, COCH₃), 2,00 (s, 3H, COCH₃), 1,91 (p, J = 6,4 Hz, 2H, H-22). 13C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,3, 170,2, 169,5 (4 CO Ac), 167,4 (C-19), 157,1 (C-7), 143,6 (C-11), 135,3 (C-10), 133,0 (C-14), 128,5 (C-9), 127,6 (C-13), 127,1 (C-12), 117,4 (C-8), 99,7 (C-1), 71,2 (C-5), 70,9 (C-3), 68,8 (C-2), 67,0 (C-4), 61,5 (C-6), 49,8 (C-23), 38,0 (C-21), 28,9 (C-22), 20,9, 20,8, 20,8, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI+): calculado para C₃₀H₃₅N₄O₁₁ [M + H]⁺ 627,2302, encontrado 627,2304. [α]_D²⁰ = +3,8° (c 3,2, 1,4-dioxano).

[0133] Bencilo ácido 4'-(β-D-galactopiranosilooxi)-bifenilo-4-carboxílico 3-azido-propilo-amida 5. HRMS (ESI+): calculado para C₂₂H₂₇N₄O₇ [M + H]⁺ 459,1880, encontrado 459,1884.

[0134] Bencilo-6-hidroxi-2-naftoato 23: A una solución de ácido 6-2-hidroxi-naftoico (1,882 g, 10 mmol), en metanol acuoso 90% (20 mL), se añadió Cs₂CO₃ (1,629 g, 5 mmol). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se evaporó a presión reducida y luego se co-evaporó con tolueno (2 x 10 mL). La sal de cesio resultante se suspendió en DMF anhidro (10 mL), se enfrió a 0°C y se añadió bromuro de bencilo (1,19 mL, 10 mmol). Después de 1 h de agitación, la solución se dejó calentar a temperatura ambiente y se continuó agitándose durante otras 10 h antes de eliminar el disolvente a presión reducida. El residuo se recogió en agua (2 x 20 mL) y después se extrajo con AcOEt (200 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (0 a 30% AcOEt en ciclohexano) para dar el producto como un sólido blanco (2,095 g, 75%). R_f = 0,47 (ciclohexano/AcOEt, 1: 1, v/v). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,57 (d, J = 1,7 Hz, 1H, H-5), 8,05 (dd, J = 8,6 y 1,7 Hz, 1H, H-7), 7,85 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-4), 7,69 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-8), 7,50 (d, J = 7,3 Hz, 1H, H-14), 7,42 (t, J = 7,3 Hz, 1H, H-15), 7,36 (t, J = 7,3 Hz, 1H, H-16), 7,18 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,16 (dd, J = 8,8 y 2,4 Hz, 1H, H-3), 5,63 (s, 1H, OH), 5,43 (s, 2H, H-12). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 167,1 (C-11), 155,9 (C-2), 137,4 (C-9), 136,3 (C-13), 131,7 (C-4), 131,4 (C-5), 128,8 (C-15), 128,4 (C-16), 128,4 (C-14), 128,0 (C-11), 126,7 (C-8), 126,2 (C-7), 125,2 (C-16), 118,9 (C-3), 109,7 (C-1), 67,1 (C-12). HRMS (ESI⁺): calc. para C₁₈H₁₅O₃ [M + H]⁺ 279,1021; encontrado 279,1024.

[0135] Bencilo-6-(2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosiloxi)-2-naftoato 25. Obtenido como un sólido blanco (1,239 mg, 77%) siguiendo el Método E: 7 (1,082 g, 2,63 mmol), 23 (1,464 g, 5,26 mmol), sulfato de tetrabutilamoniohidrógeno (0,823 g, 2,63 mmol) en CH₂Cl₂ destilada (15 mL), una solución acuosa de NaOH de 1 M (5 mL). La mezcla se trató y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 30% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado R_f = 0,38 (AcOEt/ciclohexano, 1: 1, v/v). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,59 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-12), 8,09 (dd, J = 8,7 y 1,6 Hz, 1H, H-10), 7,89 (d, J = 8,8 Hz, 1H, H-13), 7,76 (d, J = 8,7 Hz, 1H, H-9), 7,49 (d, J = 7,2 Hz, 2H, H-20, H-24), 7,41 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H-21, H-23), 7,37 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 7,36 (m, 1H, H-22), 7,24 (dd, J = 8,8 y 2,4 Hz, 1H, H-14), 5,56 (dd, J = 10,4 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 5,50 (dd, J = 3,4 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 5,42 (s, 2H, H-18), 5,24 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1), 5,17 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 4,27 (dd, J = 11,1 y 6,8 Hz, 2H, H-6), 4,18 - 4,15 (m, 1H, H-5), 2,20 (s, 3H, COCH₃), 2,08 (s, 3H, COCH₃), 2,07 (s, 3H, COCH₃), 2,03 (s, 3H, COCH₃). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,4, 170,3, 169,6 (4 CO Ac), 166,70 (C-17), 156,7 (C-7), 136,9 (C-15), 136,3 (C-19), 131,5 (C-13), 131,2 (C-12), 129,3 (C-16), 128,9 (C-21), 128,50 (C-20), 127,5 (C-9), 126,6 (C-10), 126,5 (C-11), 119,8 (C-14), 111,2 (C-8), 99,5 (C-1), 71,5 (C-5), 71,0 (C-3), 68,9 (C-2), 67,1 (C-4), 67,1 (C-18), 61,8 (C-6), 20,9, 20,9, 20,9, 20,8 (4 CH₃ CO). HRMS (ESI⁺): Calculado para C₃₂H₃₂O₁₂Na [M + Na]⁺ 631,1791, encontrado 631,1788. [α]_D²⁰ = -11,2° (c 1,1, MeOH)

[0136] Ácido 6-(2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosiloxi)-2-naftoico 27. Obtenido como un sólido blanco (806 mg, 76%) siguiendo el Método A: 25 (1,239 g, 2,04 mmol), Pd/C 10% (124 mg), en CH₂Cl₂ destilada (15 mL). Los mezcla se agitó, la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 50% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,44 (MeOH/CH₂Cl₂, 6:94, v/v). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 8,66 (d, J = 1,6 Hz, 1H, H-12), 8,11 (dd, J = 8,6 y 1,6 Hz, 1H, H-10), 7,93 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-13), 7,80 (d, J = 8,6 Hz, 1H, H-9), 7,39 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 7,27 (dd, J = 9,0 y 2,4 Hz, 1H, H-14), 5,57 (dd, J = 10,4 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 5,51 (d, J = 3,5 Hz, 1H, H-4), 5,26 (d, J = 7,8 Hz, 1H, H-1), 5,18 (dd, J = 10,4 y 3,5 Hz, 1H, H-3), 4,30 - 4,19 (m, 2H, H-6), 4,19 - 4,17 (m, 1H, H-5), 2,20 (s, 3H, COCH₃), 2,09 (s, 3H, COCH₃), 2,08 (s, 3H, COCH₃), 2,04 (s, 3H, COCH₃). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 171,6 (C-17), 170,6, 170,4, 170,3, 169,6 (4 CO Ac), 157,0 (C-7), 137,3 (C-15), 132,14 (C-12), 131,7 (C-13), 129,3 (C-16), 127,6 (C-9), 126,6 (C-10), 125,6 (C-11), 119,9 (C-14), 111,2 (C-8), 99,5 (C-1), 71,6 (C-5), 71,1 (C-3), 68,9 (C-2), 67,2 (C-4), 61,8 (C-6), 21,0, 20,9, 20,9, 20,8 (4 CH₃CO). HRMS (ESI⁻): calculado para C₂₅H₂₅O₁₂ [M - H]⁻ 517,1346, encontrado 517,1344. [α]_D²⁰ = -6,4° (c 1,1, MeOH)

[0137] Ácido 6-(2,3,4,6-tetra-O-acetilo-β-D-galactopiranosiloxi)-2-naftoico 3-azido-propilo-amida 29. Obtenido como un sólido blanco (182 mg, 79 %) siguiendo el Método F: 27 (200 mg, 0,386 mmol), 1-etilo-3-(3'-dimetilaminopropilo)carbodiimida (96 mg, 0,618 mmol), hidroxibenzotriazol (57,4 mg, 0,425 mmol), 3-azidopropilamina (77,3 mg, 0,772 mmol) en DMF anhidro (5 mL). La mezcla se agitó y el producto bruto se purificó en gel de sílice (0 a 50% AcOEt en ciclohexano) para proporcionar el producto deseado. R_f = 0,32 (MeOH/CH₂Cl₂, 2:98, v/v). ¹H RMN (600 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7,83 (d, J = 9,0 Hz, 1H, H-13), 7,80 (dd, J = 8,5 y 1,5 Hz, 1H, H-10), 7,76 (d, J = 8,5 Hz, 1H, H-9), 7,33 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-8), 7,22 (dd, J = 9,0 y 2,4 Hz, 1H, H-14), 6,52 (t, J = 5,7 Hz, 1H, NH), 5,53 (dd, J = 10,4 y 7,9 Hz, 1H, H-2), 5,47 (dd, J = 3,4 y 0,8 Hz, 1H, H-4), 5,19 (d, J = 7,9 Hz, 1H, H-1), 5,13 (dd, J = 10,4 y 3,4 Hz, 1H, H-3), 4,24 (dd, J = 11,2 y 7,1 Hz, 1H, H-6), 4,16 (dd, J = 11,2 y 6,0 Hz, 1H, H-6), 4,14 (dd, J = 6,0 y 0,8 Hz, 1H, H-5), 3,59 (quad, J = 6,1 Hz, 2H, H-19), 3,46 (t, J = 6,1 Hz, 2H, H-21), 2,17 (s, 3H, COCH₃), 2,05 (s, 3H, COCH₃), 2,05 (s, 3H, COCH₃), 2,01 (s, 3H, COCH₃), 1,93 (p, J = 6,1 Hz, 2H, H-20). ¹³C RMN (151 MHz, CDCl₃) δ ppm: 170,5, 170,4, 170,3, 169,5 (éster 5 CO), 167,6 (C-17), 156,1 (C-7), 135,9 (C-15), 130,9 (C-13), 130,7 (C-11), 129,4 (C-16), 127,7 (C-9), 127,4 (C-12), 124,5 (C-10), 119,9 (C-14), 111,1 (C-8), 99,5 (C-1), 71,4 (C-5), 71,0 (C-3), 68,8 (C-2), 67,0 (C-4), 61,6 (C-6), 49,8 (C-21), 38,1 (C-19), 29,0 (C-20), 20,9, 20,8, 20,8, 20,7 (4 CH₃CO). HRMS (ESI⁺): calculado para C₂₈H₃₃N₄O₁₁ [M + H]⁺ 601,2146, encontrado 601,2150. [α]_D²⁰ = -7,0° (c 1,1, MeOH)

[0138] Ácido 6-(β-D-galactopiranosiloxi)-2-naftoico 3-azido-propilo-amida 6. HRMS (ESI⁺): calculado para C₂₀H₂₅N₄O₇ [M + H]⁺ 433,1723, encontrado 433,1722.

O-2-cianoetilo-O'-(3,6,9-trioxadodecan-11-inilo)-N,N-diisopropilo-fosforamidito 33.

5 [0139] A una solución de 3,6,9-trioxadodecan-11-in-1-ol 31 (376 mg, 2 mmol) en diclorometano seco (20 mL) en presencia de tamiz molecular de 4 Å y en atmósfera de argón, diisopropiletilamina (520 µL, 3 mmol) se añadieron y a continuación O-(2-Cianoetilo)-N,N-diisopropilo-clorofosforamidita (480 µL, 2 mmol) se añadió gota a gota. Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de agua. Después de 10 min, la solución se diluyó con diclorometano (40 mL) y después se lavó con una solución acuosa de NaHCO₃ saturado (75 mL). La capa orgánica se extrajo con diclorometano (2 x 100 mL), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó a sequedad bajo presión reducida.

10 El producto bruto se sometió a cromatografía sobre gel de sílice, 0 a 50% de acetato de etilo en ciclohexano que contenía 4% de Et₃N, proporcionando 33 como jarabe incoloro 563 mg, 73%. TLC: R_f = 0,55 Ciclo/AcOEt/Et₃N 5: 4: 1, v/v/v. 1H-RMN (CDCl₃, 300 MHz): δ 1,14 (dd, 12H, J = 6,8 Hz, isopropilo), 2,36 (t, 1H, J = 2,4 Hz, -CCH), 2,59 (t, 2H, J = 6,5 Hz, -CH₂-CN), 3,5-3,81 (m, 16H, -CH-, -O-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-P), 4,14 (d, 2H, J = 2,5 Hz, HCC-CH₂). 13C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 18,17 18,26, 22,4, 22,5, 22,6, 40,9, 41, 56,3, 56,5, 60,4, 60,6, 67, 68,3, 68,5, 68,6, 69, 69,2, 72,4, 77,5, 115,6. 31P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): δ 148,67 ppm. Modo positivo HRMS TOF-ES calculado para C₁₈H₃₆N₂O₆P [M+H₂O+H]⁺ 407,2311 encontrado 407,2270.

15

Síntesis de conjugados de oligonucleótidos de galactósido aromático centrados en manosa

20 [0140] La inmovilización en soporte sólido de azida 35oF manósido propargílico por azida de alquino catalizada por Cu(I) de cicloaddición 1,3-dipolar. Una solución acuosa de α-manopiranosido propargílico 347 (100 mM, 175 µL), soluciones acuosas recién preparadas de CuSO₄ (100 mM, 14 mL) y ascorbato de sodio (500 mM, 14 mL), agua (147 mL) y MeOH (350 mL) se añadieron a 3,5 mmol de soporte sólido de azida 35,8 La mezcla resultante en un tubo sellado se calentó a 60°C durante 45 min utilizando un sintetizador de microondas (MonoWave 300, Anton Paar). La temperatura se controló con una sonda de infrarrojos interna. La solución se retiró, y los granos de CPG se lavaron con H₂O (3 X 2 mL), MeOH (3 X 2 mL) y CH₃CN (3 x 2 mL), y se secaron proporcionando el manósido de soporte sólido 36.

25

30 [0141] Procedimiento general para la introducción de fosforamiditas de alquinilo en hidroxilos de manosa. Manósidos de apoyo sólido 36 (escala de 1 µmol) se trató con fosforamiditas de alquinilo 329 o 33, en un sintetizador de ADN (ABI 394) según la química de fosforamidita. Sólo se realizaron las etapas de acoplamiento y oxidación. Para la etapa de acoplamiento, bencilmercaptotetrazol (BMT) se utilizó como activador (0,3 M en CH₃CN anhidro) y fosforamidita x1, o x2 (0,2 M en CH₃CN anhidro), se introdujo tres veces (3 x 40 mmol) con un giro de tiempo de acoplamiento de 180 s (3 x 180 s). La oxidación se llevó a cabo con una solución comercial de yoduro (0,1 M I₂, THF/piridina/agua 90: 5: 5) durante 15 s para formar fofostriésteres o con 3H-1,2-benzoditioil -3-ona-1,1,-dióxido con (reactivo de Beaucage, 0,05 M en acetonitrilo seco) 10 para 60 segundos para formar tionofosfotriésteres.

35

40 [0142] Procedimiento general para la elongación de secuencias de ADN y etiquetado con Cy3. Las secuencias de ADN fueron sintetizadas en los andamios sobre soporte sólido tetraalquinilo en escala de 1 mmol en un sintetizador de ADN (ABI 394) por química de fosforamidita estándar. Para la etapa de acoplamiento, BMT se utilizó como activador (0,3 M en CH₃CN anhidro), fosforamiditos de nucleósidos disponibles comercialmente (0,075 M en CH₃CN anhidro) se introdujeron con un tiempo de acoplamiento de 20 s y amidita de Cy3 (0,067 M en CH₃CN anhidro) con un tiempo de acoplamiento de 180 s. El paso de protección terminal se llevó a cabo con anhídrido acético usando solución comercial (Tapa A: Ac₂O/piridina/THF, 10:10:80 y Tapa B: 10% de N-metilimidazol en THF) durante 15 s. La oxidación se llevó a cabo durante 15 s utilizando 0,1 M I₂, THF/piridina/agua 90: 5: 5. La destrilación se realizó con 2,5% DCA en CH₂Cl₂ durante 35 s.

45

50 [0143] Procedimiento general para la desprotección de los oligonucleótidos en un soporte sólido. Las perlas de CPG que llevan oligonucleótidos modificados se transfirieron a un vial de tapón de rosca de 4 mL y se trataron con 2 mL de amoniaco acuoso concentrado durante 15 h a temperatura ambiente y se calentó a 55°C durante 2 h. Para cada compuesto, el sobrenadante se retiró y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en agua para el análisis y la caracterización posterior.

Procedimiento general para la reacción CuAAC

55 [0144] Procedimiento para la introducción de los derivados de D-galactósido azido-funcionalizado 1-6: A una solución de oligonucleótido de 5'-fluorescente-3'-alquino (100 nmol en 100 µL de H₂O) se añadieron galactósidos azido-funcionalizados 1-6 (3 equiv. por función de alquino, 100 mM en MeOH), ~0,1 mg de nanopolvo Cu(0), acetato de trietilamonio 0,1 M de tampón, pH 7,7 (25 µL), agua y MeOH para obtener un volumen final de 250 µL (agua MeOH, 1: 1, v/v). El tubo que contiene la preparación resultante se selló y se colocó en un sintetizador de microondas Monowave 300 de Anton Paar a 60°C durante 60 min.

60

Elaboración de las reacciones de CuAAC y purificaciones de HPLC

65 [0145] Se añadió EDTA (400 µL) a las mezclas y después de la centrifugación, los sobrenadantes se retiraron para eliminar Cu(0) y se desalaron por cromatografía de exclusión por tamaño en NAP10. Después de la evaporación los

oligonucleótidos 5'-fluorescentes 3'-acetilo-glicomiméticos se disolvieron en agua y se purificaron por HPLC preparativa de fase inversa. Compuestos puros se trataron con amoníaco acuoso concentrado (3 mL) durante 2 h a temperatura ambiente para eliminar grupos de acetilo, y se evaporaron a sequedad (pureza > 97%). Los compuestos finales se purificaron de nuevo mediante HPLC preparativa de fase inversa usando un gradiente lineal de 8% a 32% de acetonitrilo en tampón de TEAAc a pH 7 durante 20 min. Los residuos se disolvieron en agua para análisis posteriores.

Fabricación de DDI-micromatrices

[0146] *Fabricación de portaobjetos microestructurados:* Portaobjetos microestructurados se ofrecen con 40 pocillos cuadrados (anchura de 3 mm, profundidad de 60±1 µm, con una separación de 4,5 mm entre cada microrreactor). Los microrreactores se fabricaron por fotolitografía y procedimiento de grabado en húmedo en portaobjetos de vidrio planos. Estos métodos se detallan en otro lugar (Mazurczyk, R. et al, (2008) Sens. Actuators, B 128, 552-559; Vieillard, J. et al, (2007) J. Chromatogr B 845, 218-225.).

[0147] *Silanización de los portaobjetos de vidrio:* De acuerdo con el protocolo desarrollado por Dugas et al. ((2003) J. Colloid Interface Sci 264, 354-36; (2004) Sens. Actuators, B 101, 112-121; (2004) Sens Actuators, B 101, 112-121), los portaobjetos se funcionalizaron del siguiente modo: después del tratamiento de piraña, los portaobjetos se calentaron en atmósfera de nitrógeno seco a 150°C durante 2 h. A continuación, se añadieron pentano seco y 11-terc-butilo-sililundecanoato (dimetilamino) a temperatura ambiente. Después de 2 h de incubación, el pentano se evaporó y los portaobjetos se calentaron a 150°C durante la noche. Portaobjetos funcionalizados se obtuvieron después de lavado en THF y enjuague en agua. La función de éster se convirtió en el correspondiente ácido usando ácido fórmico durante 7 h a temperatura ambiente. El grupo ácido que lleva portaobjetos se activa para el acoplamiento de amina con N-hidroxisuccinimida (0,1 M) y di(isopropilo)carbodiimida (0,1 M) en THF seco, durante la noche a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos se aclararon en THF y diclorometano, 10 minutos bajo ultrasonido.

[0148] *Inmovilización de los oligonucleótidos modificados con amino:* Cuatro oligonucleótidos modificados con amino se compraron de Eurogentec. Manchado de 0,3nL de los oligonucleótidos correspondientes a 25 µM en PBS_{10X} (pH 8,5) en la parte inferior de cada reactor (64 puntos por pocillo) con el robot de manchado: *Sciension sciFLEX ARRAYER s3*. La reacción de sustitución se realizó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera saturada de agua y, a continuación, se dejó que el agua se evaporara lentamente. Lavado de los portaobjetos se realizó con SDS_{0,1%} a 70°C durante 30 minutos y brevemente agua desionizada.

Tabla 1: Características principales de secuencias de ADN utilizadas para la fabricación de la plataforma de anclaje del ADN. % GC y T_m se calcularon mediante software de internet del servidor web DINAMelt (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-melting>) con [Na⁺] = 137 mM en PBS_{1X}, [cZip] = 1 µM y T = 37°C.

Referencia	Secuencia de ADN 5'→ 3'	% GC	T _m
Zip 1.1.1	5'-GTG AGC CCA GAG GCA GGG - (CH ₂) ₇ -NH ₂	72,0	58,3
Zip 1.3.1	5'-GTG GAG GCA CCA AGC TTT- (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	58,6
Zip 1.4.1	5'-CCA AGC GAG GTG GCA TTT- (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	59,6
Zip 1.6.1	5'-GCA GAG AGC GTG CCA TTT - (CH ₂) ₇ -NH ₂	56,0	59,7

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta H + R \ln\left(\frac{[CZip]}{2}\right)} \times 1000$$

[0149] *Paso de bloqueo:* Para evitar la adsorción no específica durante el paso de hibridación, todas las diapositivas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA). El bloqueo se realizó con solución de BSA al 4% en PBS_{1X} (pH 7,4), a 37°C durante 2 h. Los pasos de lavado fueron: 3x3min en PBS-Tween_{10,05%} seguido por 3x3min en PBS_{1X} y, finalmente, las gafas se enjuagaron con agua desionizada antes de secarse por centrifugación.

Hibridación de glicomiméticos

[0150] *Paso de hibridación:* 2 µL de una solución de cada glicoconjugado que lleva una etiqueta de ADN, a 1 µM en PBS_{1X} (pH 7,4), se colocaron en la parte inferior del correspondiente pocillo y se dejaron hibridar durante la noche a

temperatura ambiente en una cámara de vapor de agua saturado. Las muestras se lavaron en citrato de salina-sodio 2x (SSC_{2x}), SDS_{0,1%} a 51°C durante 1 minuto, seguidos por SSC_{2x} a temperatura ambiente durante un 5 minutos adicionales y finalmente se enjuagaron con agua desionizada antes de secarse por centrifugación.

- 5 **[0151] Paso de bloqueo:** Después de la hibridación, los portaobjetos se bloquearon de nuevo con albúmina de suero bovino (BSA). El bloqueo se realizó con solución de BSA al 4% en PBS_{1x} (pH 7,4), a 37°C durante 1 h. Los pasos de lavado: 3 x 3 min en PBS-Tween_{0,05%}, seguido de 3 x 3 min en PBS_{1x}, se enjuagaron brevemente con agua desionizada antes de secado por centrifugación.

10 Etiquetado de lectina

- 15 **[0152] Etiquetado Alexa647 de lectina de PA-IL:** La lectina PA-IL fue marcada con Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling Kit (A30009) a partir de Invitrogen. En resumen, 100 µl de una solución de 1 mg/ml de PA-IL (MW: 51 kDa, PA-IL fue proporcionado amablemente por Dr. Anne Imberty, CERMAV, Grenoble) diluido en PBS_{1x} (pH 7,4) se mezcló con 10 ml de 1 M de bicarbonato de sodio (pH 8,3). El volumen apropiado de solución de colorante reactivo a 7,94 nmol/ml se transfirió en el tubo de reacción que contiene la proteína de pH ajustado. La mezcla de reacción se mezcló durante 15 min a temperatura ambiente antes de la purificación en una columna de centrifugación (recipiente de resina de gel) con el fin de separar la proteína marcada de colorante sin reaccionar.

- 20 **[0153]** La concentración de lectina y la relación de colorante a lectina se estimaron mediante la densidad óptica usando un sistema de células de bandeja combinado a un espectrofotómetro *Safas Monaco UV mc²* leyendo la absorbancia a 281 nm y 650 nm. La concentración de PA-IL se estimó en 13,53 µM, con un grado de marcado de 0,20 tintes para PA-IL tetramérica.

25 Determinación de CI₅₀ con reconocimiento biológico "en el chip"

- 30 **[0154] Preparación de las soluciones de incubación:** Lectina PA-IL (0,12 µM de concentración final), BSA (2% de concentración final) y CaCl₂ (1 µg/mL de concentración final) se diluyó en PBS_{1x} (pH = 7,4). En cada microtubo se añadió el inhibidor lactosa a la concentración deseada final (0; 1,10⁻⁵; 1,10⁻⁴; 5,10⁻⁴; 1,10⁻³; 5,10⁻³; 1,10⁻²; 5,10⁻²; 0,1; 1; 5; 10; 50; 10²; 5,10²; 10³; 5,10³; 10⁴; 10⁵; 3,10⁵).

- 35 **[0155]** Incubación del complejo glicoconjugado-lectina en los microrreactores: 2 µL de cada solución se depositaron en los pocillos correspondientes y el portaobjetos se incubó a 37°C en una cámara saturada de vapor de agua durante 3 h. Los pasos de lavado son: PBS-Tween_{0,02%} 5min a 4°C, a continuación brevemente en agua desionizada y se secó por centrifugación.

- 40 **[0156] Exploración de fluorescencia:** El portaobjetos se escaneó a 532 nm después a 635 nm con el escáner de micromatriz, paquete de software GenePix 4100A (Axon Instruments; λ_{ex} 532/635 nm y λ_{em} 575/670 nm). La señal de fluorescencia de cada conjugado se determinó como el promedio de la señal de fluorescencia media de sesenta y cuatro puntos.

[0157] Los valores de CI₅₀ se determinaron usando "programa BioDataFit 1,02". El modelo elegido fue "sigmoideal":

$$45 \quad Y = a + (b - a) / [1 + 10^{-(x - c)}]$$

con $a = F_{\min}$, $b = F_{\max}$, $x = \log[\text{PA-IL}]$ y $c = \log(\text{CI}_{50})$. $F_{\min/\max}$ es la máxima señal de fluorescencia mínima y/o Alexa-647 observado para un galactomimético.

50 II- Síntesis de glicoclústers **17a-e** y **18** y la determinación de su eficacia de unión a PA-IL:

II-A Síntesis:

- 55 **[0158]** Se sintetizó glicoclústers centrados por manosa **17 a-e** y **18** años y se estudió la influencia de seis enlazadores diferentes en glicomimético en su reconocimiento a la PA-IL. Los enlazadores han sido elegidos para longitudes de spam diferentes (de 9 a 14 átomos) y capacidades de solvatación (alquilo, aromático o glicol de etileno) (Fig. 1).

- 60 **[0159]** Con este fin, se utilizaron dos fosoramiditas (es decir, pent-4-inilo 1 y 6-bromohexilo 2) en combinación con galactosa de propagilo **3** y diferentes derivados de galacto azida **4a-e** permitiendo la construcción de los glicoclústers por química de la fosoramidita (Beaucage, S.L. y Caruthers, M.H. (1981) *Tetrahedron Lett.* 22, 1859-1862) y cicloadición de alquino azida catalizada de cobre (CuAAC) química "clic" (Rostovtsev, VV et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2596-2599; Tornøe, CW, Christensen, C., y Meldal, M. (2002) *J. Org. Chem.* 67, 3057-3064) (Fig.2).

65

[0160] Galactosa de propargílicos **3** y derivados de azida de galactosa **4a-e** y se prepararon de acuerdo a los protocolos de la bibliografía. Hasegawa, T. et al., (2007) Org. Biomol. Chem. 5 (15), 2404-2412; Joosten, JAF et al., (2004) J. Med. Chem. 47, 6499-6508; Szurmai, Z. et al., (1989) Acta Chimica Hungarica-Models in Chemistry 126, 259-269.; Pourceau, G. et al., (2009) J. Org. Chem. 74, 1218-1222; Mereyala, H.B., y Gurralla, SR (1998) Carbohydr. Res. 307, 351-354).

[0161] El glicoclústers centrados en manosa **17a-e** y **18** se prepararon de acuerdo a una estrategia informada recientemente (Pourceau, G. et al., (2010) Bioconjugate Chem. 21, 1520-1529). Básicamente, un propargilo de manosa **6** se inmovilizó sobre un soporte sólido de azida **5** por CuAAC y luego fosforamiditas de pent-4-inilo **1** o bromohexilo **2** se introdujeron en los cuatro hidroxilos por fosforilación proporcionando el núcleo de manosa con cuatro grupos de pentinilfosfato o cuatro grupos de bromohexilfosfato (Figura 3). El oligonucleótido se alargó y se marcó con un colorante fluorescente (Cy3), proporcionando **8** y **9**. Para **9**, los cuatro átomos de bromo se sustituyeron con azida de tetrametilguanidina (TMG N₃) para dar el oligonucleótido de azida tetra **10**. Después de un tratamiento con amoníaco, los compuestos **11** y **12** se conjugaron con derivados de galactosa **4a-e** y **3**, respectivamente, por CuAAC en solución, usando Cu(0), proporcionando los conjugados de oligonucleótidos de tetra-galactosa centrados por manosa **15a-e** y **16**. Conjugados puros se aislaron por HPLC de fase inversa y un último tratamiento con amoníaco hidroliza los grupos de acetilo de los restos de galactosa que ofrezcan los seis galactoclústers esperados **17a-e** y **18** que presentan diferentes enlazadores.

II-B Protocolos de ensayo biológico:

[0162] Se determinó/midió la eficiencia de enlace de los galactomiméticos **17a-e** y **18** a PA-IL usando un glicomatriz basado en ADN en los escaneos de fluorescencia directa (Chevolot, Y. et al., (2007) Angew. Chem. Int. Ed. 46, 2398-2402). Un trimanosilcluster lineal (**DMCH-PNMTzEG₃-O-Man**)₃ (**C1**, se describe en la Chevolot et al., 2007) se utilizó como control negativo que muestra la unión específica de PA-IL a galactoclústers y un tetragalactosilcluster lineal (**DMCH-PNMTzEG-O-gal**)₄ (**C2**, Chevolot, Y. et al., (2011) Chem. Comm. 47, 8826-8828) se utilizó para el control positivo y la comparación (Fig. 4). Para este fin, todos los glicoclústers se inmovilizaron sobre un matriz de ADN por inmovilización dirigida por ADN (DDI) gracias a su etiqueta de ADN. Después, se añadió alexa647-PA-IL y se incubó durante 3 horas, después de lavado se leyó la intensidad de la fluorescencia a 635 nm dando información relativa de la fuerza de unión (Fig. 5).

II-C Resultados del ensayo:

[0163] El clúster de trimanosa lineal (**DMCH-PNMTzEG₃-O-Man**)₃ **C1** no se unió a PA-IL, mostrando el reconocimiento selectivo y la ausencia de unión no específica en la micromatriz. El clúster de tetragalactosa lineal (**DMCH-PNMTzEG-O-Gal**)₄ **C2** exhibió fluorescencia alrededor de 3.100 unidad arbitraria (a.u.).

[0164] Los datos mostraron que no existe una correlación evidente entre la longitud del enlazador entre el resto de galactosa y el núcleo de manosa en la eficacia de la unión.

[0165] Por el contrario, parecía que galactomiméticos con grupo aromático cerca del resto de galactosa (**17d** y **18**) mostraron una alta unión con una preferencia por el fenilo (AcNPhe) (**17d**) en comparación con el motivo de metileno de triazol (TZM) (**18**). Las diferencias de unión entre **17a**, **17b**, **17e** y **17c** no fueron significativas lo que sugiere que los enlazadores de etilenglicol (EG₂ o EG₃) o alifático (Pro o DMCH) no interactuaron más con residuos de aminoácidos de PA-IL.

III- Síntesis de glicoclústers **22-31** y determinación de su eficacia de unión a PA-IL:

[0166] Se examinó el efecto de la fracción de AcNPhe-O-Galactosa en andamio diferente con por una parte su introducción en los andamios lineales como andamio DMCH exhibiendo dos a cinco residuos (**DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal**)₂₋₅ (compuestos **22-25**) o andamio de desoxitimidina que exponen cuatro residuos de galactosa (**dT-PNMTzAcNPhe-o-Gal**)₄ (**26**) (Figura 8) y por otra parte se introdujo el resto de AcNPhe-o-Galactosa en galactosa- (**27**) y andamios centrados en glucosa (**28**) (Fig. 9). Para la comparación, el efecto del resto de HexTzM-galactosa también se estudió con galactoclústers construidos sobre galactosa- (**29**) y los andamios centrados en glucosa (**30**) (Fig. 9).

III-A Síntesis:

[0167] Los galactoclústers DMCH lineales se sintetizaron a partir de soporte sólido de propanodiol en el que monoéster de *H*-fosfonato DMCH (Chevolot, Y. et al., (2007) Angew Chem Int Ed 46, 2398-2402; Bouillon, C et al., (2006) J. Org. Chem 71, 4700 a 4702) se acoplaron dos y cinco veces por la química del *H*-fosfonato utilizando cloruro de pivaloilo como activador (Figura 8). Los vínculos de diéster de *H*-fosfonato resultantes se oxidan por tetracloruro de carbono en presencia de propargilo de amina que permite la introducción de funciones de alquino. Entonces, el oligonucleótido fue ensamblado y Cy3 marcado por la química de la fosforamidita. Después de la desprotección y la liberación del soporte sólido, por tratamiento con amoníaco, los oligonucleótidos modificados resultantes que presentan de dos a cinco alquinos se conjugaron con **4d** por CuAAC. Después de la purificación por

HPLC los grupos de acetilo se hidrolizaron por el amoníaco conduciendo a los oligonucleótidos conjugados a galactoclústers DMCH lineales (**DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal**)₂₋₅ (**22-25**). La tetra-galactosa lineal en andamio de desoxitimidina (**dT-PNMTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**26**) se sintetizó de manera similar usando *H*-fosfonato de DMTr-timidina disponible comercialmente introducido cuatro veces sobre el soporte sólido.

5 La síntesis de (**POProTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**27**) centrada en galactosa y (**POProTzAcNPhe-O-Gal**)₄ (**28**) centrada en glucosa y (**HexTzM-Gal**)₄ (**29**) centrada en galactosa, y (**HexTzM-Gal**)₄ (**30**) centrada en glucosa procedió con el mismo protocolo que se ha descrito anteriormente en andamio de manosa pero utilizando propargilo-galactosa o propargilo-glucosa. Se inmovilizaron primero sobre un soporte sólido de azida **5**. Para fines de comparación, un conjugado de oligonucleótido (**31**) que presenta un único motivo TzAcNPhe-O-Gal se sintetizó (Fig. 9). Con este fin, un Cy3-oligonucleótido se sintetizó a partir de un soporte sólido de mono-alquino que se conjugó con **4d** por CuAAC (véase SI).

III-B Protocolos de ensayo biológico:

15 - Prueba 1:

[0168] Las propiedades de unión de estos galactoclústers a PA-IL se estudiaron utilizando un DDI proporcionando un glicomatriz. Después de su inmovilización en el chip, se añadió alexa 647-PA-IL y después del lavado se leyó la intensidad de fluorescencia de cada glicocluster (Fig. 10). La señal fluorescente Alexa 647 (excitación 635 nm, emisión 675 nm) se correlaciona con unión PA-IL.

- Prueba 2:

25 **[0169]** Puesto que el rango dinámico de la intensidad de fluorescencia es bastante limitado, como ya se informó, (Moni, L. et al, (2009) ChemBioChem **10**, 1369-1378; Zhang, J. et al, (2009) Biosens. Bioelectron **24**, 2515-2521.) que entonces determina el valor de CI_{50} de los glicoclústers utilizando lactosa como inhibidor (Tabla 1) y se calculó la potencia. En nuestro caso, el valor CI_{50} que corresponde a la concentración de lactosa requiere desplazamiento al 50% de PA-IL desde el glicocluster. Por lo tanto, cuanto más alto sea el valor CI_{50} , más alto será la afinidad del glicocluster para PA-IL. Por lo tanto, el valor de CI_{50} se denominó CI_{50Lac} .

III-C Resultados del ensayo:

- Prueba 1:

35 **[0170]** La señal fluorescente de los glicoclústers DMCH lineales se levantó con el número de residuos de galactosa que muestran el beneficio del aumento de motivos de sacáridos en la eficacia de la unión. El tetracluster con motivos **MTzEG₃-O-Gal** muestra una señal fluorescente aproximadamente 5 veces menor que su análogo con motivos **TzAcNPhe-O-Gal** que confirman la mejor unión de aromático-galactosa. Ambos glicoclústers lineales tetraméricos con DMCH o andamio de timidina mostraron una unión mayor que el clúster trimérico de DMCH pero con una preferencia por el DMCH. En cuanto a los tetragalactoclústers centrados en hexosa, los datos confirmaron la mejor unión de galactoclústers que exhiben motivos **ProTzAcNPhe-O-Gal** frente a los HexTzM-Gal cualquiera que sea el núcleo de hexosa. Para ambas familias, glicoclústers construidos a partir de un núcleo de manosa y glucosa muestran la señal fluorescente similar y los construidos a partir de un núcleo de galactosa muestran una señal inferior (Fig. 10).

45 La comparación entre glicoclústers lineales y centrados en hexosa que llevan cuatro motivos **ProTzAcNPhe-O-Gal** da el siguiente aumento de la señal fluorescente: **Gal(POProTzAcNPhe-O-Gal)**₄ ≤ **(dT-PNMTzAcNPhe-O-Gal)**₄ < **(DMCH-PN-MTzAcNPhe-O-Gal)**₄ < **Glc(POProTzAcNPhe-O-Gal)**₄ ≤ **Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)**₄. Estos datos mostraron la mejor unión de glicoclústers de manosa y centrados en glucosa entre todos los glicoclústers incluso mejor que la penta-galactosa lineal DMCH.

- Prueba 2:

55 **[0171]** La comparación de las monogalactosas DMCH-PNMTz-EG₃-O-Gal (Chevolot, Y. et al., (2007) Angew. Chem. Int. Ed. **46**, 2398-2402) y DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal con valor CI_{50Lac} de 5 y 16 mM mostró, respectivamente, un aumento de 3,2 veces en la unión para la galactosa aromática (entradas 1 y 2) que es similar a la observación hecha por Ceccioni et al por Enzyme Linked Lectin Assay (Ceccioni, S. et al., (2012) Chem. Eur. J. **18**, 6250-6263). Para los galactoclústers lineales, se observó un aumento del valor CI_{50Lac} correspondiente a una mejor unión a PA-IL con el aumento de número de residuos con un efecto de umbral entre los 2 y 3 residuos (Tabla 1, entradas 4 y 5). El beneficio del enlazador **PNMTzAcNAr** frente al enlazador **MTzEG₃** se confirmó (**DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal**)₄ **24** entrada 6: CI_{50Lac} = 1,056 μM vs (**DMCH-PNMTzEG₃-O-Gal**)₄ **C2**, entrada 3: CI_{50Lac} = 773 μM). Esta tendencia se destacó en los glicoclústers centrados en manosa (entrada 8: CI_{50Lac} = 29 μM para **G3 Man(POProTzEG₃-O-Gal)**₄ frente a la entrada 9: CI_{50Lac} = 2,826 μM para **17d Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)**₄. Los resultados indicaron la superioridad de un motivo **TzAcNPhe-O-Gal** con una topología centrada en manosa para ganar una mayor unión a PA-IL con un aumento de potencia de 177 veces en comparación con el monoaromático-galactosa y 565 veces en comparación con la EG₃-O-galactosa (Entrada 9). Estos resultados ilustran que la combinación de la naturaleza del enlazador y de la disposición espacial tiene una fuerte influencia sobre la afinidad.

[0172] Los datos mostraron que la influencia del núcleo de hexosa en la unión a PA-IL es diferente según la naturaleza de los enlazadores de galactosa (Tabla 2). En cuanto a los tetragalactoclústers, con un enlazador **POPProTzAcNAr**, se observó la mejor unión para el núcleo de manosa **17d** seguido por la glucosa y núcleo de galactosa (Entradas 9-11). Por el contrario, con un enlazador de **HexTzM**, se observó la mejor unión para el clúster con un núcleo de glucosa seguido del núcleo de galactosa y manosa (Entradas 12-14).

Entrada	Glicocluster	Cl _{50Lac} μM	Potencia vs EG ₃ -O-Gal	Potencia vs AcNPhe-O- Gal
1	DMCH-PNMTz EG ₃ -O-Gal	5	1,0	0,3
2	MTzAcNPhe-O-Gal 31	16	3,2	1,0
3	(DMCH-PNMTzEG ₃ -O-Gal) ₄ C2	773	155	48
4	(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal) ₂ 22	185	37	12
5	(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal) ₃ 23	866	173	54
6	(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal) ₄ 24	1056	211	66
7	(DMCH-PNMTzAcNPhe-O-Gal) ₅ 25	1550	310	97
8	Man(POPProTzEG ₃ -O-Gal) ₄ C2	29	5,8	1,8
9	Man(POPProTzAcNPhe-O-Gal) ₄ 17d	2826	565	177
10	Gal(POPProTzAcNPhe-O-Gal) ₄ 27	662	132	41
11	Glc(POPProTzAcNPhe-O-Gal) ₄ 28	805	161	50
12	Man(HexTzM-Gal) ₄ 18	107	21	6,7
13	Gal(HexTzM-Gal) ₄ 29	532	106	33
14	Glc(HexTzM-Gal) ₄ 30	775	155	48
15	Man(POEG ₂ MTzEG ₃ -Gal) ₄ 36	24	4,8	1,5
16	Man(POEG ₂ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄ 32	4218	844	264
17	Man(POPProTzAcNPhe-O-Gal) ₈ 34	6803	1361	425
18	Man[POTHME(MTzAcNPhe-O-Gal) ₂] ₄ 35	1807	361	113

Tabla 2: Valores de Cl_{50Lac} de los glicoclústers determinados por la competencia con lactosa.

cluster	Etiqueta de ADN	Galactoclústers	Cl ₅₀ (mM)	K _d (nM)
G6	cZip 1,4	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄	5,7	170
G8	cZip 1,6	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄	8,4	125
G5	cZip 1,3	Man(EG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄	8,1	99
G7	cZip 1,2	Man(EG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -Gal) ₄	9,1	85
G13	cZip 1,5	Man(EG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄	12,0	85
G15	cZip 1,2	Man(EG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄	13,3	76
G4	cZip 1,1	Man(PSEG ₃ MTzAcNPh-Gal) ₄	17,7	76
G16	cZip 1,6	Man(PSEG ₃ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄	18,1	75
G14	cZip 1,5	Man(PSEG ₂ MTzAcNPhe-CH ₂ -SGal) ₄	18,5	71
G12	cZip 1,1	Man(PSEG ₃ MTzAcNPh-SGal) ₄	19,7	70
G2	cZip 1,4	Man(PSEG ₂ MTzAcNPh-Gal) ₄	36,2	63
G10	cZip 1,5	Man(PSEG ₂ MTzAcNPh-SGal) ₄	38,2	55
G9	cZip 1,2	Man(EG ₂ MTzAcNPh-SGal) ₄	45,1	51
G11	cZip 1,6	Man(EG ₃ MTzAcNPh-SGal) ₄	63,9	49
G23	cZip 1,10	Man(EG ₃ MTzproNCONapht-Ogal) ₄	68,0	48
G19	cZip 1,10	Man(EG ₃ MTzproNCOBisphe-Ogal) ₄	68,9	46
G20	cZip 1,4	Man(PSEG ₃ MTzproNCOBisphe-Ogal) ₄	81,6	43
G1	cZip 1,6	Man(PSEG ₂ MTzproNCOBisphe-Ogal) ₄	103,1	39
G18	cZip 1,1	Man(EG ₂ MTz AcNPh-Gal) ₄	91,6	36
G24	cZip 1,4	Man(PSEG ₃ MTzproNCONapht-Ogal) ₄	129,4	31
G3	cZip 1,4	Man(EG ₃ MTz AcNPh-Gal) ₄	122,7	28
G22	cZip 1,6	Man(PSEG ₂ MTzproNCONapht-Ogal) ₄	160,2	20
G17	cZip 1,3	Man(EG ₂ MTzproNCOBisphe-Ogal) ₄	160,3	20
G21	cZip 1,3	Man(EG ₂ MTzproNCONapht-Ogal) ₄	178,3	14

IV- Síntesis de glicoclústers **32-39** y determinación de su eficacia de unión a PA-IL:

[0173] Se prepararon los compuestos que comprenden un núcleo de manosa y los motivos TzAcNPhe-O-Gal con algunas variaciones. Por un lado, aumentamos la longitud/flexibilidad entre el núcleo de manosa y el triazol usando una fosforamidita de propargilo de di- o tetraetilenglicol **1a-b** en lugar del pentinilo y por otro lado, hemos introducido ocho grupos de alquínilo usando una fosforamidita de bis-pentinilo **1c** o fosforamidita de propilo 2,2-(bis-propargyloximetilo) **1d** (Fig. 11). Así, los nuevos tetragalactoclústers centrados en manosa **Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄** (**32**), y el **Man(POEG₄MTzAcNPhe-O-Gal)₄** (**33**) presentan una longitud de enlazador 17-átomo, y 23-átomo respectivamente, en lugar de longitud de enlazador 13-átomo para **Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄** **17d**. Los octagalactoclústers centrados en manosa **Man(POProTzAcN-Phe-O-Gal)₈** (**34**) y **Man[POTHME(MTzAcNPhe-O-Gal)₂]₄** (**35**) presenta dos residuos de cada hidroxilo del núcleo de manosa (Fig. 12). Para que pudiéramos evaluar la influencia de la longitud del enlazador y la influencia de la cantidad de residuos sobre la propiedad de unión. Para fines de comparación, también sintetizamos el análogo **Man(POEG₂MTzEG₃-O-Gal)₄** (**36**), donde los motivos de AcNPhe-O-Gal fueron reemplazados por los motivos EG₃-Gal (Fig. 12).

[0174] Por último, para obtener mayor conocimiento de un "efecto aromático", se sintetizó nuevos glicoclústers que exhiben motivos de galactosa en los que el O-fenilo fue sustituido por timina (T-Gal) (**37**, **38**, **39**). Estos análogos fueron diseñados, ya que pueden formar los límites de hidrógeno entre los heteroátomos de la timina y el aminoácido de la lectina que conduce a una posible afinidad mejor.

IV-A Síntesis:

[0175] Para la síntesis de los nuevos glicoclústers que exhiben motivos AcNPhe-O-Gal, la manosa en soporte sólido **7** se fosforiló ya sea con una fosforamidita de propargilo di- (**1a**) o tetra-etilenglicol (**1b**), fosforamidita de bis-pent-4-inilo (**1c**) o fosforamidita de 2,2-(bis-propargyloximetilo)propilo (**1d**). A continuación, después de la elongación de oligonucleótido y el etiquetado, se conjugaron las construcciones de alquino tetra/octa (**19a-d**) a **4d** que ofrezcan los conjugados de oligonucleótidos de tetra/octagalactocluster centrados en manosa esperados **Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄** (**32**), **Man(POEG₄MTzAcNPhe-O-Gal)₄** (**33**), **Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₈** (**34**) y **Man[POTHME(MTzAcNPhe-O-Gal)₂]₄** (**35**), respectivamente (Fig. 12). Asimismo, el tetraalquino **19a** con enlazadores de propargildietilenglicol también se conjugó con **4e** proporcionando el **Man(POEG₂MTzEG₃-O-Gal)₄** (**36**).

[0176] En cuanto a la síntesis de los glicoclústers que exhiben motivos T-Gal, el derivado de azida **4f** se preparó de acuerdo con un protocolo descrito en la literatura para la síntesis de la glucosa-timidina (Gillaizeau, I. et al., (2003) Eur. J. Org. Chem., 666-671. Para este fin 1,2,3,4, 6-penta-O-acetilo-galactosa se glicosiló con 2,4-bis-O-trimetilsililtimina proporcionando el 2',3',4',6'-tetra-o-acetilo-galactopiranos-N¹-timina **20** (T-Gal) (o 2,3,4,6-tetra-O-acetilo-N¹-timina-β-D-galactopiranosido) (figura 13). Fue alquilado con 1,4-dibromobutano en el N³ de resto de timina en presencia de carbonato de potasio y, finalmente, el átomo de bromo y fue sustituido por azida de sodio proporcionando el correspondiente derivado de N-timina-galactosa azida **4f**.

[0177] Se introdujo el derivado de azida Gal-T **4f**, en los núcleos de manosa de Cy3-oligonucleótidos preparados previamente que presentan cuatro pentinilo (**11**), cuatro propargildietilenglicilo (**19a**) o cuatro propilo de bis-propargilo-oximetilo (**19d**) que conduce a tetraclústers con motivos de **ProTzBuT-Gal** o **EG₂MTzBuT-Gal**, respectivamente, y un octagalactocluster con motivo de **THMENTzBuTGal** que ofrezcan los conjugados de oligonucleótidos de tetra/octagalactocluster centrados en manosa esperados **Man(POProTzBuT-Gal)₄** (**37**), **Man(POEG₂MTzBuT-Gal)₄** (**38**) y **Man[POTHME(MTzBuT-Gal)₂]₄** (**39**), (Fig. 12).

IV-B Protocolo de ensayo biológico:

Prueba 1:

[0178] La unión de PA-IL de los nueve glicoclústers resultantes se determinó por DDI-micromatriz como se describió anteriormente (véase II-B).

Prueba 2:

[0179] Para una mejor comprensión de las propiedades de unión, que mide el valor Cl_{50Lac} de los glicoclústers (resultados presentados en la Tabla 1, Entradas 15-18).

IV-C Resultados de prueba:

[0180] Los resultados de la prueba 1 se ilustran en la Fig. 14: El aumento de la longitud del enlazador de Pro a EG₂M condujo a un aumento de afinidad con motivos tanto **TzEG₃-O-Gal** como **TzAcNPhe-O-Gal** con siempre mejor afinidad por el glicocluster con el motivo aromático (**TzAcNPhe-O-Gal**). Por el contrario, el aumento de la longitud del enlazador de EG₂M a EG₄M condujo a un glicocluster con una señal fluorescente más baja lo que sugiere que

los enlazadores con demasiada flexibilidad y demasiada longitud son perjudiciales para la unión a PA-IL.

[0181] Para los clusters **Man-(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄** o **17d** vs **Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₈** **34**. La señal fluorescente del octacluster fue similar a la del tetracluster con enlazadores de EG₂M. En contraste, el otro octacluster **Man[POTHME(MTzAcNPhe-O-Gal)₂]₄** **35** mostró una señal fluorescente más baja que los dos mejores tetraclusters. En relación con los galactoclusters hechos de Gal-T, se observó una señal fluorescente 635 sobre 45 a.u. muy similar a la del control negativo. El aumento del número de residuos de galactósido a 8 no dio ninguna mejora de la unión. Las razones para la inhibición de la unión a PA-IL para los clústeres de galactósido de timina pueden estar relacionadas con consideraciones de impedimento estérico ya que la timina está conectada directamente a la C1 de galactopiranososa. Este hallazgo es similar a la conclusión de Moni *et al*, donde la unión de PA-IL a clústeres de galactosa fue afectada debido a la proximidad del anillo de triazol. De hecho, en este estudio, el anillo de triazol fue unido directamente al carbono anomérico de C-galactósido (Moni, L. et al., (2009) ChemBioChem 10, 1369-1378).

[0182] El octagalactocluster **Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₈** **34** exhibió la unión más alta de todas las construcciones reportadas hasta ahora mostrando un mejor efecto de clúster debido al mayor número de motivo de galactosa.

Prueba 2:

[0183] Como se ilustra en la Tabla 1, las entradas 15-18, la potencia de cada galactocluster se calculó de acuerdo a mono-EG₃-O-galactosa y galactosa mono-aromática. Los valores Cl_{50Lac} confirmaron las tendencias observadas en los escaneos de fluorescencia directa con una mejor unión de motivos de **TzEG₃-O-Gal** a **TzAcNPhe-O-Gal** (entrada 15 vs entrada 16), una mejor unión debido a la elongación del enlazador de Pro a EG₂M (entrada 8 vs entrada 15 y entrada 9 vs entrada 16) y la unión más alta para el octaglicocluster con motivos **ProTzAcNPhe-O-Gal** (Cl_{50Lac} = 6803 entrada 17). El segundo octagalactocluster visualiza un valor inferior Cl_{50Lac} de 1,807 μM (entrada 18) que muestra que la disposición espacial tiene un fuerte efecto sobre la unión.

V- Síntesis y ensayo de Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ **G1** y (Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄) **G2** en solución:

[0184] Para los estudios biofísicos y biológicos, los glicoclusters principales, **G1** y **G2**, así como el **Man(POProTzEG₃Gal)₄** **G3** como molécula que contiene no aromático, correspondiente a los galactomiméticos sin la etiqueta de ADN, se sintetizaron en la técnica de solución escala de ~ 100 mg (Fig.15). Sus propiedades contra PA-IL se evaluaron usando el ensayo inhibidor de hemaglutinación (HIA), ensayo de lectina enlazado a enzimas (ELLA), calorimetría isotérmica (ITC), resonancia de plasmon de superficie (SPR) y glicomatriz de DDI. Para el más potente de ellos, también se determinó su inhibición de la adhesión PA en la línea celular epitelial NCI-H292 (ATCC CRL 1848).

V-A Síntesis:

Síntesis de glicocluster **G1** (Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄), **G2** (Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄) y (Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄) **G3**

[0185] **1-O-metilo-α-D-manosa**: Una solución de α-D-manosa (2,0 g) en metanol (30 mL) se hirvió a reflujo durante 27 h en presencia de resina DOWEX-50W X8, forma H⁺ (4,0 g). Después de la filtración y concentración a sequedad, el producto bruto se recristalizó en etanol, para dar 1-O-metilo-α-D-manosa (1,58 g, 73%) como un sólido blanco. Datos analíticos en acuerdo con datos de la literatura (Cadotte, J.E. et al., (1952) J. Am. Chem. Soc.74, 1501-1504).

Procedimiento general para fosforilación:

[0186] Una solución de 1-O-metilo-α-D-manosa (50 mg, 0,26 mmol, 1 eq) en dimetilformamida/acetronitrilo anhidro (1: 1,5, v/v) se agitó durante 1h30 con tamiz molecular (3 Å). A continuación, la fosforamida de alquino **46a-b** (1,30 mmol, 5 eq) se añadió y una solución de tetrazol (0,4 M en CH₃CN anhidro, 6,4 mL, 2,60 mmol, 10 eq). La mezcla se agitó a 30°C durante 2 h y la reacción se detuvo con H₂O. Se añadió resina de A₂₆ (IO₄⁻) (1,0 g, 2,50 mmol, 9,6 eq) y la mezcla se agitó durante 2 h. Después de la filtración de la resina y la adición de diclorometano (40 mL), la reacción se lavó con una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (60 mL) y salmuera (60 mL). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para proporcionar los derivados de manosa de tetraalquino **47a-b** deseados.

47a: Se obtuvo como un aceite de color amarillo pálido (208 mg, 81%). ¹H RMN (300 MHz, D₂O) δ 4,98 (d, J = 21,0 Hz, 1H, H-1), 4,87-4,57 (m, 3H, H-2, H-5, H-6), 4,37-4,12 (m, 16H, OCH₂CH₂CN, POCH₂CH₂), 3,94-3,89 (m, 1H, H-6), 3,45 (s, 4H, OCH₃, H-3), 3,40 (m, 1H, H-4), 2,88-2,78 (m, 8H, CH₂CN), 2,39-2,34 (m, 4H, CH₂CH₂CCH), 2,08-1,90 (m, 8H, POCH₂CH₂), 1,73-1,64 (m, 4H, CH₂CCH). ³¹P RMN (162 MHz, CDCl₃) δ -1,65-3,01 (m, 1P). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 115,5 (CN) 98,3 (C-1), 81,5 (OCH₂CCH), 68,5 (CH₂CCH, C-2, C-5, C-6), 65,6 (C-3, C-4), 60,9 (2s, POCH₂), 55,7 (OCH₃), 27,7 (POCH₂CH₂), 18,7 (CH₂CN), 13,1 (CH₂CH₂CCH). **MS MALDI-TOF⁺m/z**

calculado para $C_{39}H_{55}N_4O_{18}P_4$ $[M+H]^+$ = 991,76 encontró 991,86. **HR-ESI-QToF MS** (modo positivo): calculado m/z para $C_{39}H_{55}N_4O_{18}P_4$ $[M+H]^+$ = 991,2465 encontrado 991,2462.

47b Obtenido como un aceite incoloro (279 mg, 87%). 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,93 (d, J = 24,2 Hz, 1H, H-1), 4,84-4,79 (m, 1H, H-6), 4,73-4,59 (m, 2H, H-2, H-5), 4,37-4,18 (m, 16H, $POCH_2CH_2CN$, $POCH_2CH_2$), 4,17-4,12 (m, 8H, OCH_2CCH), 3,86-3,80 (m, 1H, H-6), 3,68 (m, 8H, $POCH_2CH_2$), 3,63 (s, 17H, OCH_2CH_2O , H-3), 3,61-3,57 (m, 1H, H-4), 3,38 (s, 3H, OCH_3), 2,82-2,74 (m, 8H, CH_2CN), 2,46 (m, 4H, OCH_2CCH). ^{31}P RMN (162 MHz, $CDCl_3$) δ -1,67-- 3,11 (m, 1P). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ 117,1 (CN) 98,3 (C-1), 79,6 (OCH_2CCH), 74,9 (CH_2CCH , C-2, C-5, C-6), 70,2-69,7 (2m, $POCH_2CH_2$, C-3, C-4), 69,1 (OCH_2CH_2O), 67,8-62,3 (5m, $POCH_2$), 58,3 (OCH_2CCH), 55,7 (OCH_3), 19,5 (CH_2CN). **MALDI-TOF⁺ m/z** calculado para $C_{47}H_{71}N_4O_{26}P_4$ $[M+H]^+$ = 1231,96 encontró 1231. **19. HR-ESI-QToF MS** (modo positivo): calculado m/z para $C_{47}H_{71}N_4O_{26}P_4$ $[M+H]^+$ = 1231,3297 conocer 1231.3307.

Procedimiento general para la cicloadición 1,3-dipolar y la desacetilación de hidratos de carbono:

[0187] Los compuestos alquino-funcionalizados (**47a** o **47b**) 1,0 eq y el derivado de azido-tetraacetilgalactosa **48a** (Bouillon, C. et al., (2006) J. Org. Chem.71, 4700-4702) o **48b** (4 a 4,8 eq) se disolvieron en dioxano con tampón de acetato de trietilamonio (175 mL, 0,1 M, pH 7,7) y cobre de nanopolvo (2 mg). La mezcla resultante se agitó durante la noche a 70°C. Entonces la reacción se diluyó en CH_2Cl_2 (15 mL), y se lavó con salmuera (3 x 15 mL). La capa orgánica se secó (Na_2SO_4), se filtró y se concentró a sequedad. El producto resultante se disolvió en acetona (5 ml) y se añadió solución concentrada de amoniaco (30%) (20 mL). La mezcla se agitó 1 hora a temperatura ambiente. Después de la evaporación, el producto bruto se disolvió en agua MilliQ, y la solución se pasó a través de una columna rellena con resina DOWEX 50W-X8, forma de Na^+ . Después de la concentración, el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida C_{18} (40 g) (tampón de acetato eau/ CH_3CN /trietilamonio 0,1 M pH 7,7, 97/0/3 a 47/50/3) para proporcionar los glicoconjugados deseados.

Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ G1: Se obtuvo como un aceite amarillo pálido (141 mg, 64%): **47a** (100 mg, 0,1 mmol, 1 eq), **48a** (211 mg, 0,4 mmol, 4 eq), dioxano (2,0 mL). 1H RMN (300 MHz, D_2O) δ 7,82-7,72 (4s, 4H, H-Triaz), 7,34-7,27 (m, 8H, H-Ar), 7,04-6,99 (m, 8H, H-Ar), 5,30-5,19 (4s, 8H, C(O) CH_2N -Triaz), 4,92-4,89 (m, 5H, H-1 gal, H-1 man), 4,86-4,84 (m, 2H, H-2 man, H-3 man), 4,74-4,72 (m, 2H, H-4 man, H-5 man), 3,95-3,93 (m, 10H, H-6 man, OCH_2CH_2), 3,85-3,68 (m, 24H, H-2 gal, H-3 gal, H-4 gal, H-5 gal, H-6 gal), 3,30 (s, 3H, OCH_3), 2,75-2,67 (m, 8H, CH_2CH_2C -triaz), 1,95-1,81 (m, 8H, $CH_2CH_2CH_2$) ppm. ^{31}P RMN (121 MHz, D_2O) δ 0,86 (s), -0,262 ppm (t). ^{13}C RMN (100 MHz, D_2O) δ 165,3 (C = O), 153,6 (C_q-ar), 147,2 (C_q-Triaz), 130,8 (C_q-ar), 124,1 (CH-Triaz), 122,5 (C-ar), 116,4 (C-ar), 100,4 (C-1 gal), 98,3 (C-1 man), 74,78, 72,0, 70,0 (3s, 3C, C-2 gal, C-3 gal, C-4 gal, C-5 gal), 67,9 (OCH_2CH_2), 64,7, 64,1 (C-2 man, C-3 man, C-4 man, C-5 man, C-6 man), 60,1 (C₆ gal), 51,3 (C(O) CH_2N -Triaz, OCH_3), 29,5 ($CH_2CH_2CH_2$), 28,8 (CH_2C -Triaz). HPLC_{tR} = 11,25 min. **MS MALDI-TOF-m/z** calculado para $C_{83}H_{113}N_{16}O_{46}P_4$ $[M-H]^-$ = 2194,76 encontrado 2194,84 **HR-ESI-QToF MS** (modo positivo): m/z calculado para $C_{83}H_{116}N_{16}O_{46}P_4$ $[M+2H]^{++}$ = 1098,3090 encontrado 1098,3064.

Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ G2: Se obtuvo como un aceite pálido (190 mg, 95%): **47b** (100 mg, 0,082 mmol, 1 eq), **48a** (204 mg, 0,4 mmol, 4,8 eq), dioxano (2,8 mL). 1H RMN (600 MHz, D_2O) δ 8,19-8,15 (m, 4H, H-Triaz), 7,46-7,44 (m, 8H, H-Ar), 7,17-7,15 (m, 8H, H-Ar), 5,45-5,43 (m, 8H, C(O) CH_2N -Triaz), 5,05-5,03 (m, 4H, H-1 gal), 4,99 (m, 1H, H-1 man), 4,74 (d, J = 2,4 Hz, 8H, OCH_2C -Triaz), 4,45-4,32 (m, 3H, H-2 man, H-3 man, H-5 man), 4,17-4 0,10 (m, 6H, un $POCH_2CH_2$), 4,06 (d, J = 2,4 Hz, 1H, H-4 man), 4,04 (d, J = 2,0 Hz, 4H, H-4 gal), 3,89-3,74 (m, 50H, H-2 gal, H-3 gal, H-5 gal, H-6 gal, 1/4 $POCH_2CH_2$, OCH_2CH_2), 3,69-3,67 (m, 2H, H-6 man), 3,39 (s, 3H, OCH_3) ppm. ^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) δ 166,1 (C = O), 154,4 (C_q-ar), 144,4 (C_q-Triaz), 131,6 (C_q-ar), 126,7 (CH-Triaz), 123,4 (C-ar), 117,2 (C-ar), 101,1 (C-1 gal), 98,8 (C-1 man), 75,5, 72,7, 70,7 (3s, 3C, C-2 gal, C-3 gal, C-5 gal), 70,3, 69,7, (2m, 5C, C- 2 man, C-3 man, C-4 man, C-5 man, C-6 man), 69,1 (C-4 gal), 68,6 (OCH_2CH_2), 64,9 ($POCH_2CH_2$), 63,2 (OCH_2C - Triaz), 60,9 (C₆ gal), 52,6 (C(O) CH_2N -Triaz, OCH_3). HPLC_{tR} = 14,32 min. **MS MALDI-TOF-m/z** calculado para $C_{91}H_{129}N_{16}O_{54}P_4$ $[MH]^-$: 2431,95 2432,18 encontrado. **HR-ESI-QToF MS** (modo positivo): calculado m/z para $C_{91}H_{132}N_{16}O_{54}P_4$ $[M+2H]^{++}$ = 1218,3513 encontraron 1218,3436.

Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄ G3: Se obtuvo como un aceite amarillo pálido (66 mg, 62%): **47a** (50 mg, 0,050 mmol, 1 eq.), **48b** (101 mg, 0,200 mmol, 4 eq.), dioxano (1,5 mL). 1H RMN (600 MHz, D_2O) δ 8,00-7,92 (m, 4H, H-Triaz), 5,0 1 (m, 1H, H-1 man), 4,62-4,64 (m, 8H, CH_2N -Triaz), 4,48 (dd, J = 1,8 Hz, J = 7,8 Hz, 3H, H-2 man, H-3 man, H-5 man), 4,45 (d, J = 7,8 Hz, 4H, H-1 gal), 04/14 a 04/12 (m, 4H, 1/2 GalOCH₂), 3,98 (m, 9H, H-6 man, OCH_2CH_2N -Triaz), 3,91-3,88 (m, 5H, H-6 man, H-4 gal), 3,85-3,77 (m, 20H, 1/2 GalOCH₂, $POCH_2CH_2$, H-6 gal), 3,76-3,67 (m, 32H, H-2 gal, H-5 gal, OCH_2CH_2O), 3,61-3,56 (m, 5H, H-3 gal, H-4 man), 3,47 (s, 3H, OCH_3), 2,91-2,78 (m, 8H, CH_2CH_2C -Triaz), 1,97 (CH_2CH_2C -Triaz). ^{13}C RMN (150 MHz, D_2O) 103,7 (C-1 gal, C-1 man), 76,0 ($POCH_2CH_2$), 75,9, 73,6, 71,6 (3s, 3C, C-2 gal, C-3 gal, C-5 gal), 70,6, 70,5, 70,4, 70,3, 70,2 (C-2 man, C-3 man, C-4 man, C-5 man, C-6 man, OCH_2CH_2O), 70,0 (OCH_2CH_2N -Triaz), 69,5 (C-4 gal, GalOCH₂), 61.8 (d, C-6 gal)), 51,0 (CH_2N -Triaz), 44,0 (CH_2CH_2C -Triaz), 30,4 (CH_2CH_2C -Triaz). **MS MALDI-TOF- m/z** calculado para $C_{75}H_{133}N_{12}O_{50}P_4$ $[MH]^-$ = 2126,80 2126,54 encontrado. **HR-ESI-QToF MS** (modo positivo): calculado m/z para $C_{75}H_{136}N_{12}O_{50}P_4$ $[M+2H]^{++}$ = 1064,3709 encontrado 1064,3835.

V-B Pruebas biológicas:

[0188] La unión de PA-IL a galactoclústers se sondeó como la capacidad de los grupos de inhibir la unión de PA-IL a eritrocitos de conejo (ensayo de inhibición de la hemaglutinación, HIA) o a poli(acrilamida) modificada de galactosilo unida a la superficie, ya sea por resonancia de plasmón superficial (SPR), ensayo enlazado a enzima (ELLA). La inhibición se midió con ensayos competitivos. En experimentos HIA, la concentración inhibitoria mínima (MIC) es la concentración mínima de galactocluster que inhiben la hemaglutinación de eritrocitos de conejo en presencia de la lectina. Cuanto menor sea el MIC más alta será la unión del galactocluster a la lectina. SPR y ELLA se utilizaron para determinar el valor de Cl_{50} . La Cl_{50} es la concentración de galactocluster que inhibe el 50% de la unión de PA-IL a gal-PAA unida a superficie. Cuanto menor sea el valor de Cl_{50} como se determinó por SPR ($^{SPR}Cl_{50}$) y ELLA ($^{ELLA}Cl_{50}$), mayor será la unión de PA-IL al galactocluster.

[0189] 1-O-Metilo- β -D-galactósido (GalOMe) y 1-O-*p*-nitrofenilo- β -D-galactósido (GalOArNO₂) se utilizaron como ligandos de referencia. Estos dos ligandos de referencia permiten separar el impacto de la aglicona de fenilo en la unión y el efecto de grupo glicósido. β_{Me} y β_{Ar} son las potencias relativas de los galactoclústers con referencia a GalOMe y ta GalOArNO₂ respectivamente.

[0190] Ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HIA): Ensayos de inhibición de la hemaglutinación (HIA) se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos en forma de U. Eritrocitos de conejo fueron adquiridos de BioMérieux y se usaron sin lavado adicional. Eritrocitos se diluyeron a una solución de 8% en NaCl (100 mM). Soluciones de 3 μ M de PA-IL se prepararon en 20 mM de TRIS-HCl (TRIS = tris (hidroximetilo) aminometano), NaCl 100 mM, y CaCl₂ 100 mM. La unidad de la hemaglutinación (HU) se obtuvo primero mediante la adición de la solución de eritrocitos 4% (50 μ L) a partes alícuotas (50 μ L) de diluciones de lectina secuenciales (dos veces). La mezcla se incubó a 25°C durante 30 min. El HU se midió como concentración mínima de lectina requerida para observar la hemaglutinación. Para los siguientes ensayos de inhibición de lectina, se utilizaron concentraciones de lectina de 4 HU. Para PA-IL, se encontró que esta concentración era de 3 μ M. Ensayos de inhibición subsiguientes se llevaron a cabo por la adición de solución de lectina (25 μ L, a la concentración requerida) a diluciones secuenciales (50 μ L) de glicoclústers, moléculas de monómero, y controles. Estas soluciones se incubaron a 37°C durante 30 min, a continuación, 8% se añadió una solución de eritrocitos (25 μ L), seguido de una incubación adicional a 37°C durante 1 h. Se determinó la concentración inhibitoria mínima para cada molécula para cada duplicado.

[0191] Determinación de la concentración de lectina usando ELLA: Placas de microtitulación de 96 pocillos (NuncMaxisorb) se recubrieron con α -PAA-Gal (PAA = poli(acrilamida) para PA-IL (Lectinity Holding, Inc.): 100 μ L de 5 μ g.mL⁻¹ en tampón de carbonato, pH 9,6 durante 1 hora a 37°C, a continuación, el bloqueo a 37°C durante 1 h con 100 μ L por pocillo de 3% (w/v) de albúmina de suero bovino (BSA) en solución de tampón de fosfato (PBS). Se diluyeron soluciones de lectina (75 μ L) (1: 2) a partir de 30 μ g.mL⁻¹. Después de 1 h de incubación a 37°C y tres lavados con T-PBS (PBS que contenía 0,05% de Tween 20), conjugado de (HRP)-estreptavidina de peroxidasa de rábano picante (100 μ L; dilución 2: 8000; Boehringer Mannheim) se añadió y la izquierda durante 1 h a 37°C. La coloración se desarrolló mediante el uso de 100 μ L por pocillo de 0,05% de tampón de fosfato/citrato que contenía o-fenilendiaminadihidrocloruro (0,4 mg.mL⁻¹) y peróxido de hidrógeno de urea (0,4 mg.mL⁻¹) (kit OPD, Sigma-Aldrich) para 15 min y se detuvo con ácido sulfúrico (50 μ L, 30%). Entonces absorbancia se leyó a 490 nm usando un lector de placas de microtitulación (BioRad 680). La concentración de lectinas biotiniladas se determinó representando gráficamente la absorbancia relativa frente a la concentración de lectina. La concentración que dio lugar a la mayor respuesta en la zona lineal fue seleccionada como la concentración de lectina estándar para los experimentos de inhibición subsiguientes. Las concentraciones finales fueron 0,5 μ g.mL⁻¹ para PA-IL.

[0192] Microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC): PA-IL recombinante liofilizada se disolvió en tampón (0,1 M TRIS HCl, 6 μ M CaCl₂, pH 7,5) y se desgasificó. La concentración de proteínas (entre 50 y 270 μ M, dependiendo de la afinidad de ligando) se comprobó mediante la medición de la densidad óptica mediante el uso de un coeficiente de extinción molar teórico de 28000. Ligandos de carbohidratos se disolvieron directamente en el mismo tampón, se desgasificaron, y se colocaron en la jeringa de inyección (concentración: 175 μ M). ITC se realizó con un microcalorímetro VP-ITC de MicroCal Incorporated. PA-IL se colocó en la célula de muestra de 1,4478 mL, a 25°C. La titulación se realizó con inyecciones de 10 μ L de ligandos de carbohidratos cada 300 s. Los datos se ajustaron usando el "modelo de un sitio" usando el software MicroCal Origin 7 de acuerdo con procedimientos estándar. Datos ajustados dieron la estequiometría (n), la constante de asociación (K_a), y la entalpía de unión (Δ H). Otros parámetros termodinámicos (es decir, los cambios en la energía libre Δ G y la entropía Δ S) 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. Dos o tres titulaciones independientes se realizaron para cada ligando probado.

[0193] Resonancia de plasmón superficial (SPR): Los experimentos de inhibición de SPR se realizaron utilizando un instrumento Biacore 3000 a 25°C. Las mediciones se llevaron a cabo en dos canales con dos azúcares inmovilizados: α -L-fucosa (canal 1) y α -D-galactosa (canal 2). La inmovilización de los azúcares se llevó a cabo a 25°C usando tampón de ejecución (HBS) a 5: μ L.min⁻¹. La inmovilización en cada canal (CM5 Chip) se llevó a cabo independientemente de la siguiente manera. En primer lugar, el canal se activó mediante la inyección de una mezcla fresca de EDC/NHS (35 μ L, 420 s). A continuación una solución de estreptavidina (100 μ g.mL⁻¹ en tampón de 0,1 mM AcONa a pH 5) se inyectó (50 μ L, 600 s). Las especies reactivas restantes se inactivaron mediante la inyección

de etanolamina (1 M, 35 μL , 420 s) en la solución. Finalmente, una solución del azúcar de poliacrilamida biotilado deseado (lectinity, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) se revistió sobre la superficie (50 μL , 600 s) a través de la interacción de estreptavidina-biotina. Este procedimiento dio lugar a 804 RU (unidades de resonancia) (fucósido) y 796 RU (galactósido) de azúcares inmovilizados en los canales 1 y 2, respectivamente. Los experimentos de inhibición se realizaron con el canal galactosilado 2 y gráficos representan datos restados (canal 2-canal 1). El tampón de ejecución para los experimentos de PA-IL fue HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 10 mM, Tween P20 0,005%, pH 7,4. Los estudios de inhibición consistieron de la inyección (150 μL , 10: $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, disociación de 120 s) de las mezclas incubadas (> 1 h, TA) de PAIL (5 μM) y diversas concentraciones de inhibidor (diluciones dobles en cascada). Para cada ensayo de inhibición, se inyectó PA-IL (5 μM) sin inhibidor para observar la adhesión completa de la lectina sobre la superficie recubierta de azúcar (0% de inhibición). El chip CM5 estaba completamente regenerado por inyecciones sucesivas de D-galactosa (2 x 30 μL , 100 mm en tampón de ejecución). La unión se midió como RU en el tiempo después de la sustracción en blanco, y los datos fueron luego evaluados utilizando la versión 4.1 de software de BIAevaluación. Para la evaluación de Cl_{50} , la respuesta (R_{eq} -ajustada) se consideró la cantidad de lectina unida a la superficie de hidratos de carbono recubierta en el 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 software Origen 7.0 (OriginLab Corp.), y los valores de Cl_{50} se extrajeron de ajuste sigmoidal de la curva de inhibición.

Micromatrices

Fabricación de micromatrices

[0194] Porteojetos de borosilicato microestructurados (Nexterion Glass D, Schott Alemania) fueron fabricados utilizando fotolitografía estándar y el proceso de grabado en húmedo se detalla en otro lugar (Mazurczyk, R. et al, (2008) Sens Actuators, B128, 552-559; Vieillard, J. et al, (2007) J. Chromatogr B845, 218-225; Vieillard, J. et al, (2008) Microelectron Eng.85, 465-469). Los porteojetos microestructurados presentaron 40 pocillos cuadrados (anchura de 3 mm, 60 ± 1 μm de profundidad).

[0195] Los porteojetos fabricados resultantes se funcionalizan de acuerdo con el protocolo reportado en Dugas, V., y Chevalier, Y. (2003) J. Colloid Interface Sci.264, 354-361; Dugas, V. et al, (2004) Sens Actuadores, B101, 112-121.; Phaner-Goutorbe, M. et al., (2011) Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications 31, 384-390. Los porteojetos se lavaron en piraña recién preparada enjuagada en agua DI y se secó bajo nitrógeno seco a 150°C durante 2 h. Después de retorno a temperatura ambiente, terc-butilo-11-(dimetilamino)silundecanoato en pentano seco se dejó reaccionar con superficies de deslizamiento de vidrio (TA). Después de la evaporación de pentano, los porteojetos se calentaron a 150°C durante la noche y finalmente se lavaron en THF y agua. La función de éster de terc-butilo se convirtió en éster de NHS. Alternativamente, los porteojetos se pueden funcionalizar en fase gas. Los procedimientos de lavado son similares.

[0196] Oligonucleótidos modificados por amino se compraron de Eurogentec. Manchado de 0,3 nL de los diversos oligonucleótidos a 25 μM en PBS 10X (pH 8,5) en la parte inferior de cada reactor (64 puntos por pocillo). La reacción de sustitución se realizó durante la noche a temperatura ambiente en una atmósfera saturada de agua y, a continuación, se dejó que el agua lentamente se evaporara. Lavado de los porteojetos se realizó con SDS (0,1%) a 70°C durante 30 min y brevemente agua desionizada.

[0197] Todos los porteojetos se bloquearon con solución de BSA al 4% en PBS 1X (pH 7,4, 37°C, 2 h) y se lavaron sucesivamente en PBS-Tween 20 (0,05%), PBS 1X (pH 7,4) y agua DI antes de secarse por centrifugación.

[0198] Etiquetado de lectina: Etiquetado de Alexa647 de lectina de PA-IL: lectina de PA-IL fue marcada con Alexa Fluor® 647 Microscale Protein Labeling Kit (A30009) a partir de Invitrogen. Concentración etiquetada con lectina y la relación de colorante a lectina se estimaron mediante lectura de densidad óptica con un espectrómetro de doble haz (Safas) equipado con una microcubeta (Hellma, 5 μl , 1 mm de camino óptico). La absorbancia a 281 nm y 650 nm se midió. La concentración de PA-IL se estimó en 11,58 μM con un grado de etiquetado de 0,51 colorantes para PA-IL tetramérica.

[0199] Reconocimiento biológico "en solución": Las metodologías para determinación de K_d y valor Cl_{50} se han informado anteriormente (Gerland, B. et al, (2012) Bioconjugate Chem.23, 1534-1547; Zhang, J. et al., (2009) Chem Comm, 6795-6797; Zhang, J. et al., (2009) Biosens Bioelectron.24, 2515-2521).

[0200] Determinación de K_d : **G1** Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ mimético o **32** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ (1 μM de concentración final) se diluyeron en PBS-0.02% de solución de BSA Tween20- 2%. Se añadió CaCl_2 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concentración final). PA-IL en la concentración final deseada entonces se añadió. 2 μL de cada solución (correspondiente a la concentración PA-IL deseada) se vertieron en los pocillos correspondientes. El porteojetos se incubó (3H, 37°C) en una cámara saturada de vapor de agua y finalmente se lavó en PBS-Tween 20 (0,02%, 5 minutos, 4°C) y se secó. Un escáner de micromatriz, paquete de software GenePix 4100A (Axon Instruments; λ_{ex} 532/635 nm y λ_{em} 575/670 nm) se utilizó para obtener imágenes de fluorescencia de fluoróforo (Cy3 y Alexa 647). El promedio de la señal de fluorescencia media se calculó a partir de ocho puntos. Las isothermas de Langmuir

resultantes se linealizaron usando gráfico de Scatchard para dar los valores de K_d en el intercepto de ordenato.

Prueba de adherencias en las células

5 **[0201] Cultivo bacteriano y celular.** La línea de células epiteliales NCI-H292 (ATCC CRL 1848), procedente de un carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano, se mantuvo en matraces de cultivo de tejido de 25-cm² (Nunc) en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de ternera (Boehringer) sin antibióticos. Este medio se denomina en lo sucesivo medio de mantenimiento. Las células se pasaron dos veces por semana con una relación de división de 1: 6. Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. El recuento de células y la viabilidad se determinó por microscopía de luz después de la tinción con azul de tripano. La cepa de referencia PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* se cultivó en medio Luria-Bertani a 37°C durante 16 h. Las células se lavaron dos veces en solución de salina tamponada con fosfato (DPBS) de Dulbecco y se diluyeron para obtener una densidad celular de aproximadamente 5,10⁶ CFU/mL.

15 **[0202] Ensayos de la adhesión bacteriana.** Para los ensayos de adhesión, las células NCI-H292 se cultivaron a monocapas confluentes (5,10⁵ células por pocillo) en placas de microtitulación de 24 pocillos que contienen 1 mL de medio de mantenimiento. Las placas se lavaron dos veces con 1 mL de solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco (DPBS) (137 mM de NaCl, 8 mM de Na₂PO₄, 1,5 mM de KH₂PO₄, 2,6 mM de KCl), pre-calentado a 37°C y unión no específica se bloquearon por incubación durante 1 h a 37°C con 0,5% (peso/volumen) de albúmina de suero bovino en DPBS. Antes de la interacción con las bacterias, las preparaciones se lavaron de nuevo dos veces con DPBS precalentadas. 100 µL de suspensión bacteriana se añadió a continuación a cada pocillo para obtener una MOI de 1 (5,10⁵ CFU/mL/5,10⁵ células). Las placas se incubaron a continuación 2 horas a 37°C. Las bacterias no adherentes se eliminaron mediante el lavado de las preparaciones cinco veces con DPBS. Las células se lisaron por incubación durante 30 min a 37°C con 0,2% (v/v) de solución de Triton X-100. Las diluciones en serie se prepararon utilizando DPBS, y partes alícuotas de 100 µL se sembraron por triplicado en placas de LB y se incubaron a 37°C durante 24 h.

25 **[0203]** Para la inhibición de la adhesión, sólo el galactomimético **G1** (Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄) se ensayó. Galactomimético **G1** se añadió a los pocillos a una concentración final que varía de 0 a 2 mM.

30

Resultados V-C

35 **[0204]** En el ensayo de HIA, **G2** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ representó la MIC más baja de los miméticos y Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄ **G3** representó la más alta. **G1** Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ mimético tenía un intermedio MIC (Tabla 3). Las potencias relativas de miméticos de **G1**, **G2** y **G3** en relación con GalOMe son 128, 513 y 4, respectivamente. Por lo tanto, el incremento para Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄ **G3** sigue estando limitado. De hecho, la MIC por residuos de galactosa es la misma. En contraste, los miméticos de **G1** y **G2** exhiben un fuerte aumento de la potencia con un marcado beneficio para **G2** que lleva el enlazador más largo entre el residuo de galactosa y manosa del núcleo. Las potencias calculadas con respecto con Gal-OArNO₂ de 16 y 65 para los miméticos **G1** y **G2**, respectivamente, mostraron claramente el efecto glicocluster con un aumento por residuo de 4 y 16 respectivamente. Por lo tanto, los aumentos de potencia no sólo están relacionados con la presencia del anillo aromático pero también a un efecto multivalente.

40

45 Tabla 3: Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (HIA). MIC significa concentración inhibitoria mínima. Potencia (β): β_{Me} o β_{Ar} corresponde a la relación de la MIC de Gal-OMe o Gal-OArNO₂ sobre la MIC de la molécula considerada.

45

Ligando	Valencia	MIC (mM)	β_{Me}	β_{Ar}
Gal-OMe	1	16	1,0	0,13
Gal-ArNO ₂	1	2,0	8,0	1,0
Man(POProTzAcNPhe-O-Gal) G1	4	0,125	128	16
Man(POEG ₂ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄ G2	4	0,031	516	65
Man(POProTzEG ₃ -O-Gal) ₄ G3	4	4,0	4,0	0,5

50

55

En el ^{ELLA}Cl₅₀ y ^{SPR}Cl₅₀, la potencia de Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄ es ligeramente mejor que la de Gal-Ar por el contrario a HIA (Tabla 4). Esto sugiere que, de hecho, las potencias de las dos moléculas son de hecho similares. Tanto ^{ELLA}Cl₅₀ como ^{SPR}Cl₅₀ confirmaron que **G1** Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ y **G2** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ tenían una potencia mejorada en comparación con los ligandos monovalentes y a Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄. También se confirmó que **G2** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ era el mejor ligando. Sin embargo, el alcance de estas mejoras era dependiente de ensayo. De hecho, las potencias en relación con Gal-ArNO₂ para miméticos 1 a 3 eran 127, 550 y 1,2 para los valores de Cl₅₀ determinados por ELLA y 2,0, 7,4 y 1,7 para los valores de Cl₅₀ determinados por SPR. Por lo tanto, en el caso de ^{SPR}Cl₅₀, hay un claro efecto de grupo multivalente puede ser evidenciado. Tal discrepancia en la medida del efecto de clúster glucósido ya ha sido reportado en la literatura (Lundquist, JJ, y Toone, EJ (2002) Chem. Rev.102, 555-578).

60

65

Tabla 4: Valores de CI_{50} de ligandos galactosilados determinados por ensayo de lectina enlazado por enzima (ELLA) y por resonancia de plasmón superficial (SPR) β_{Me} es la relación entre el valor de CI_{50} de Gal-OMe sobre el valor de CI_{50} de la molécula considerada. Del mismo modo, β_{Ar} es la relación entre el valor de CI_{50} de Gal-ArNO₂ sobre el valor de CI_{50} de la molécula considerada.

Ligando	ELLA			SPR		
	CI_{50} (μ M)	β_{Me}	β_{Ar}	CI_{50} (μ M)	β_{Me}	β_{Ar}
Gal-OMe	183	1,0	0,2	49	1,0	0,14
Gal-ArNO ₂	33,0	5,5	1,0	6,7	7,3	1,0
G1 Man(POProTzAcNPhe-O-Gal) ₄	0,26	704	127	3,3	15	2,0
G2 Man(POEG ₂ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄	0,06	3050	550	0,91	54	7,4
G3 Man(POProTzEG ₃ -O-Gal) ₄	27,6	6,6	1,2	4,0	12	1,7

[0205] Las placas de microtitulación se modificaron con PAA-galactosa. Los portaobjetos se incubaron con concentraciones crecientes de ligandos galactosilados. La CI_{50} es la concentración de galactomimético que puede desplazar el 50% de la adhesión inicial de PA-IL a la superficie modificada de galactosa-PAA. Cuanto menor sea la CI_{50} como se determina, más fuerte será la unión de la molécula estudiada para PA-IL. ELLA: Esta CI_{50} se denominará en adelante $^{ELLA}CI_{50}$. SPR: Esta CI_{50} se denominará en adelante $^{SPR}CI_{50}$.

[0206] Los valores de CI_{50} de los tres miméticos anteriormente se determinaron utilizando glicomatriz de inmovilización dirigida por ADN usando **17d**, **32** y **G3** en comparación con **31** utilizada como ligando monovalente de referencia (Tabla 6) (Zhang, J. et al., (2009) Biosens. Bioelectron.24, 2515-2521;. Goudot, A. et al., (2013) Biosens Bioelectron.40 153-160). En este caso, el valor CI_{50} corresponde a la concentración de lactosa necesaria para inhibir el 50% de la interacción PA-IL con grupos unidos a la superficie. Por lo tanto, cuanto mayor sea el valor de CI_{50} , mejor será la unión. Se determinó la potencia relativa de 177, 264 y 1,8. Los presentes valores de CI_{50} determinados por ELLA están de acuerdo con los determinados por la glicomatriz con el mismo orden de magnitud entre los diferentes miméticos.

Tabla 6: Valores de CI_{50} para ADN galactomiméticos determinados por DDI-glicomatriz utilizando lactosa como inhibidor. micromatrices

Ligando	Valencia	$CI_{50}Lac$ (μ M)	β
31	1	16	1
17d	4	2826	177
32	4	4218	264
G3	4	29	1,8

Mediciones de microcalorimetría isotérmica de la interacción entre PA-IL y los tres galactoclústers **G1**, **G2**, **G3** se llevaron a cabo y se compararon con los datos obtenidos previamente con el GalOMe (Tabla 7) (Chabre, Y.M. et al., (2011) Chem. Eur. J 0,17, 6545-6562). En el caso de **G3** Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄, se midió un valor de K_d de 11 μ M correspondientes a un aumento moderado de la potencia en relación con GalOMe de 8,5 veces. La estequiometría (0,28) sugiere que los cuatro residuos de galactosa están vinculados a monómeros PA-IL. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el coste entrópico de la interacción no es compensado por la consideración entálpica que conduce a una K_d similar para tanto el **G3** Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄ multivalente como el Gal-Ar monovalente. Galactomiméticos **G1** y **G2** exhibieron un fuerte aumento de la potencia de 485 y 599 veces, respectivamente. La estequiometría de **G1** Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ o **G2** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ fueron similares (0,46 y 0,52, respectivamente), sugiriendo que dos residuos de galactosa estaban involucrados simultáneamente con monómeros PA-IL. El coste entrópico para ambas moléculas es aproximadamente 3 a 4 veces menor que el observado para **G3** Man(POProTzEG₃-O-Gal)₄. Ambas moléculas tienen contribuciones entálpicas similares y no tan diferentes de la -53 KJmol⁻¹ observada por Ceccioni et al con ligandos monovalentes aromáticos (Ceccioni, S. et al., (2012) Chem. Eur. J.18, 6250-6263). Sin embargo, sorprendentemente, a pesar de la presencia de enlazador más flexible debido al brazo de dietilenglicol, el coste entrópico de **G2** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ fue menor que el observado con **G1** Man(PO- ProTzAcNPhe-O-Gal)₄. Una razón para esto puede ser debido a la naturaleza hidrófoba del enlazador para Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ que conduce a coste entrópico de deshidratación más alto y mayor.

En paralelo, la K_d de **17d** Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ se midió en micromatriz utilizando isoterma de Langmuir que conduce a un valor de K_d de 196 nM similar a la que se mide con el CCI. Sin embargo, el valor de K_d medido de **32** Man(POEG₂MTzAcNPhe-O-Gal)₄ era 83 en el mismo rango de magnitud que el medido con el CCI.

Tabla 7: Datos de microcalorimetría de titulación para la interacción entre PA-IL y galactomiméticos **G1**, **G2**, **G3**. Valores de aK_d determinados a partir de **17d**, **32** y **C3**.

Glicoclústers	n	Kd (μM)	$-\Delta H$ (kJ/mol)	$-\Delta S$ (kJ/mol)	$-\Delta G$ (kJ/mol)	β_{Me}^a	aK_d (μM)
Gal-OMe	1	94 ^a	42,8	19,8	23	1	
Man(POProTzAcNPhe-O-Gal) ₄ G1	0,46 \pm 0,01	0,194 \pm 0,007	81,4 \pm 0,1	43	39	485	196
Man(POEG ₂ MTzAcNPhe-O-Gal) ₄ G2	0,52 \pm 0,01	0,157 \pm 0,002	78 \pm 3	39	39	599	83
Man(POProTzEG3-O-Gal) ₄ G3	0,28 \pm 0,02	11 \pm 3	134 \pm 3	105	28	8,5	nd

[0207] En el nivel celular, sólo el efecto inhibitor de adhesión de **G1** (Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄) galactomimético se evaluó como exhibió una fuerte unión a PA-IL de acuerdo con experimentos de caracterización físico-químicos. La adherencia de *P. aeruginosa* a las células de NCI-H292 se evaluó después de la incubación de 2 h con o sin el inhibidor galactomimético (Figura 18).

[0208] El número de bacterias adherentes se disminuye gradualmente con un aumento en la concentración en el medio galactomimético. No se observó inhibición significativa de la concentración por debajo de 50 μM . La Figura 18 representa el porcentaje de inhibición de adherencia de *P. aeruginosa* a las células de NCI-H₂92 como una función de concentración de **G1** (Man(POProTzPhe-O-Gal)₄) en el medio. La adhesión de Cl_{50} ($^{\text{adh}}\text{Cl}_{50}$) fue 95,25 μM como se determina gráficamente.

[0209] El ensayo de adhesión bacteriana muestra que **G1** Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄ es un inhibidor de la adhesión bacteriana. El ensayo de adhesión bacteriana valida la adhesión de PA a las células huésped puede ser inhibido por glicoclústers.

[0210] Es bien conocido que sólo una pequeña cantidad de lectinas están expuesta en la célula bacteriana (Glick y Garber et al., 1983). Sin embargo, esta pequeña cantidad es suficiente para promover la adhesión bacteriana a las células huésped epiteliales (Plotkowski et al., 1989; Laughlin et al., 2000; Chemani et al., 2009), incluso si la implicación directa de PA-IL en esta adhesión no ha sido demostrada todavía. Varios grupos de investigación ya describieron la inhibición de la adhesión de PA para alojar el tejido, disminución de la colonización de pulmón o aumento del aclaramiento pulmonar en modelos animales infectados por PA y esto consecutivamente a los tratamientos con diversos PA-IL dirigidos a galactósidos (Chemani et al., 2009; Gilboa-Garber N, 2011; Gustke et al., 2012). Creemos que los galactomiméticos dirigidos contra PA-IL representan una nueva clase de inhibidor de adhesión de PA para alojar tejido representando un futuro prometedor para prevenir la infección de PA.

[0211] Las afinidades de glicocluster **G25-G48** hacia PA-IL han sido evaluadas gracias a la glicomatriz.

[0212] Los valores de K_d esperados para los compuestos **G25-G30** son de 1 a 50 nM, preferentemente de 50 a 100 nM y para los compuestos **G31-G48**, valores de K_d son de 1 a 50 nM, preferentemente de 1 a 100 nM.

VI- Conclusiones:

[0213] La colonización de PA de tejido huésped y la formación de biopelículas dan a las bacterias una ventaja selectiva frente a la terapia con antibióticos. PA-IL es un factor de virulencia que se sospecha que está implicado en la adhesión de PA. La inhibición de PA-IL con moléculas galactosiladas multivalentes se prevé como medio para inhibir la adherencia de PA. En este documento, se evaluó la afinidad de los grupos de galactosa a PA-IL utilizando 5 técnicas diferentes. En última instancia, las cinco técnicas demostraron que **G1** (Man(POProTzAcNPhe-O-Gal)₄) galactomimético tenía una fuerte unión a PA-IL. Fue capaz de inhibir la adhesión de PA a NCI-H292 con una Cl_{50} inferior a 100 μM .

[0214] Ambas técnicas (Cl_{50} y K_d) dieron afinidades similares. Los mejores glicoclústers fueron aquellos con O-naftilo (**G21-G24**), O-bifenilo (**G17-G20**) y O-fenilo (**G1** y **G3**) exhibiendo valores de K_d de 14 a 48 nM. Glicoclústers con S-bencilo (**G13-G16**) y fosforotioato EG2 O-fenilo (**G2**) dieron menor afinidad con valores de K_d 49 a 70 nM, seguido de S-bencilo (**G13-G16**) y fosforotioato EG3 O-fenilo (**G4**) con valores de K_d entre 71 y 85 nM. Finalmente, el glicocluster con O-bencilo (**G5-G8**) muestra las afinidades más bajas con valor de K_d de 85 a 170 nM.

[0215] La invención se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas. Sin embargo, son posibles muchas variaciones dentro del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0216]

5 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) Universit   de Montpellier 1
 <120> GLYCOCLUSTERS AND THEIR PHARMACEUTICAL USE AS ANTIBACTERIALS
 <130> 35151 EP
 10 <160> 4
 <170> BiSSAP 1.2
 15 <210> 1
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignada" /nota=" Secuencia de ADN 5'->3' utilizando para plataforma de anclaje de
 25 ADN" /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 1
 gtgagcccag aggcaggg 18
 <210> 2
 30 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignada" /nota="secuencia de ADN 5'->3' utilizada para plataforma de anclaje de
 ADN" /organismo="Secuencia artificial"
 40 <400> 2
 gtggaggcac caagctt 18
 <210> 3
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 50 <223> /mol_tipo="ADN no asignada" /nota="Secuencia de ADN utilizada para plataforma de anclaje de ADN"
 /organismo="Secuencia Artificial"
 <400> 3
 ccaagcgagg tggcattt 18
 55 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..18
 <223> /mol_tipo="ADN no asignada" /nota="Secuencia de ADN utilizada para plataforma de anclaje de ADN"
 65 /organismo="Secuencia artificial"

ES 2 656 004 T3

<400> 4
gcagagagcg tgccattt 18

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

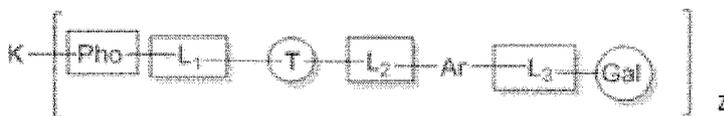
65

Reivindicaciones

1. Una molécula que responde a la fórmula (II):

5

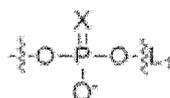
10



15 Donde

- K representa un carbohidrato seleccionado del grupo que consiste en manosa, galactosa, glucosa, arabinosa, xilosa, ribosa y lactosa
- Pho representa el grupo de fósforo

20



25

En donde X representa O o S,

Un átomo de oxígeno del grupo de fosfato está unido por un enlace covalente a L1,

30

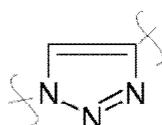
- L1 se selecciona del grupo que consiste en:
 - un di radical de alquilo de C₁-C₃ lineal o ramificado, un di radical de alquilo de C₄-C₆ ramificado o cíclico, lineal, un di radical de alquilo de C₇-C₁₂ lineal ramificado o cíclico que comprende posiblemente uno o varios puentes de éter -O-,
 - un di radical de poli(etilenglicol) comprende 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de etilenglicol,
 - un di radical de poli(propilenglicol) comprende 2, 3, 4, 5 o 6 unidades de propilenglicol,

35

- T representa un grupo de conexión seleccionado de:
 - un di-radical de triazol

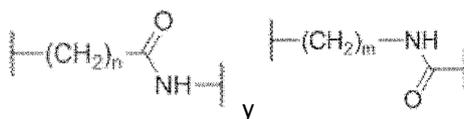
40

45



- L2 representa un brazo de enlace seleccionado del grupo que consiste en

55

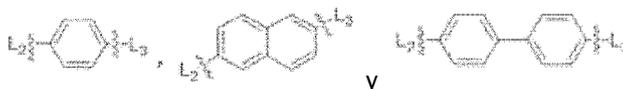


n y m representan un número entero seleccionado de 1, 2, 3, 4, o 5

60

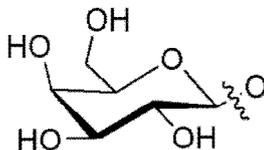
- Ar se selecciona entre el grupo constituido por fenilo, naftalenilo y 1,4-bifenilo

65



- L3 representa O, S o -CH₂
- Gal representa el radical β-D-galactopiranosilo:

5



10

- z es un entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

15 **2.** La molécula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que K representa la manosa bajo la forma de D-manopiranosilo.

3. La molécula de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que L1 representa un grupo Pro (1,3-n-propilo), EG2M (metileno de dietilenglicol), EG3M (metileno de trietilenglicol), EG4M (metileno de tetraetilenglicol).

20

4. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que Ar es el grupo de fenilo.

5. La molécula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que z es 3 o 4.

25 **6.** La molécula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, seleccionada del grupo que consiste en:



30



35



40



45



50



55



60

en el que Man representa manosa,

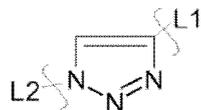
Glc representa glucosa,

pro representa 1,3-n-propilo,

THME representa tris-(hidroximetil)etano, Tz representa un di-radical de triazol

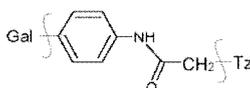
65

5



10 PO representa un enlace de fosfato,
PS representa un enlace de tionofosfato,
EG2 representa dietilenglicol,
EG3 representa trietilenglicol,
AcNPhe representa acetamidofenilo,

15



20 M representa metileno,
-O-Gal representa galactopiranosilo,
-S-Gal representa 1-tiogalactopiranosilo,
-CH₂-O-Gal representa 1-metilenegalactopiranosilo,
-CH₂-S-Gal representa 1-metilenetiogalactopiranosilo.

25

7. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30

8. La composición farmacéutica según la reivindicación 7, formulada para ser inhalada o instilada en el tracto respiratorio.

35

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 7 o la reivindicación 8, que comprende además al menos uno o más otros agentes antibacterianos o uno o más otros agentes de antivirulencia o uno o más fármacos de refuerzo de la inmunidad innata de huesped.

40

10. La composición farmacéutica según cualquier de las reivindicaciones 7 a 9 para uso para la prevención, retraso, atenuación y tratamiento terapéutico de infecciones debidas a patógenos microbianos, en particular los patógenos bacterianos.

45

11. La composición farmacéutica según la reivindicación 10, para uso en tratar, retrasar, atenuar o prevenir infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*.

50

12. Una composición que comprende al menos un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para uso para el material capaz de capturar *Pseudomonas aeruginosa*.

55

60

65

70

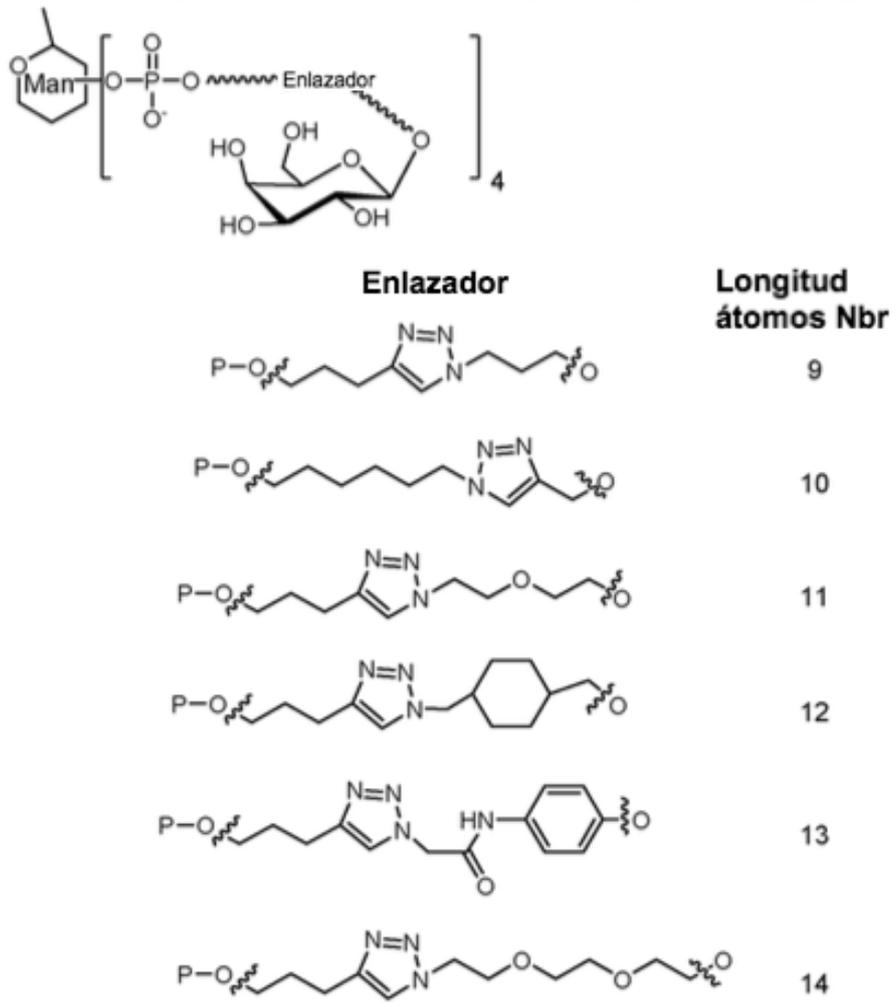


Figura 1

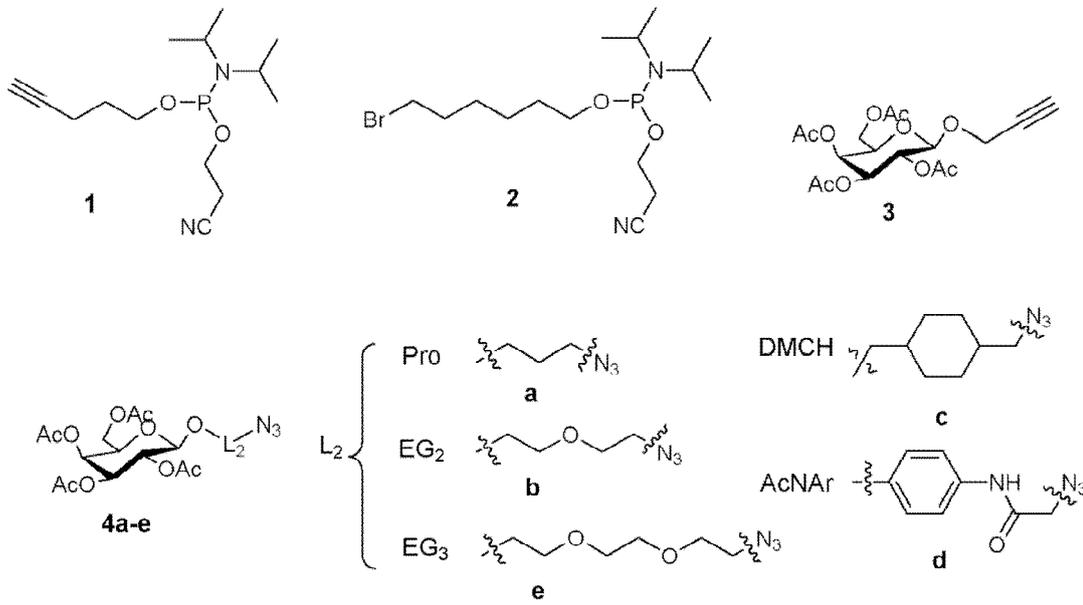


Figura 2

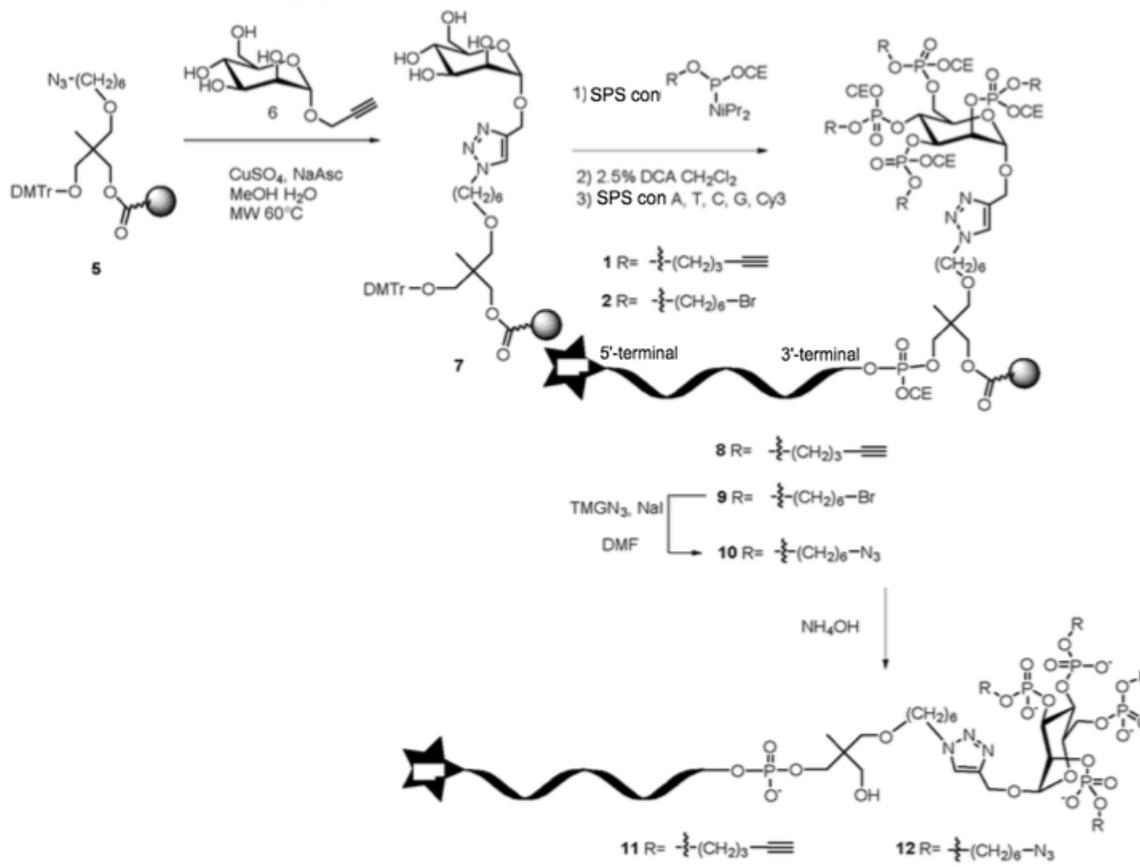


Figura 3a

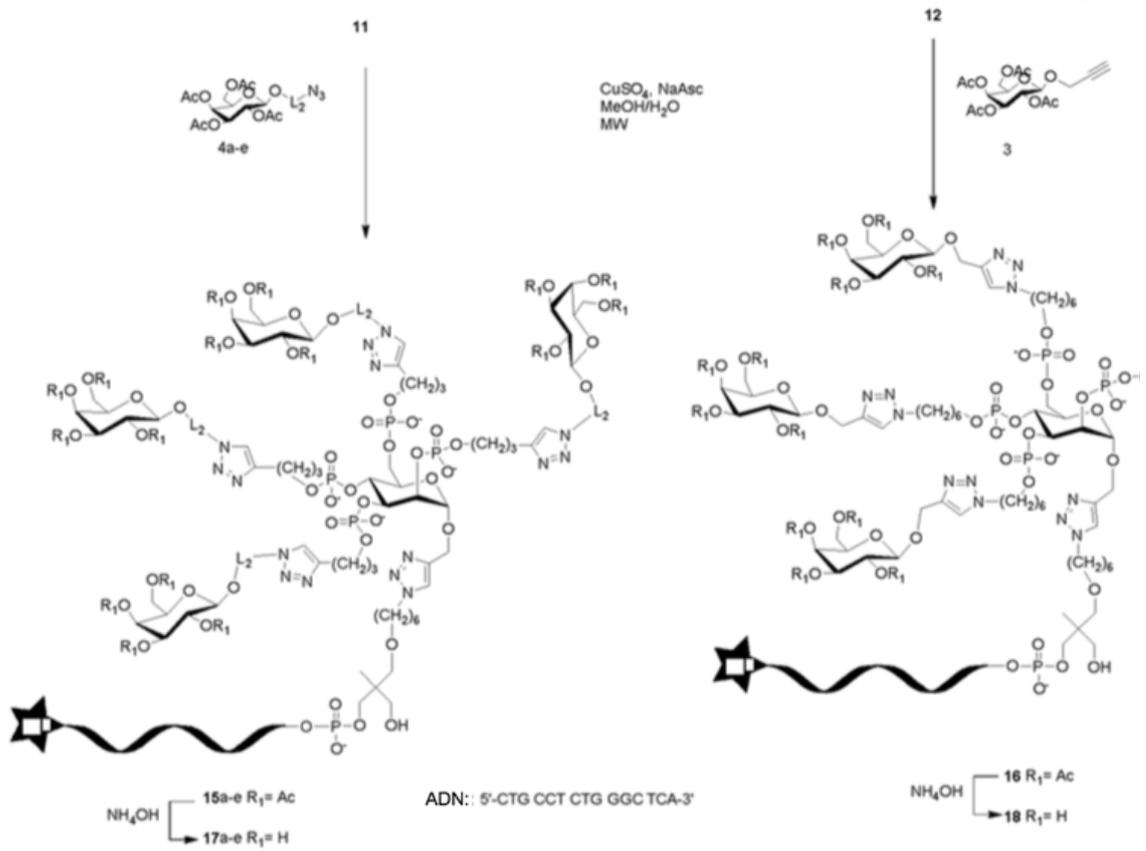


Figura 3b

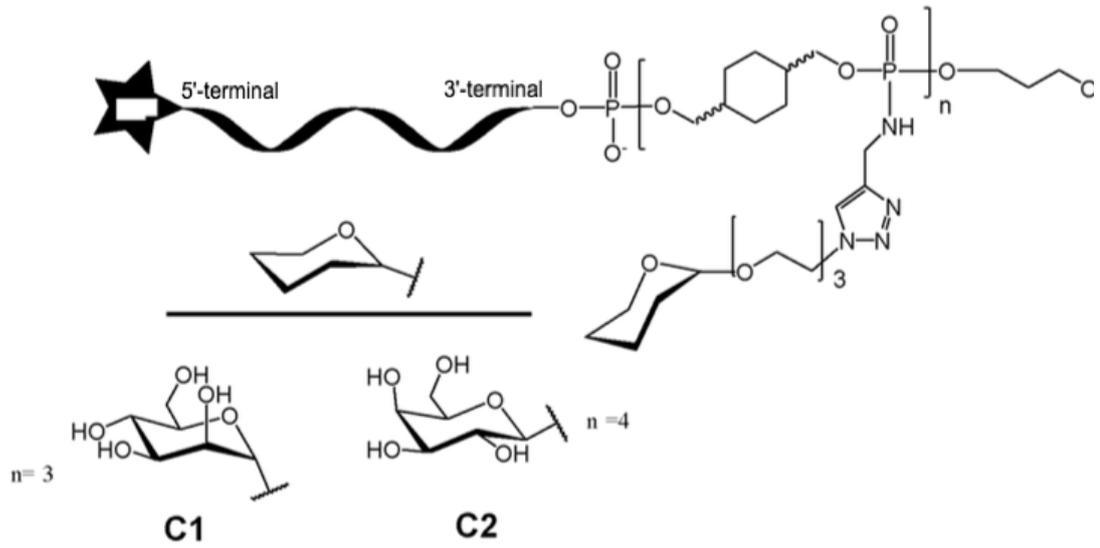


Figura 4

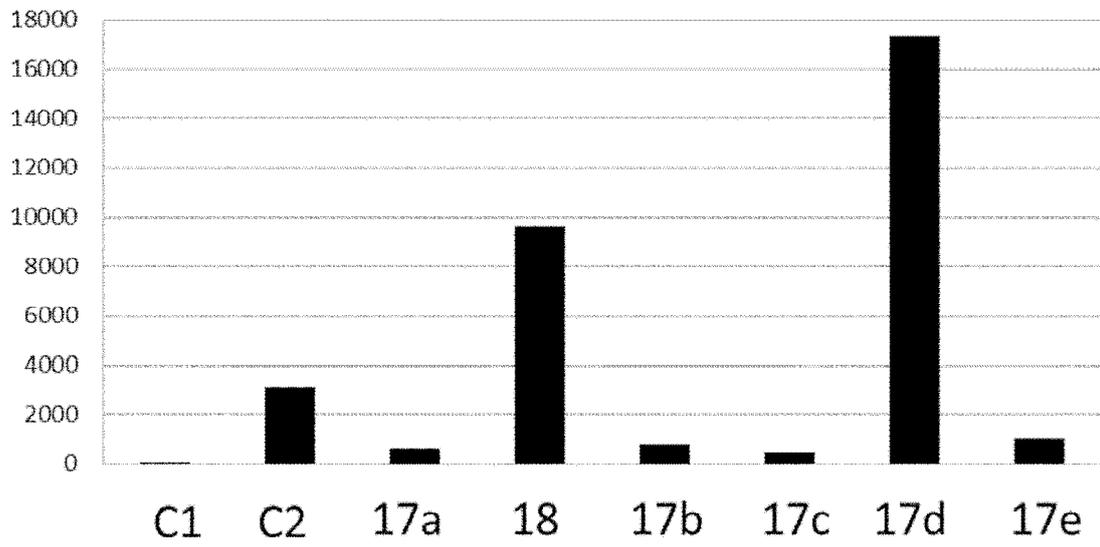


Figura 5

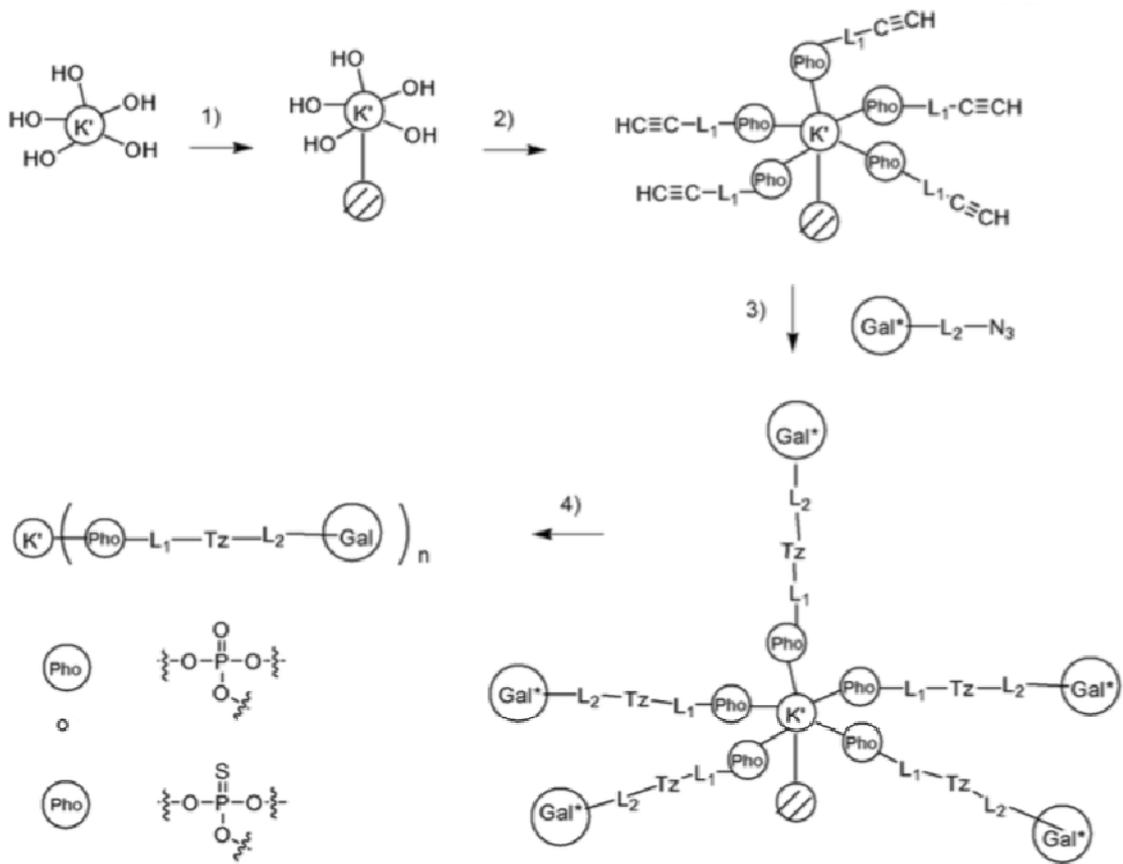


Figura 6

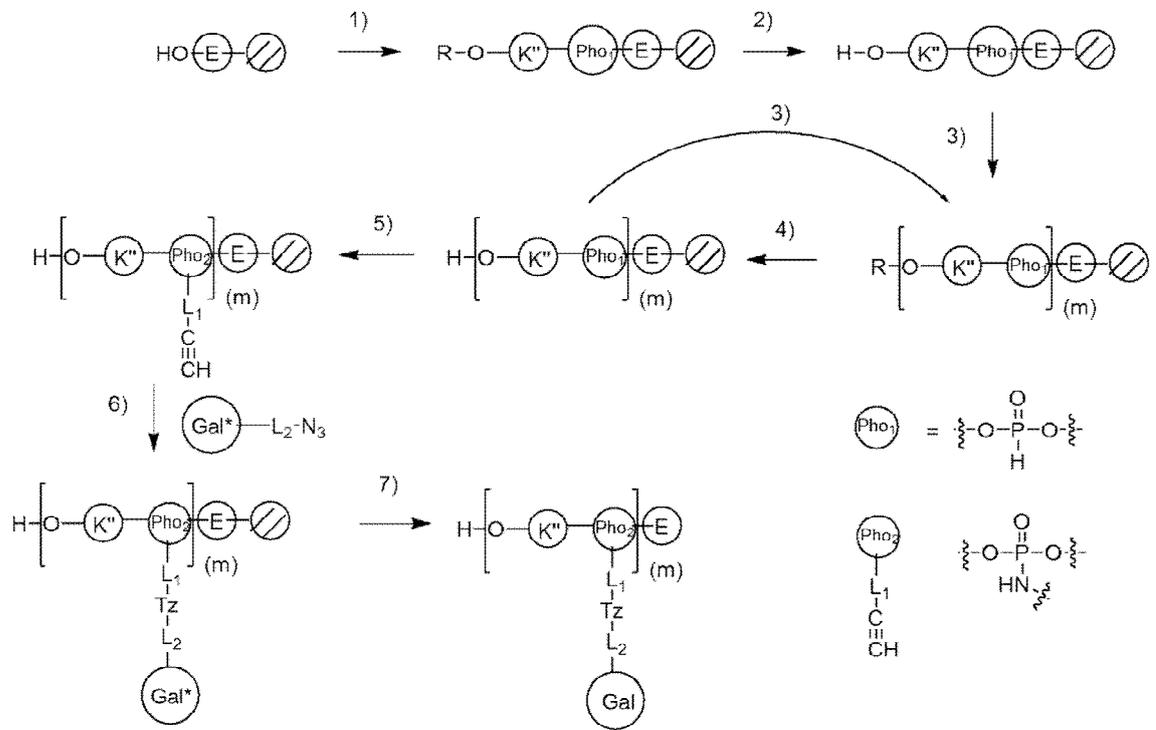


Figura 7a

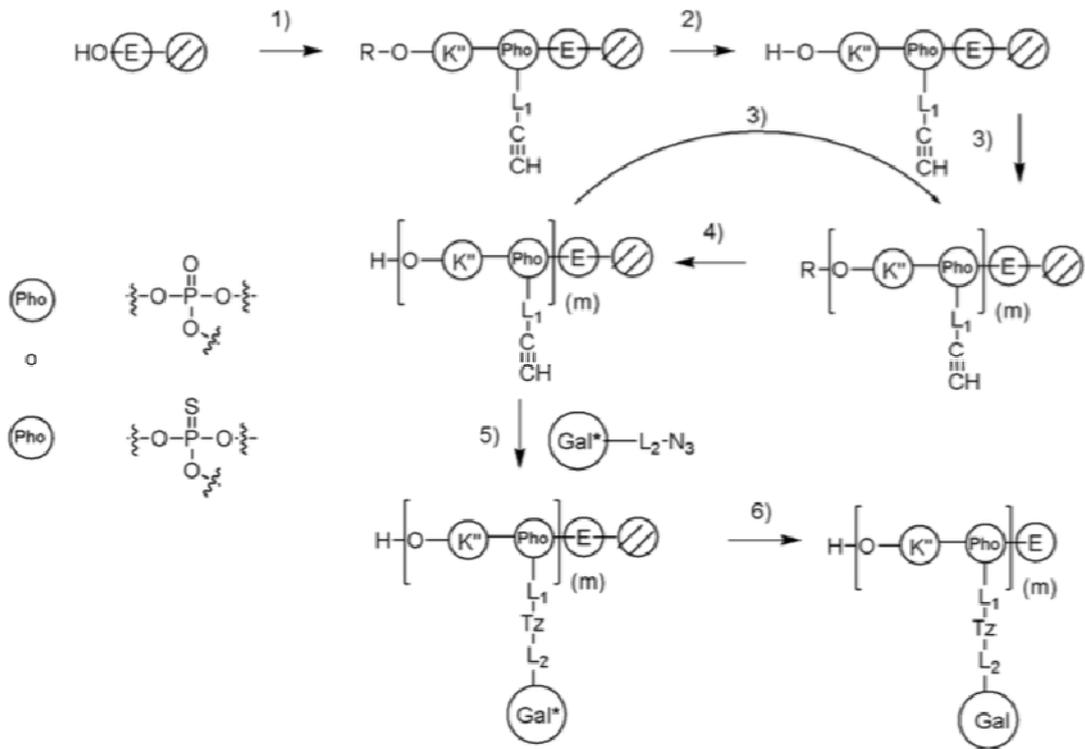


Figura 7b

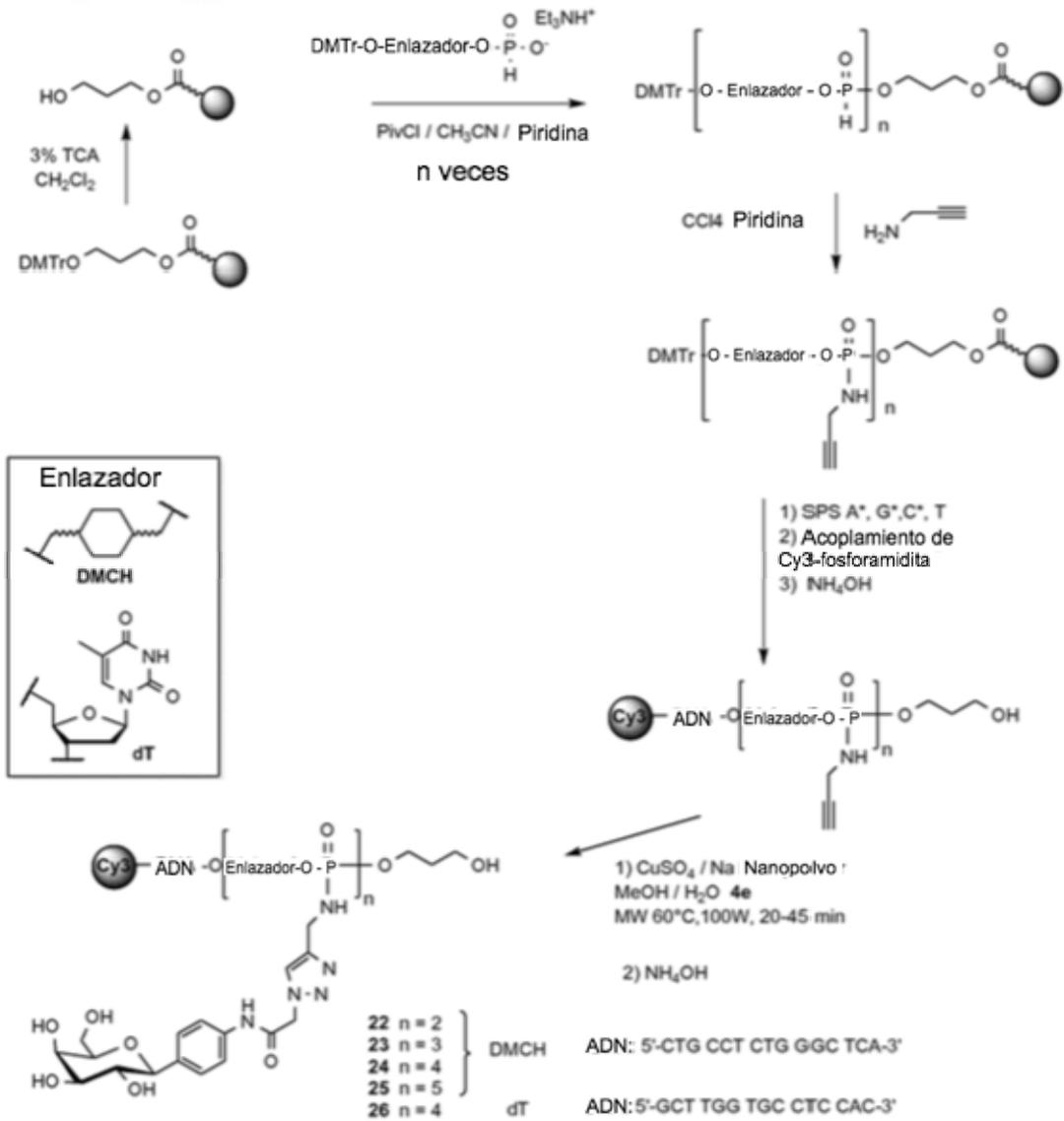


Figura 8

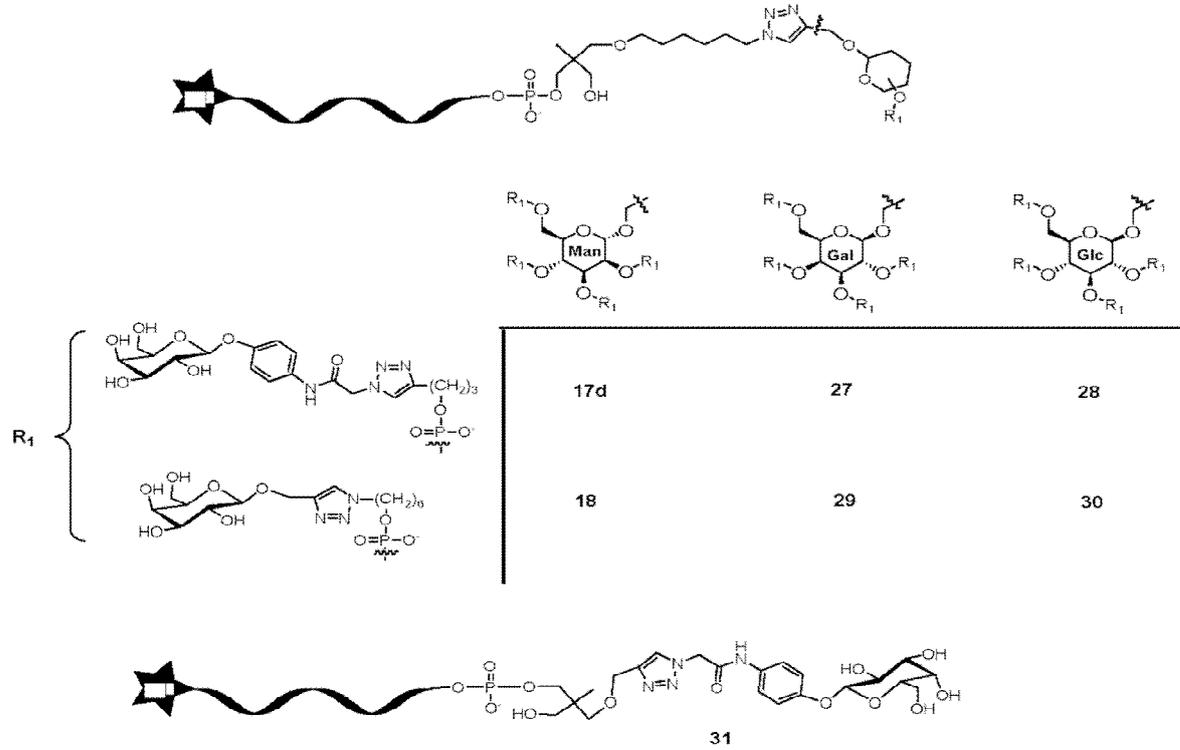


Figura 9

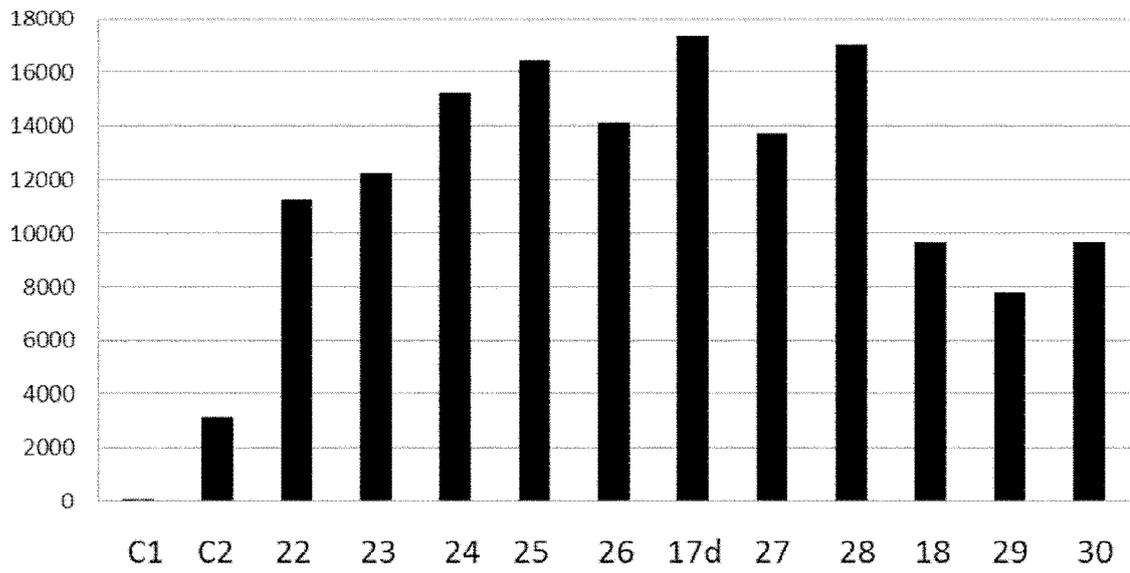


Figura 10

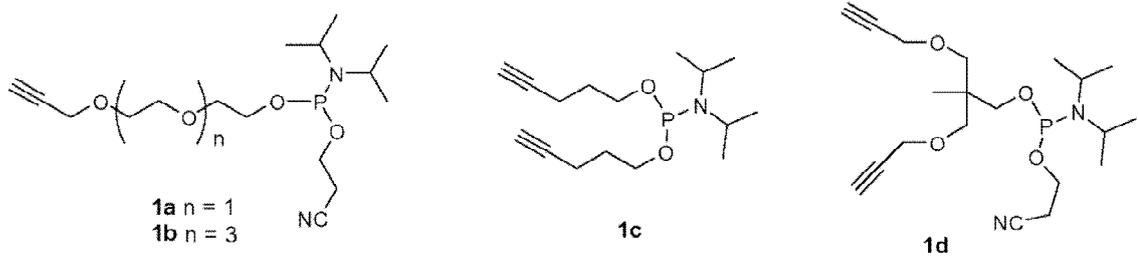


Figura 11

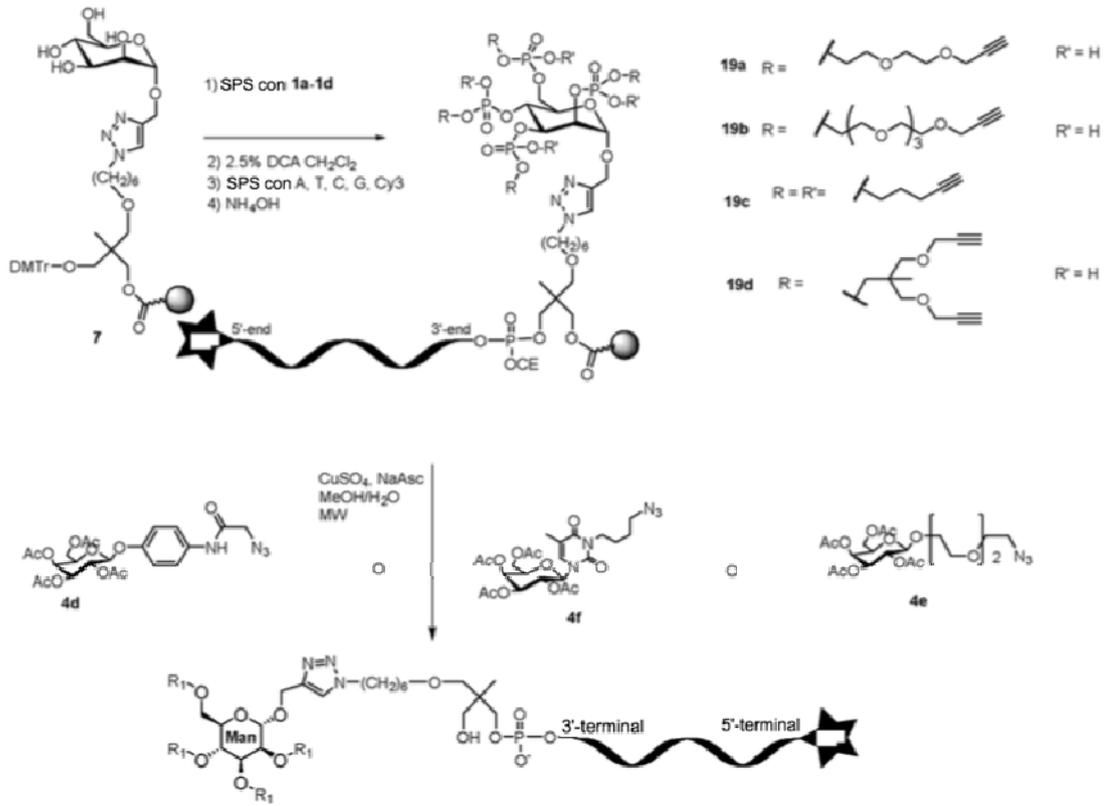


Figura 12a

R₁

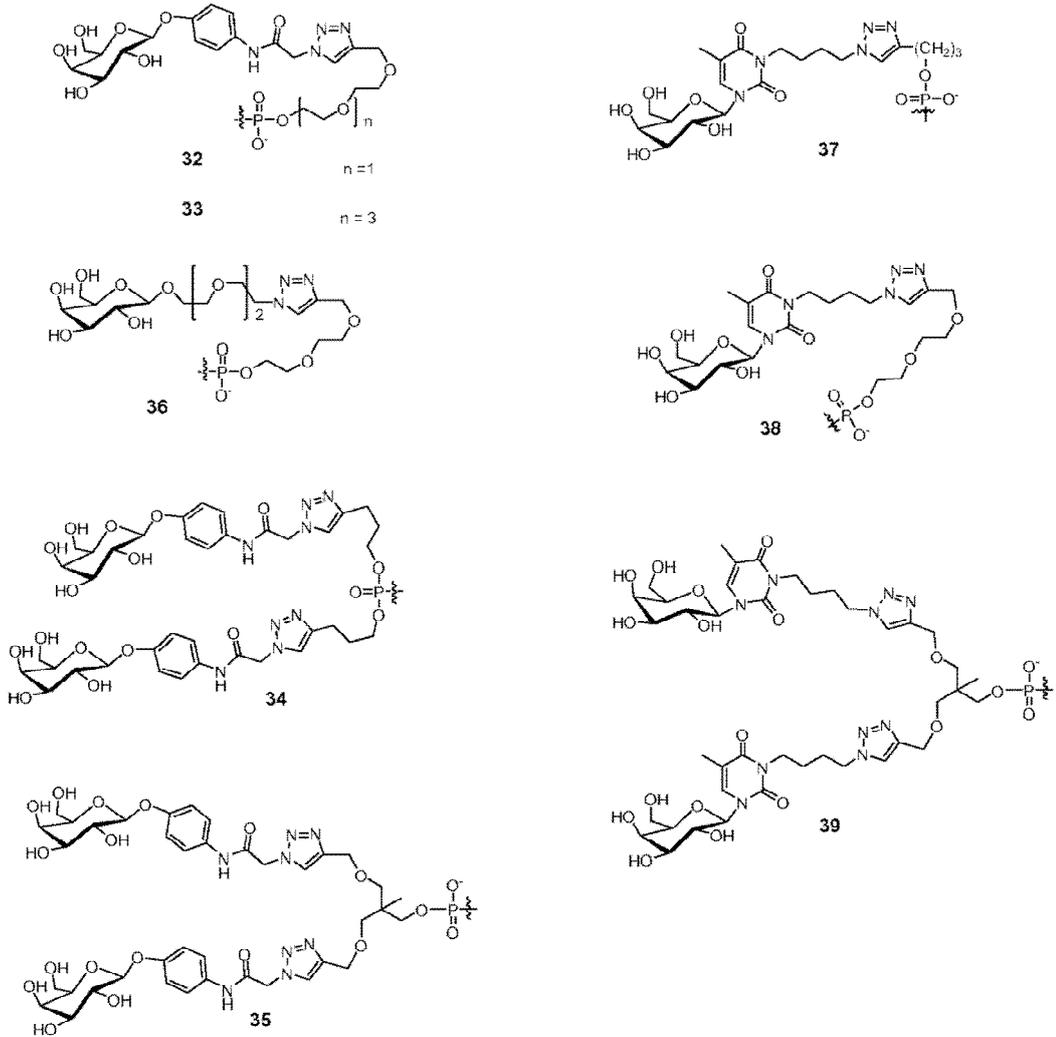


Figura 12b

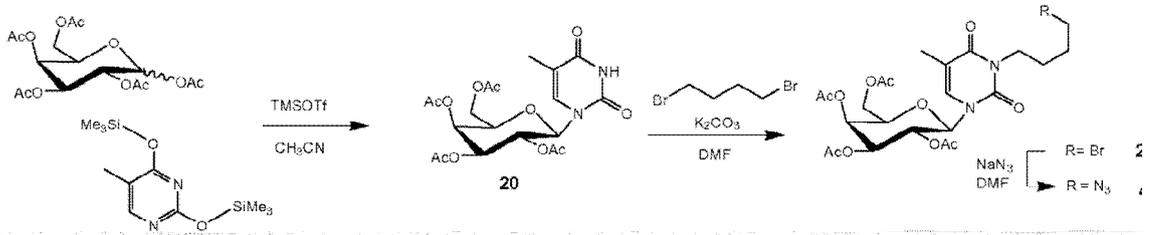


Figura 13

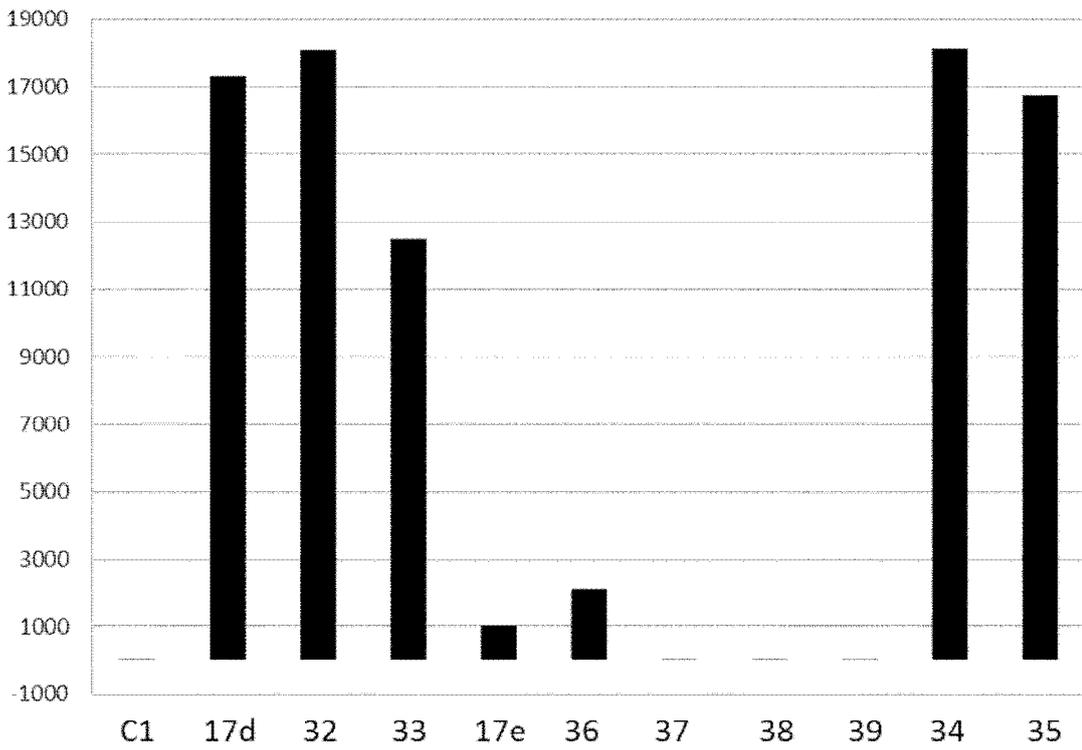


Figura 14

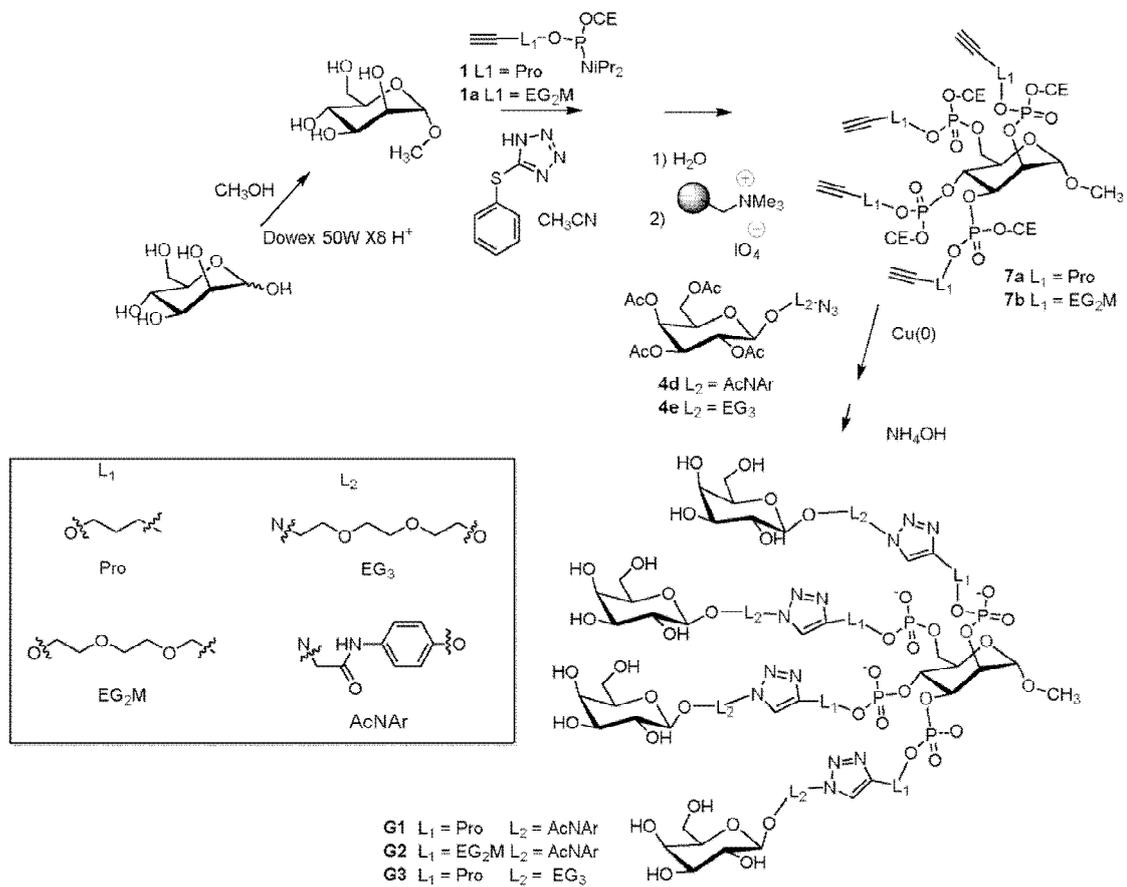


Figura 15

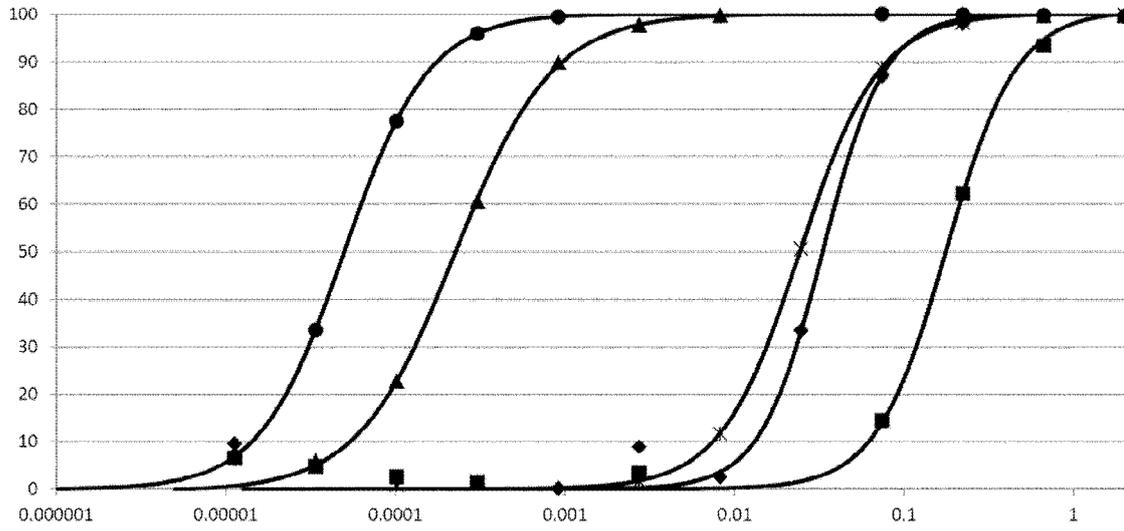


Figura 16

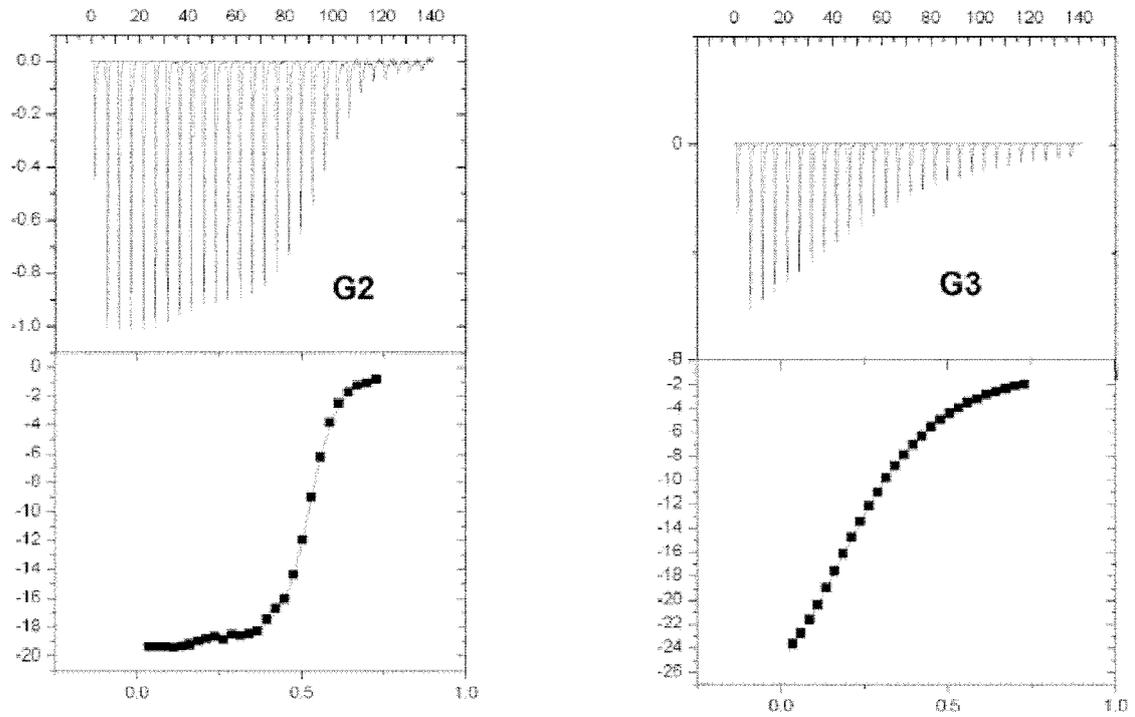


Figura 17a

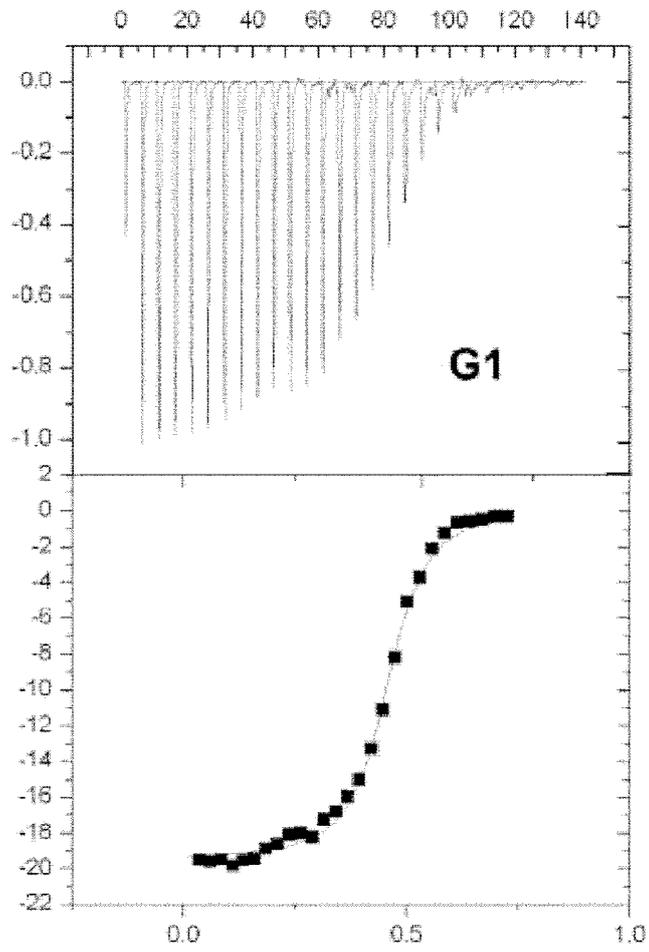


Figura 17b

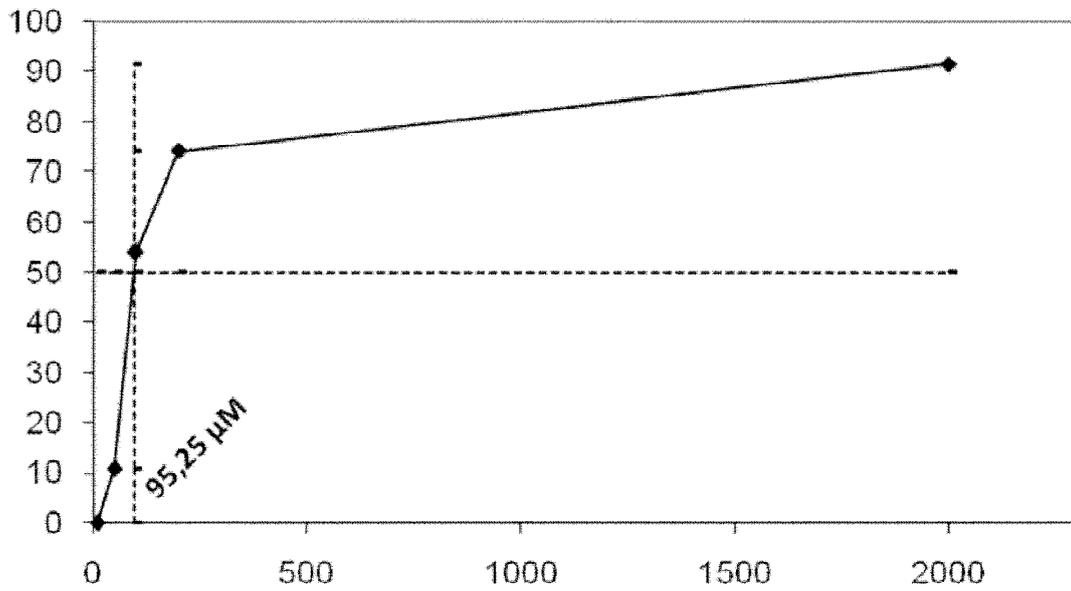


Figura 18

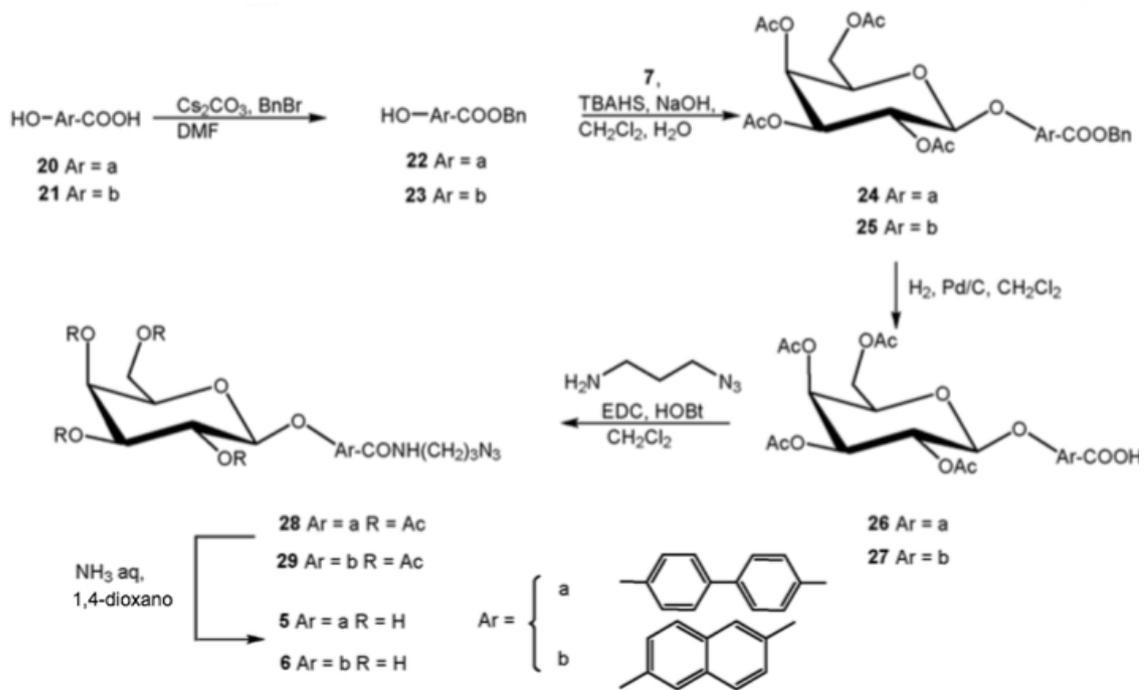


Figura 19

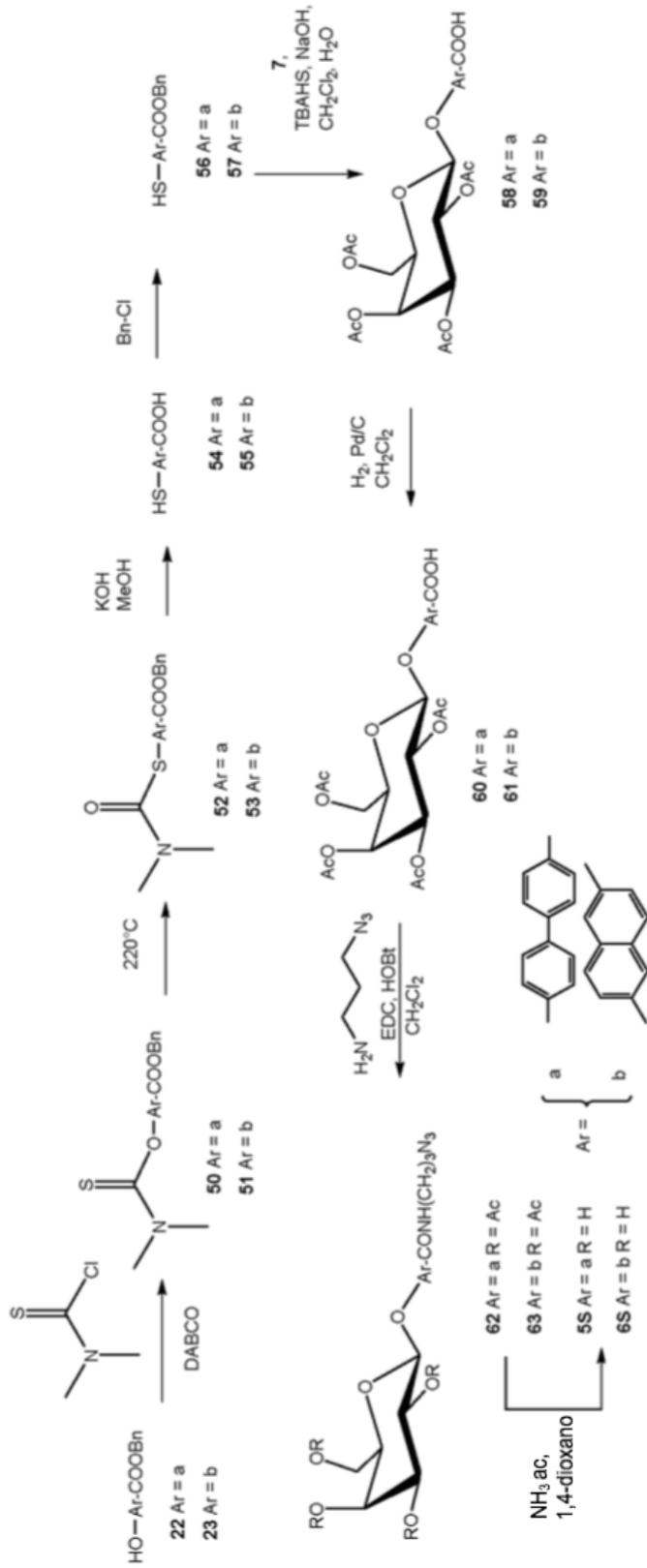


Figura 20

