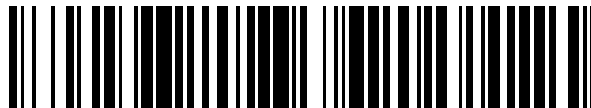


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 752**

51 Int. Cl.:

C07H 19/073 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2014** E 14290302 (0)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017** EP 3006452

54 Título: **Compuestos de bola-anfifílicos y sus usos para aplicaciones biomédicas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE BORDEAUX (50.0%)
35 Place Pey Berland
33000 Bordeaux, FR y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARTHELEMY, PHILIPPE;
RAMIN, MICHAEL;
LATXAGUE, LAURENT;
APPAVOO, ANANDA;
CHASSANDE, OLIVIER y
EHRET, CAMILLE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 660 752 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de bola-anfifílicos y sus usos para aplicaciones biomédicas

La invención se refiere a compuestos bola-anfifílicos y sus usos para aplicaciones biomédicas.

5 La invención se refiere particularmente al uso de compuestos bola-anfifílicos para proporcionar geles de bajo peso molecular (GBPM), útiles, en particular, como medios de cultivo para células, en particular las células madre aisladas.

Los hidrogeles que no son tóxicos, fáciles de usar, citocompatibles, inyectables y degradables son biomateriales valiables como medios de cultivo de células.

10 El desarrollo de matrices artificiales biocompatibles que puedan ser usadas para el cultivo de células madre sigue siendo un gran desafío en la ingeniería de cultivo celular y/o la medicina regenerativa. La mayor parte de los soportes de gel desarrollados hasta ahora implican materiales poliméricos derivados de fuentes naturales o de síntesis química. Sin embargo, los polímeros a menudo sufren de varias limitaciones, incluyendo mala biocompatibilidad, toxicidad, biodegradabilidad, actividad proinflamatoria etc. Alternativamente, los hidrogeles a base de moléculas pequeñas están surgiendo actualmente como una nueva y poderosa herramienta para la estrategia de
15 la medicina regenerativa capaz de restaurar las propiedades biológicas y mecánicas y/o funciones.

La invención se refiere por lo tanto a nuevos compuestos bola-anfifílicos derivados de nucleolípidos y a una nueva generación de geles de bajo peso molecular (GBPM) que son adecuados para el cultivo celular, en particular para el cultivo de células madre. Las matrices de hidrogel basadas en bola-anfifílicos exhiben las siguientes propiedades requeridas de no toxicidad, facilidad de manejo, inyectabilidad, y reología biocompatible (comportamiento tixotrópico).
20

Los bola-anfifílicos son compuestos de una o dos cadenas hidrófobas covalentemente unidas en ambos extremos a grupos de cabeza hidrófilos. Este tipo de arquitectura molecular, que puede encontrarse en membranas de arqueobacterias, se ha usado en numerosas aplicaciones que van desde la síntesis de nanomateriales a la entrega de genes o fármacos.

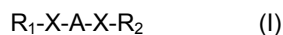
25 Se ha descrito el uso de glicosil-nucleósidos-lípidos (GNL) y de glicosil-nucleósidos-fluorolípidos (GNF) en la formación de GBPM.

Se ha descrito que los GNL son útiles para promover la internalización de liposomas basados en GNL en células madre (L. Latxague et al., Chem. Commun., 2011, 47, 12598-12600).

30 Se han estudiado agregados supramoleculares de GNL y geles a base de GNL para la entrega de ácido nucleico en G. Godeau et al., Chem. Commun., 2009, 1-3 y 5127-5129. Se describieron los geles basados en GNF como que son solamente compatibles con los cultivos de células madre donde las células madre forman agregados, y claramente no compatibles con la supervivencia y el crecimiento de células madre aisladas (S. Ziane et al., Eur. Cells and Mat., 2012, 23, 147-160).

35 Actualmente se ha encontrado que nuevos compuestos bola-anfifílicos basados en un nucleósido glicosilado (GNBA) muestran propiedades fisicoquímicas particulares que los hace particularmente adecuados para proporcionar geles de peso molecular bajo.

La invención se refiere por tanto a compuestos de la fórmula (I)



en donde

- 40
- X es oxígeno, -NH-C(O)-NH- o -C(O)-NH-
 - A es una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está sustituida o no sustituida con uno o más grupos C₁-C₁₂ lineal o ramificados, o A representa una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está parcialmente o completamente halogenada;
 - R₁ y R₂, idénticos o diferentes, representan hidrógeno o -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆

45 en donde

- n, m y p, idénticos o diferentes, son de 0 a 10;
- R₃ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 átomo(s) de oxígeno o nitrógeno;
- R₄ representa un grupo nucleosidilo o no existe;

- R₅ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 heteroátomo(s);
 - R₆ representa un resto de un carbohidrato cíclico o un derivado de dicho carbohidrato;
- siempre que R₁ y R₂ no sean simultáneamente hidrógeno.

5 Preferiblemente, A es una cadena de hidrocarburo C₄-C₁₈, más preferiblemente una cadena de hidrocarburo C₁₂, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está sustituida o no sustituida con uno o más grupos alquilo C₁-C₁₂ lineal o ramificados;

Alternativamente, A es una cadena de hidrocarburo C₄-C₁₈, mas preferiblemente una cadena de hidrocarburo C₁₂ lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está parcial o totalmente halogenada.

10 Preferiblemente, la invención se refiere a compuestos de la fórmula (I) en donde R₄ representa un grupo nucleosidilo.

R₅ puede estar covalentemente unido a R₄ vía -(CH₂)_p- al átomo de carbono en posición 5' del anillo de la ribosa o de la desoxiribosa del nucleósido, o, alternativamente, al átomo de oxígeno en posición 3' del anillo de la ribosa o desoxiribosa del nucleósido.

15 «El grupo heteroarilo que contiene de 1 a 4 átomos de oxígeno o nitrógeno» se refiere a un grupo carbocíclico monocíclico o bicíclico, aromático o parcialmente insaturado, que contiene de 5 a 12 átomos, interrumpido por de 1 a 4 átomos de oxígeno o nitrógeno, que puede ser, por ejemplo, seleccionado de entre los grupos furano, pirrol, oxazol, oxadiazol, isoxazol, pirazol, triazol, tetrazol, imidazol, piridina, pirimidina, piridazina, pirazina, benzofurano, indol, quinoleina, isoquinoleina, cromano, naftiridina o benzodiazina, siendo el triazol el preferido.

20 «La cadena de hidrocarburo, que está parcialmente o completamente halogenada» se refiere a una cadena de alquilo saturada o insaturada en la que alguno o todos los átomos de hidrógeno están reemplazados con átomos de halógeno, tales como flúor, yodo, cloro o bromo, siendo el flúor el preferido.

«El grupo nucleosidilo» se refiere a un grupo que consiste de un resto de ribosa o desoxiribosa que está unida a una base de purina o pirimidina o a derivados de dicha base de purina o pirimidina, o a una base heterocíclica mono o bicíclica no natural, todas de dichas bases están opcionalmente sustituidas.

25 La base de purina puede ser, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste de adenina, guanina e hipoxantina.

La base de pirimidina puede ser, por ejemplo, seleccionada del grupo que consiste de timina, uracilo y citosina, siendo la timina la preferida.

Se entiende por «base heterocíclica no natural mono o bicíclica» una base universal, tal como, por ejemplo, 3-nitropirrol, 4-nitroimidazol o 5-nitroindol.

30 Por «opcionalmente sustituida» se entiende que la base de purina o pirimidina, o la base heterocíclica no natural puede ser sustituida con al menos un sustituyente elegido, por ejemplo, de un halógeno, un grupo amino, un grupo carboxi, un grupo carbonilo, un grupo carbonilamino, un grupo hidroxilo, azido, ciano, alquilo, cicloalquilo, perfluoroalquilo, alquiloxi (por ejemplo, metoxi), oxicarbonilo, vinilo, etinilo, propinilo, acilo etc.

35 «El residuo de un carbohidrato cíclico o un derivado de dicho carbohidrato» se refiere a un residuo de un ciclo osídico de 5 o 6 miembros, que puede ser, por ejemplo, seleccionado de D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, D-manopiranososa, D-fructopiranososa or D-ribofuranosa, o de glicanos tipo oligosacárido derivados de los mismos, así como de sus derivados N-acetilo, tales como, por ejemplo, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina o ácido siálico, o un derivado protegido de los mismos, siendo preferido la D-glucopiranososa.

40 En particular, la invención se refiere a los compuestos de la fórmula (I), en la que al menos una de las siguientes condiciones se cumple:

- R₃ y R₅, idénticos o diferentes, representan un grupo heteroarilo que contiene de 1 a 4 átomos de nitrógeno seleccionados del grupo que consiste de pirazol, triazol, tetrazol e imidazol;
- R₄ representa un grupo nucleosidilo seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, guanosina, desoxiguanosina, timidina, desoxitimidina, uridina, desoxiuridina, citidina y desoxicitidina.

45 • R₆ representa un residuo de un carbohidrato cíclico seleccionado de D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, D-manopiranososa, D-fructopiranososa, D-ribofuranosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina y ácido siálico o un derivado protegido de los mismos.

Los compuestos preferidos de la fórmula (I) son aquellos en que X es oxígeno.

Alternativamente, los compuestos de la fórmula (I) de interés son aquellos en los que X es -NH-C(O)-NH- o -C(O)-NH-.

Los compuestos preferidos de la fórmula (I) son aquellos en que:

- A representa una cadena de hidrocarburo C₁₂ saturada;
- R₁ es hidrógeno, o -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆;
- R₂ es -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_n-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆;
- 5 • n=m=p=1;
- R₃ es un grupo triazol;
- R₄ es timidina;
- R₅ es un grupo triazol, y
- R₆ es β-D-glucopiranosilo o 2,3,4,6 tetra-glucopiranosilo O-protegido.

10 Otros compuestos preferidos son aquellos en que

- A representa una cadena de hidrocarburo C₁₀ que está parcialmente fluorada;
- R₁ y R₂ son -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆;
- n=m=p=1;
- R₃ es un grupo triazol;
- 15 • R₄ es timidina;
- R₅ es un grupo triazol, y
- R₆ es β-D-glucopiranosilo o 2,3,4,6 tetra-glucopiranosilo O-protegido.

Según una forma de realización preferida, R₅ está covalentemente unido a R₄ por medio de -(CH₂)_p- al átomo de carbono en la posición 5' del anillo de ribosa o desoxiribosa.

20 Alternativamente, R₅ está covalentemente unido a R₄ por medio de -(CH₂)_p- al átomo de carbono en la posición 3' del anillo de ribosa o desoxiribosa.

Compuestos particularmente preferidos de la fórmula (I) son:

- 5'-[4-(12-hidroxidodecanoiloxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N3-(1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil) timidina,
- 25 1,12-bis-dodecanoil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina,
- 1,12-bis-dodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-3'-O-1-((β-D-glucopiranosido)-1-H-1,2,3-triazol-4-il)metil timidina,
- 30 1,10-bis-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexafluorododecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina, y
- 1,12-bis-dodecanoil-5'-[(4-metilurea)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina.

Los compuestos de fórmula (I) en los que X es oxígeno se pueden obtener por un proceso que comprende las siguientes etapas:

- 35 • hacer reaccionar un alcanodiol o un fluoroalcanodiol de la fórmula R₁-O-A-O-R₂ en ambos extremos con un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH, donde q es 1 o 2 y R es un haluro, en particular cloruro o bromuro,
- hacer reaccionar el compuesto resultante con el derivado 5'-azido de R₄,
- hacer reaccionar la base de purina o pirimidina o un resto de base universal de R₄ en el compuesto resultante con un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH, donde q y R están definidos como anteriormente,
- 40 para obtener un derivado N-alquilado de la base de purina o pirimidina o de la base universal de R₄, y

- hacer reaccionar el compuesto resultante con el derivado 1-azido de R₆ (reacción de click).

Para obtener los compuestos de la fórmula (I) en los que X es oxígeno y R₃ y/o R₅ no son triazoles, la persona experta es capaz de elegir las reacciones de ciclo adición apropiadas, tales como las reacciones de Diels Alder, a fin de obtener los heterociclos R₃ y/o R₅ deseados.

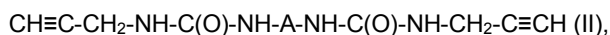
5 Las siguientes condiciones de reacción son las preferidas:

- las reacciones de alquilación se llevan a cabo en la presencia de hidruro sódico.
- la reacción de click se lleva a cabo con una mezcla 1:1 (v/v) de agua y diclorometano con agitación vigorosa a 40° C o con una mezcla 1:1 (v/v) de agua y THF a 60-65°C con 10% CuSO₄ y 20% de ácido ascórbico;

10 si se desea, la síntesis de compuestos asimétricos de la fórmula (I) donde uno de R₁ y R₂ representa hidrógeno y el otro es -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆ puede ser emprendida comenzando con materiales monoalquilados haciendo reacción de click con derivados de 5'-azido de R₄. La reacción siguiente del resto de la base de purina o pirimidina presente en el compuesto resultante con un agente de alquilación de la fórmula R-CH₂-C≡CH seguido por una segunda reacción de click con el derivado 1-azido de R₆ produce el compuesto asimétrico deseado de la fórmula (I).

15 El compuesto de la fórmula (I) en la que X es -NH-C(O)-NH- (compuestos de bis-urea) puede obtenerse por un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- hacer reaccionar un diisocianato de alcano de la fórmula OCN-A-NCO con NH₂-CH₂-C≡CH (propargilamina) o cualquier amina primaria que contenga un grupo alquino terminal) para obtener un compuesto de la fórmula (II)



20 • hacer reaccionar una base de purina o una base de pirimidina o una base universal con un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH, donde q es 1 o 2 y R es un haluro, preferentemente bromuro o cloruro, para obtener el derivado N-alquilado de la base de purina o la base de pirimidina o la base universal de R₄,

- hacer reaccionar el compuesto resultante con el derivado 1-azido de R₆ (reacción de click),

25 • convertir el grupo 5'-OH en el resto de ribosa o desoxiribosa de R₄ en una azida, y someter el compuesto resultante a una segunda reacción de click con un compuesto de la fórmula (II).

Las condiciones de reacción siguientes son las preferidas:

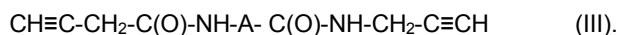
- la reacción de alquilación de la base de purina o la base de pirimidina o de la base universal con R-CH₂-C≡CH se lleva a cabo en condiciones básicas;

30 • la primera reacción de click se cataliza con Cu(I) y se lleva a cabo con una mezcla 1:1 (v/v) de agua y *tert*-butanol, preferentemente a 60° C, y preferentemente con 10% de CuSO₄ y 20% de ácido ascórbico;

- la conversión del grupo 5'-OH del resto de ribosa o desoxiribosa de R₄ en una azida puede llevarse a cabo usando compuestos organofosforados, tal como, por ejemplo, trifenilfosfina (PPh₃), un haluro de carbono tal como, por ejemplo, el tetrabromuro (CBr₄) y azida sódica (NaN₃).

35 Los compuestos de fórmula (I) en los que X es -C(O)-NH- (compuestos de bis-amida) pueden ser obtenidos por medio de un procedimiento que comprende las etapas de:

- hacer reaccionar un cloruro de diácido de alcano preparado in situ desde el correspondiente ácido dicarboxílico de fórmula HOOC-A-COOH y cloruro de tionilo, con NH₂-CH₂-C≡CH (propargilamina) o cualquier amina primaria que contenga un grupo alquino terminal para obtener un compuesto de la fórmula (III)



40 Las siguientes etapas son las mismas que las descritas con anterioridad para obtener compuestos de bis urea de la fórmula (I).

La invención además se refiere a los compuestos de la fórmula (IV)



en la cual

- X es -NH-C(O)-NH-;

- A es una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está sustituida o no sustituida con uno o más grupos C₁-C₁₂ lineal o ramificados, o A representa una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está parcialmente o completamente halogenada;
 - R₃ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 átomo(s) de oxígeno o nitrógeno;
- 5
- R₄ representa un grupo nucleosidilo;
 - R₇ es el resto de un agente alquilante de fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH donde q es 1 o 2 y R es un haluro, que está ligado por un enlace covalente con un átomo de nitrógeno de la purina, pirimidina o resto de la base universal de R₄;
 - n y 1, idénticos o diferentes, son de 0 a 10.
- 10
- R es preferiblemente cloro o bromo, y q es preferiblemente 1.
- Los compuestos de fórmula (IV) son útiles como intermedios de síntesis para obtener los compuestos de la fórmula (I) en donde X es oxígeno.
- Todas las características preferidas mencionadas anteriormente para A, R₃ y R₄ en la fórmula (I) también se aplican a la fórmula (IV).
- 15
- Los compuestos preferidos de la fórmula (IV) son aquellos en los que
- n=m=1
 - R₃ es un grupo triazol;
 - R₄ es timidina;
 - R₇ es propargilo.
- 20
- En particular, los compuestos de la fórmula (IV) de interés son:
- 5'-[4-((12-Propargiloxidodecanoiloxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N-3-propargil timidina, 1,12-bis-dodecanoil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N-3-propargil timidina, y 1,10-bis-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexafluorodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-propargil-5'-desoxi timidina.
- 25
- La invención además se refiere a los compuestos de la fórmula (V)
- $$R_4-(CH_2)_p-R_5-R_6 \quad (V)$$
- en la que
- X es -NH-C(O)-NH-;
 - R₄ representa un grupo nucleosidilo;
- 30
- R₅ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 heteroátomo(s), que está ligado a R₄ por un enlace covalente con el átomo de carbono en posición 5' del anillo de ribosa o desoxiribosa del nucleósido, o con el átomo de oxígeno del anillo de la ribosa o desoxiribosa del nucleósido;
 - R₆ representa un resto de un carbohidrato cíclico o un derivado de dicho carbohidrato;
 - p es de 0 a 10.
- 35
- Los compuestos de la fórmula (V) son útiles como intermedios de síntesis para obtener los compuestos de la fórmula (I) en la que X es -NH-C(O)-NH- o -C(O)-NH-.
- Todas las características preferidas mencionadas anteriormente para R₄, R₅ y R₇ en la fórmula (I) también se aplican a la fórmula (V).
- Los compuestos preferidos de la fórmula (V) son aquellos en que
- 40
- p=1

- R₄ es timidina;
- R₅ es un grupo triazol o
- R₆ es un resto de 2,3,4,6 tetra-glucopiranosilo-O-protégido.

En particular, los compuestos de la fórmula (V) de interés son:

- 5 5'-desoxi-N3-(1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il) timidina, y
5'-Azido-N3-(1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il) timidina.

La invención también se refiere a hidrogeles biocompatibles formados a partir de al menos un compuesto de fórmula (I). En particular, estos hidrogeles se forman a partir de una solución acuosa de compuestos de fórmula (I) que puede contener, por ejemplo, de 0,1 a 10% en peso de compuestos de fórmula (I), en particular de 1 a 5% en peso.

- 10 Los hidrogeles biocompatibles según la invención pueden comprender uno o más compuesto(s) de fórmula (I), o una mezcla de uno o más compuesto(s) de fórmula (I) y uno o más glicosil-nucleósido(s)-lípidos (también llamados GNL) y/o glicosil-nucleósido(s)-fluorolípido(s) (también llamados GNF).

- 15 Los hidrogeles biocompatibles según la invención pueden también contener una mezcla de uno o más compuesto(s) de fórmula (I) con una o más proteína(s) o glicoproteína(s), tales como por ejemplo colágeno o ácido hialurónico, y opcionalmente, uno o más GNL o GNF.

Como "biocompatible" se entiende un material que es bien tolerado por el organismo hospedante y que no causa ningún rechazo, reacción tóxica, daño o efectos dañinos en las funciones biológicas del organismo hospedante.

- 20 Los hidrogeles biocompatibles según la invención pueden prepararse, por ejemplo, por calentamiento de los compuestos de fórmula (I) hasta su disolución, por ejemplo a una temperatura de 40° C a 50° C, y dejando que la solución se enfríe gradualmente a temperatura ambiente.

Todos los aspectos preferidos mencionados anteriormente para los compuestos de fórmula (I) también se aplican a los hidrogeles formados a partir de los mismos.

La invención también se refiere al uso de hidrogeles formados a partir de compuestos de fórmula (I) como medio de cultivo de células, en particular como medio de cultivo de células animales o humanas.

- 25 Los hidrogeles según la invención son particularmente adecuados como medio de cultivo de células eucariotas, en particular para el cultivo de células madre. De hecho, se ha descubierto sorprendentemente que estos hidrogeles permiten el cultivo de células madre en forma aislada, mientras que cuando se usa GBPM existentes, tales como las formadas a partir de GNF, se observa la formación de grupos de células madre. El cultivo de células eucariotas aisladas, en particular de células madre, es muy valioso y prometedor a la vista de la extensa investigación que
30 actualmente se lleva a cabo en células madre. Ventajosamente, los hidrogeles formados a partir de los compuestos de fórmula (I) poseen propiedades viscoelásticas únicas. De hecho, se han realizado estudios reológicos sobre la variación del módulo de almacenamiento G' (también denominado módulo elástico) y el módulo de pérdidas G'' (también denominado módulo de viscosidad) como función de la frecuencia aplicada. G' describe la cantidad de energía que se almacena y se libera en cada oscilación, y G'' se corresponde con la energía que se disipa como calor. Sorprendentemente, se ha encontrado que el módulo de almacenamiento G' es más alto que el módulo de pérdidas G'', lo que indica la formación de un gel estable. Sin querer estar atados a la teoría, se puede presentar la hipótesis de que este alto módulo elástico tiene un papel en la adhesión y proliferación de células madre aisladas.

- 40 Además, se ha encontrado que el hidrogel formado a partir de los compuestos de fórmula (I) posee un comportamiento tixotrópico, y de este modo puede ser entregado con una jeringa, permitiendo así su uso en cirugía. Actualmente, dicho hidrogel es capaz de volver a ganar su comportamiento y resistencia de gel después de la aplicación de una gran tensión al mismo.

En particular, el hidrogel según la invención puede usarse como un material biocompatible en las siguientes aplicaciones biomédicas:

- 45
- Ingeniería de tejidos, por ejemplo por la inyección de complejos de gel-células: que pueden usarse, por ejemplo, para la regeneración ósea;
 - Terapia celular, por ejemplo por la inyección de complejos de gel-células en los que las células producen la(s) molécula(s) activa(s);
 - Prevención de la formación de adhesiones después de la cirugía abdominal-pélvica, por ejemplo por inyección del gel que permanecerá en el lugar de aplicación y actuará como una barrera para los tejidos adyacentes.

Además, el hidrogel biocompatible según la invención puede usarse como un material biocompatible para la administración de fármacos, por ejemplo:

- 5 • para la entrega de liberación controlada de un ingrediente activo que está atrapado en el gel, lo que permite que el ingrediente activo se difunda lentamente cerca del lugar de la inyección (administración tópica, tal como, por ejemplo, para la quimioterapia) y/o en el torrente sanguíneo;
- para hospedar dispositivos de administración, tal como, por ejemplo para la encapsulación de dispositivos que se estimulan eléctricamente.

La invención está soportada de forma no limitativa por los ejemplos a continuación.

10 Todos los reactivos y disolventes disponibles comercialmente (Fluka, Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar) se utilizaron sin purificación adicional.

Para reacciones que requerían condiciones anhidras, se utilizaron disolventes secos (Sigma-Aldrich) en condiciones de atmósfera inerte (nitrógeno o argón).

15 La cromatografía en capa fina analítica (CCF) se realizó en placas pre-recubiertas de gel de sílice F₂₅₄ con indicador de fluorescencia (Merck). La detección de los compuestos se realizó con luz UV (254 nm) y por una pulverización posterior con solución de H₂SO₄ al 10% en etanol, seguido de calentamiento, o de solución acuosa al 1% de KMnO₄ seguido de calentamiento.

20 La cromatografía en columna se realizó con columnas flash de gel de sílice (0,04-0,063 mm, Merck) o con columnas flash de cromatografía listas para el uso Chromabon RS 40 (Macherey-Nagel). Todos los compuestos se caracterizaron usando espectroscopía de Resonancia Nuclear Magnética (RMN) ¹H y ¹³C (espectrómetro Bruker Avance DPX-300, ¹H a 300,13 MHz y ¹³C a 75,46 MHz). Las asignaciones se hicieron con experimentos ¹H-¹H COSY, DEPT y HSQC. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en partes por millón (ppm) en relación al tetrametilsilano o los picos de disolvente residual (CHCl₃: ¹H: 7,26, ¹³C: 77,0). Las constantes de acoplamiento *J* se dan en Hercios (Hz); la multiplicidad de los picos se informa como sigue: s = singlete, bs = singlete ancho, d = doblete, t = triplete, m = multiplete.

25 Los espectrómetros de masas de alta resolución de ionización por electrones (HR ESI-MS) se realizaron por CESAMO (Bordeaux, Francia) en un espectrómetro de masas QSat Elite (Applied Biosystems). El instrumento está equipado con una fuente ESI y los espectros se registraron en modo negativo. La aguja de electropulverización se mantuvo a 4500 V y se operó a temperatura ambiente. Las muestras se introdujeron por inyección en un bucle de muestra de 10 μ l en un flujo de metanol a 200 μ l/min desde la bomba de CL.

30 Se usan las siguientes abreviaturas:

DCM	diclorometano
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
TBAI	yoduro de tetrabutilamonio

35 THF tetrahidrofurano

Los ejemplos a continuación, titulados "Preparación" describen la preparación de los productos intermedios de síntesis usados para preparar los compuestos de fórmula (I). La preparación de los compuestos de fórmula (I) y sus aplicaciones se describen después como "Ejemplos".

40 La Figura 1 muestra el esquema sintético usado en las Preparaciones y Ejemplos para los compuestos de fórmula (I) en los que X es oxígeno.

La Figura 2 muestra el esquema sintético usado en las Preparaciones y Ejemplos para los compuestos de fórmula (I) en los que X es -NH-C(O)-NH-.

La Figura 3 muestra los perfiles de DLS del compuesto 11 (diámetro promedio de la intensidad).

La Figura 4 muestra los resultados de barrido de frecuencia para los hidrogeles obtenidos con los compuestos 5 y 6.

45 La Figura 5 muestra la medición de la deformación incremental del hidrogel obtenido con el compuesto 6.

La Figura 6 muestra la determinación de la citotoxicidad del compuesto 6 con la prueba de MTT en células madre mesenquimales humanas.

La Figura 7 muestra la citocompatibilidad del compuesto 6 mediante la monitorización del metabolismo de azul de

alamar en células osteoblásticas de la rata (A) o células madre humanas ASCs (B) cultivadas en geles basados en el compuesto 6.

Preparación 1

1,12-Dipropargilodecano (2)

5 Se añadió a una solución enfriada (0° C) del compuesto 1 (disponible comercialmente) (5g, 24,7 mmoles) en DMF anhidro (60 ml), hidruro de sodio en porciones pequeñas (55% en aceite mineral, 6,5 g, 148,2 mmoles) con agitación. Se añadió bromuro de propargilo (80% p/p en tolueno, 11 g, 74,1 mmoles) seguido de TBAI (0,91 g, 2,4 mmoles), y se continuó agitando durante 15 horas a temperatura ambiente. La reacción se inactivó con metanol (10 ml) y se agitó durante 30 minutos más. Después de la adición de DCM (200 ml) la solución se lavó con agua (3x50 ml) y después salmuera (50 ml), la capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El producto 2 se aisló después de la purificación en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 100/0 después 97/3) como un líquido incoloro. Rendimiento: 4,48 g (65%).

¹H RMN (300 MHz, en CDCl₃) δ 1,22-1,43 (m, 16H, CH₂), 1,52-1,66 (m, 4H, CH₂CH₂O), 2,43 (t, J= 2,4 Hz, 2H, CH propargilo), 3,52 (t, J= 6,6 Hz, 4H, CH₂CH₂O), 4,15 (d, J= 2,4 Hz, 4H, CH₂ propargilo).

15 ¹³C RMN (75 MHz, en CDCl₃) δ 26,08, 29,42, 29,50, 29,55 (CH₂, CH₂CH₂O), 57,97 (CH₂ propargilo), 70,31 (CH₂O), 74,01 (CH propargilo).

Preparación 2

12-Propargiloxidodecan-1-ol (7)

20 Se añadió a una solución enfriada (0° C) del compuesto 1 (disponible comercialmente) (4g, 20 mmoles) en DMF anhidro (100 ml), hidruro de sodio en porciones pequeñas (55% en aceite mineral, 2,5 g, 109 mmoles) con agitación. Se añadió bromuro de propargilo (80% p/p en tolueno, 9 g, 60 mmoles) gota a gota, y se continuó agitando durante 12 horas a temperatura baja. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. La mezcla resultante se vertió en agua y se extrajo con DCM. Los extractos se combinaron, se lavaron con agua (3x50 ml) y después salmuera (50 ml). La capa orgánica se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El producto 7 se aisló después de purificación en gel de sílice (hexano/acetato de etilo 6/4) como un sólido marrón. Rendimiento: 2,24 g (46%).

¹H RMN (300 MHz, en CDCl₃) δ 1,19-1,30 (m, 16H, CH₂), 1,46-1,59 (m, 4H, CH₂CH₂O), 2,37 (s grande, 1H, OH), 2,40 (t, J= 2,4 Hz, 1H, CH propargilo), 3,46 (t, J= 6,6 Hz, 2H, CH₂O), 3,56 (t, J= 6,7 Hz, 2H, CH₂O), 4,08 (d, J= 2,4 Hz, CH₂ propargilo).

30 ¹³C RMN (75 MHz, en CDCl₃) δ 25,74, 26,03 (CH₂), 29,39, 29,43, 29,53, 29,58 (CH₂ + CH₂CH₂O), 32,70 (CH₂CH₂O), 57,92 (CH₂ propargilo), 62,72, 70,22 (CH₂O), 74,13 (CH propargilo).

Preparación 3

1,12-Bis-dodecanil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-deoxi timidina (3)

35 Se añadió a una solución de 2 obtenido en la Preparación 2 (1,50 g, 5,39 mmoles) y 5'-azido-5'-desoxi timidina (3,02 g, 11,30 mmoles) en 140 ml de THF/H₂O (1:1), sulfato de cobre (172 mg, 1,07 mmoles) seguido de ascorbato de sodio (427 mg, 2,15 mmoles). La mezcla se agitó a 60° C durante 20 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se eliminaron los disolventes a presión reducida. El sólido obtenido se lavó con agua hasta que los lavados fueron incoloros, y después con etanol. Después de secar a alto vacío, el sólido blanco obtenido se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 4,00 g (91%).

40 ¹H RMN (300 MHz, en DMSO-*d*₆) δ 1,22 (s, 16H, 8CH₂), 1,41-1,52 (m, 4H, CH₂CH₂O), 1,79 (s, 6H, CH₃ timina), 2,08-2,15 (m, 4H, H-2'), 3,35-3,41 (m, 4H, CH₂O), 4,06-4,10 (m, 2H, H-4'), 4,24-4,29 (m, 2H, H-3'), 4,27 (s, 4H, OCH₂-triazol), 4,57-4,74 (m, 4H, H-5'), 5,52 s grande, 2H, OH timina), 6,16 (t, J= 7,5 Hz, 2H, H-1'), 7,33 (s, 2H, H-6 timina), 8,06 (s, 2H, CH triazol), 11,34 (s, 2H, NH timina).

¹³C RMN (75 MHz, en DMSO-*d*₆) δ 12,53 (CH₃ timina), 6,11, 29,33, 29,48, 29,55 CH₂), 38,31 (C-2'), 51,51 (C-5'), 63,68 (CH₂O-triazol), 70,01 (CH₂O), 71,16 (C-3'), 84,40 (C1' y C-4'), 125,00 (CH triazol), 136,45 (C-6 timina).

45 Preparación 4

1,12-Bis-dodecanil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N-3-propargil timidina (4)

50 Se añadió a una solución del compuesto 3 obtenido en la Preparación 3 (3,50 g, 4,30 mmoles) en DMF anhidro (120 ml), carbonato de sodio (1,7 g, 12,92 mmoles) seguido de bromuro de propargilo (80% p/p en tolueno, 1,92 g, 12,92 mmoles) y TBAI (0,16 g, 043 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas, después se vertió en DCM (200 ml) y se lavó con agua (3x50 ml) y salmuera (50 ml). El extracto orgánico se secó (Na₂SO₄) y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con

DCM/MeOH (100:0 a 96:4) y se obtuvo como una espuma sólida blanca. Rendimiento: 3,07 g (77%).

¹H RMN (300 MHz, en CDCl₃) δ 1,27 (s, 16H, 8 CH₂), 1,53-1,60 (m, 4H, 2 CH₂CH₂O), 1,94 (s, 6H, 2 CH₃ timina), 2,22 (t, 2H, J= 2,3 Hz, CH propargilo), 2,31-2,41 (m, 4H, 2 H-2'), 3,52 (t, 4H, J= 6,5 Hz, 2 CH₂O), 4,23-4,27 (m, 2H, 2 H-4'), 4,53-4,59 (m, 2H, 2 H-3'), 4,61 (s, 4H, 2 CH₂O triazol), 4,71 (s, 4H, 2 CH₂ propargilo), 4,70-4,77 (m, 4H, 2 H-5'), 6,23 (t, 2H, J= 6,6 Hz, 2 H-1'), 6,81 (s, 2H, 2 H-6 timina), 7,68 (s, 2H, 2 H triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en CDCl₃) δ 13,16 (CH₃ timina), 29,22, 29,31, 29,34, 29,47 (CH₂), 30,50 (CH₂ propargilo), 38,61 (C-2'), 51,11 (C-5'), 63,93 (OCH₂ triazol), 71,14 (CH₂O), 71,23 (C-3'), 77,25 (CH propargilo), 83,79 (C-4'), 86,85 (C-1'), 124,60 (CH triazol), 134,72 (C-6 timina).

Preparación 5

5'-[4-((12-Hidroxidodecanoiloxi)metil)1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi timidina (8)

Se añadió a una solución desgasada del compuesto 7 obtenido en la Preparación 1 (2,23 g, 9,30 mmoles) en 80 ml de THF/H₂O (1:1), 5'-azido-5'-desoxi timidina (2,48 g, 9,30 mmoles), sulfato de cobre (0,15 g, 0,93 mmoles) y ascorbato de sodio (0,37 g, 1,86 mmoles). La mezcla se agitó a 60° C durante 3 horas. Después de la eliminación del THF *in vacuo*, la mezcla acuosa se filtró, el sólido amarillo obtenido se lavó con agua, después se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH (9:1) para eluir el producto como un sólido blanco. Rendimiento: 3,88 g (82%).

¹H RMN (300 MHz, en MeOD @ 313K) δ 1,30-1,39 (m, 16H, CH₂), 1,52-1,60 (m, 4H, CH₂CH₂O), 1,89 (d, J= 1,2 Hz, 3H, CH₃ timina), 2,23-2,29 (m, 2H, H-2'), 3,49-3,57 (m, 4H cadena CH₂O + CH₂OH), 4,16-4,21 (m, 1H, H-4'), 4,39-4,43 (m, 1H, H-3'), 4,72-4,81 (m, 2H, H-5'), 6,20 (t, J= 6,7 Hz, H-1'), 7,20 (d, 1H, H-6 timina), 7,95 (s, 1H, CH triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en MeOD @ 313K) δ 10,95 (CH₃ timina), 25,51, 25,74, 29,06, 29,13, 29,22, 29,27, 32,25 (CH₂), 38,26 (C-2'), 51,09 (C-5'), 61,64 (CH₂OH o CH₂CH₂O), 63,27 (CH₂O triazol), 70,38 (CH₂CH₂O o CH₂OH), 70,98 (C-3'), 84,06 (C-4'), 85,46 (C-1'), 110,10 (C-5 timina), 124,61 (CH triazol), 136,55 (C-6 timina), 150,30 y 164,31 (C=O).

HRMS: (M+Na) 530,2943 (calculado 530,2949)

Preparación 6

5'-[4-((12-Hidroxidodecanoiloxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N-3-propargiltimidina (9)

Se añadió a una solución del compuesto 8 obtenido en la Preparación 5 (1,27 g, 25,0 mmoles) en DMF anhidro (60 ml), carbonato potásico (0,69 g, 50,0 mmoles) y TBAI (0,09 g, 2,5 mmoles), seguido de bromuro de propargilo (80% p/p en tolueno, 1,19 g, 50,0 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas, después se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El aceite amarillo resultante se vertió en agua (50 ml) y se extrajo con DCM (3x50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (50 ml), después salmuera (50 ml), se secaron (Na₂SO₄), y el disolvente se eliminó *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH (95:5) para eluir el compuesto del título como un aceite amarillo viscoso que cristaliza en reposo (sólido blanco). Rendimiento: 1,20 g (87%).

¹H RMN (300 MHz, en CDCl₃) δ 1,26-1,34 (m, 16H, CH₂), 1,51-1,62 (m, 4H, CH₂CH₂OH + CH₂CH₂O), 1,93 (d, J= 1,1 Hz, 3H, CH₃ timina), 2,20 (t, J= 2,4 Hz, 1H, CH propargilo), 2,22-2,29 (m, 1H, H-2'a), 2,35-2,44 (m, 1H, H-2'b), 3,48-3,56 (m, 2H CH₂O), 3,65 (t, J= 6,6 Hz, 2H, CH₂OH), 4,18-4,23 (m, 1H, H-4'), 4,45-4,51 (m, 1H, H-3'), 4,59 (s, 2H triazol CH₂O), 4,70-4,74 (m, 4H, H-5' + CH₂ propargilo), 6,25 (t, J= 6,6 Hz, H-1'), 6,74 (d, 1H, H-6 timina), 7,68 (s, 1H, CH triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en CDCl₃) δ 12,93 (CH₃ timina), 25,68, 25,91, 29,30, 29,33, 29,41, 29,47 (CH₂ + CH₂CH₂OH o CH₂CH₂O), 30,36 (CH₂ propargilo), 32,55 (CH₂CH₂O o CH₂CH₂OH), 38,58 (C-2'), 51,00 (C-5'), 62,49 (CH₂OH), 63,85 (CH₂ triazol), 70,65 (C-3'), 70,85 (CH propargilo), 70,99 (triazol CH₂O), 83,77 (C-4'), 86,30 (C-1'), 124,48 (CH triazol), 134,83 (C-6 timina).

HRMS: (M+Na) 568,3098 (calculado 568,3105)

Preparación 7

5'-[4-((12-Propargiloxidodecanoiloxi)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N-3-propargiltimidina (10)

Se añadió a una solución enfriada (0° C) del compuesto 8 obtenido en la Preparación 5 (2g, 3,66 mmoles) en DMF anhidro (100 ml), hidruro de sodio en una porción (55% en aceite mineral, 0,90 g, 22 mmoles). Después de 15 minutos, se añadió TBAI (0,135 g, 0,36 mmoles) seguido de bromuro de propargilo en porciones pequeñas (80% p/p en tolueno, 1,63 g, 11 mmoles), y la agitación continuó durante 5 horas a 0° y después a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactivó con agua (10 ml) con agitación y enfriamiento sobre hielo, y la solución se concentró a presión reducida. El residuo marrón se disolvió en agua (200 ml) y se extrajo con DCM (3x100 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (3x100 ml) y solución acuosa de KCl al 10% (100 ml), se

secaron (Na_2SO_4) y el disolvente se eliminó *in vacuo*. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo y se obtuvo como un aceite amarillo. Rendimiento: 0,87 g (40%).

^1H RMN (300 MHz, en CDCl_3) δ 1,23-1,27 (m, 16H, CH_2), 1,48-1,56 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,89 (s, 3H, CH_3 timina), 2,08-2,17 (m, 1H, H-2'a), 2,18 (m, 1H timina CH propargilo), 2,35-2,43 (m, 1H, H-2'b), 2,51 (m, 1H, cadena CH propargilo), 3,48 (t, $J=6,7$ Hz, 2H CH_2OCH_2 -triazol), 3,59 (t, $J=6,6$ Hz, 2H, cadena CH_2O -propargilo), 4,17-4,20 (m, 2H, CH_2O propargilo), 4,24-4,30 (m, 1H, H-4'), 4,35-4,40 (m, 1H, H-3'), 4,57 (s, 2H CH_2 triazol), 4,57-4,70 (m, 4H, H-5' + CH_2N propargilo), 6,14 (t, $J=6,9$ Hz, H-1'), 6,73 (s, 1H, H-6 timina), 7,62 (s, 1H, CH triazol).

^{13}C RMN (75 MHz, en CDCl_3) δ 13,06 (CH_3 timina), 25,73, 26,03, 29,49, 29,54 (CH_2), 29,39 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 30,42 (timina CH_2 propargilo), 32,76 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ propargilo), 36,23 (C-2'), 50,92 (C-5'), 57,41 (CH_2O propargilo), 62,84 (cadena CH_2O -propargilo), 64,16 (CH_2 triazol), 70,80 (timina CH propargilo), 71,08 (cadena CH_2OCH_2 triazol), 75,70 (cadena CH propargilo), 78,26 (C-3'), 81,76 (C-4'), 86,69 (C-1'), 124,18 (CH triazol), 134,30 (C-6 timina).

HRMS: (M+Na) 606,3258 (calculado 606,3262)

Preparación 8

1,1'-(Dodecano-1,12-diil)bis(3-[propargil]urea) (12)

Se añadió lentamente a una solución de 1,12-diisocianatododecano (0,53 ml, 2 mmoles) en DCM anhidro (20 ml), propargilamina (0,30 ml, 4,8 mmoles). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. El precipitado se filtró y se lavó abundantemente con DCM para eliminar el exceso de propargilamina. Después del secado, el producto se obtuvo como un sólido blanco.

Rendimiento: (99%).

^1H RMN (300 MHz, en $\text{DMSO}-d_6$ @ 350 K) δ (ppm) 1,50-1,63 (m, 20H), 3,15 (t, $J=2,6$ Hz, 2H), 3,20-3,26 (q, 4H), 4,03 (m, $J=2,6$ Hz, 4H), 6,08-6,25 (s grande, 4H).

^{13}C RMN (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 350 K) δ (ppm) 26,82, 27,91, 28,05, 29,26, 29,32, 29,69, 30,34, 31,0, 31,09, 72,58, 83,05, 158,02.

Preparación 9

N3-propargiltimidina (13)

Se añadió a una solución de timidina (3 g, 12,39 mmoles) en DMF anhidro (20 ml), carbonato potásico (2,58 g, 18,58 mmoles), y bromuro de propargilo (80% p/p en tolueno, 2,07 ml, 18,58 mmoles). La reacción se agitó durante 2 días a temperatura ambiente. Después de la eliminación de DMF *in vacuo*, el residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y después se lavó con agua (3x30 ml). El extracto orgánico se secó (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida. El aceite resultante se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Rendimiento: 3 g (86%).

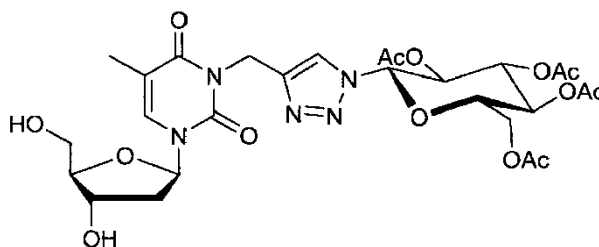
^1H RMN (300 MHz, en $\text{DMSO } d_6$) δ 1,85 (s, 3H), 2,10-2,18 (m, 2H), 3,10 (s, 1H), 3,59 (m, 2H), 3,79 (s, 1H), 4,25 (m, 1H), 4,53 (s, 2H), 5,04 (t, $J=6$ Hz, 1H), 5,27 (s, 1H), 6,21 (t, $J=6$ Hz, 1H), 7,82 (s, 1H).

^{13}C RMN (75 MHz, en $\text{DMSO } d_6$) δ 13,0, 30,3, 40,3, 62,0, 70,9, 71,1, 78,2, 86,0, 87,1, 116,9, 135,2, 150,2, 162,7.

HRMS: (M+H) 281,1135 (calculado 281,1137)

Preparación 10

Compuesto (14)



5'-Desoxi-N3-(1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il) timidina (14)

Se añadió a una solución de 13 obtenido en la Preparación 9 (2,80 g, 10 mmoles) y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosil azida (3,73 g, 10 mmoles) en 80 ml de *tert*-butanol/ H_2O (1:1), sulfato de cobre (159 mg, 1 mmol) y ascorbato de sodio (396 mg, 2 mmoles). La mezcla se agitó a 60° C durante 20 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido residual se disolvió en acetato de etilo (150 ml) y después se lavó con agua (3x50 ml). El

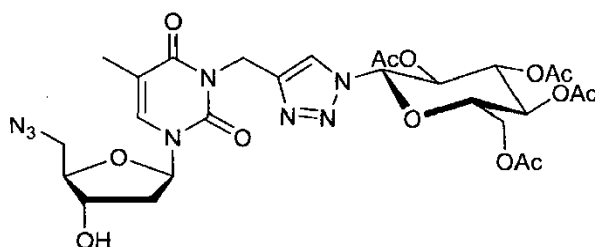
extracto orgánico se secó (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo y se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 5,33 g (82%).

5 ^1H RMN (300 MHz, en CDCl_3) δ 1,84-2,08 (m, 15H), 2,35 (m, 2H), 3,82-3,92 (m, 2H), 4,00 (m, 2H), 4,11-4,15 (dd, 1H), 4,25-4,31 (dd, 1H), 4,58 (m, 1H), 5,19-5,31 (m, 3H), 5,36-5,48 (m, 2H), 5,85 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,23 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 7,88 (s, 1H).

^{13}C RMN (75 MHz, en CDCl_3) δ 12,47, 19,93, 20,32, 20,47, 35,18, 39,60, 61,00, 61,22, 67,03, 69,58, 70,15, 72,03, 74,14, 84,72, 85,45, 86,62, 99,37, 109,15, 122,30, 134,58, 142,94, 149,97, 162,53, 168,23, 168,77, 169,22, 169,99.

Preparación 11

10 Compuesto (15)



5'-Azido-N3-(1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-yl) timidina (15)

15 Se añadió sucesivamente a una solución de 14 obtenida en la Preparación 10 (1 g, 1,53 mmoles) en DMF anhidro (6 ml), PPh_3 (0,48 g, 1,84 mmoles), NaN_3 (0,50 g, 7,65 mmoles) y CBr_4 (0,61 g, 1,84 mmoles). Después de agitar durante 24 horas, la reacción se inactivó con metanol (1,5 ml) y se agitó durante 30 minutos más. El disolvente se eliminó a presión reducida y el producto se aisló después de purificación en gel de sílice (DCM/MeOH 100/0 después 97/3) como un sólido blanco. Rendimiento: 1,31 g (77%).

20 ^1H RMN (300 MHz, en CDCl_3) δ 1,72-1,97 (m, 15H), 2,10-2,17 (m, 1H), 2,30-2,33 (m, 1H), 3,49-3,65 (m, 2H), 4,00-4,22 (m, 3H), 4,25-4,31 (dd, 1H), 4,38 (m, 1H), 5,05-5,22 (m, 3H), 5,35-5,45 (m, 2H), 5,85 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,23 (t, $J = 6,4$ Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,85 (s, 1H).

^{13}C RMN (75 MHz, en CDCl_3) δ 12,47, 19,98-20,53, 35,76, 39,97, 52,09, 61,50, 67,56, 70,06, 71,07, 72,58, 74,72, 84,44, 85,32, 110,17, 122,68, 134,04, 143,49, 150,44, 162,87, 168,68, 170,50.

Ejemplo 1

25 5'-[4-(12-Hidroxidodecanoiloxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N3-(1-((β -D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil) timidina (5)

30 Se añadió a una solución desgasada del compuesto 9 obtenido en la Preparación 6 (1,182 g, 2,0 mmoles) y 1-azido- β -D-glucopiranososa (0,534 g, 2,0 mmoles) en 20 ml de THF/ H_2O (1:1), sulfato de cobre (32 mg, 0,2 mmoles) seguido de ascorbato de sodio (80 mg, 0,4 mmoles). La mezcla se agitó a 60°C durante 20 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, se eliminaron los disolventes a presión reducida. El sólido verde resultante se disolvió en metanol y se filtró a través de celita, la solución resultante se concentró a presión reducida y se aplicó a una columna de gel de sílice. El producto se eluyó con DCM/MeOH (9:1 a 8:2). Rendimiento: 0,84 g (55%).

35 ^1H RMN (300 MHz, en MeOD) δ 1,28-1,35 (s, 18H, CH_2), 1,51-1,60 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1,94 (s, 3H, CH_3 timina), 2,28-2,32 (dd, $J = 6,0$ Hz, 2H, H-2'), 3,45-3,60 (m, 5H, H-3, H-4, H-5, CH_2O), 3,66-3,72 (dd, $J = 12,0$, 5,2 Hz, 2H, H-6a), 3,84-3,91 (m, 2H, H-2, H-6b), 4,19-4,21 (m, 1H, H-4'), 4,42-4,45 (m, 1H, H-3'), 4,56 (s, 2H, CH_2 triazol), 4,75-4,78 (m, 2H, H-5'), 5,22 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}$ triazol), 5,58 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, H-1), 6,24 (dd, $J = 6,0$ Hz, 1H, H-1'), 7,31 (s, 1H, H-6 timina), 8,00 (s, 1H, H triazol), 8,11 (s, 1H, H triazol).

40 ^{13}C RMN (75 MHz, en MeOD) δ 11,80 (CH_3 timina), 25,56, 25,80, 29,23, 29,26, 32,27 (CH_2 y $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 35,62 (CH_2N triazol), 38,21 (C-2'), 51,21 (C-5'), 60,92 (C-6), 61,60 (CH_2O), 63,14 (OCH_2 triazol), 70,33 (CH_2O), 69,41, 76,93, 79,67 (C-3 o C-4 o C-5), 71,00 (C-3'), 72,50 (C-2), 84,27 (C-4'), 86,53 (C-1'), 88,15 (C-1), 109,82 (C-5 timina), 123,03, 124,82 (CH triazol), 135,47 (C-6 timina), 143,12, 144,72 (C cuat. triazol), 150,59, 163,37 (C=O timina).

HRMS: (M+Na) 773,3795 (calculado 773,3804)

Ejemplo 2

1,12-Bis-dodecanoil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β -D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina (6)

Se añadió a una solución de 4 obtenido en la preparación 4 (200 mg, 0,225 mmoles) y 1-azido-β-D-glucopiranososa (111 mg, 0,540 mmoles) en 12 ml de THF/H₂O (1:1), sulfato de cobre (14 mg, 0,09 mmoles) seguido de ascorbato de sodio (53 mg, 0,27 mmoles). La mezcla se irradió con agitación en un reactor de microondas (recipiente abierto equipado con un condensador de reflujo) a 200 W y 75° C durante 5 minutos. La mezcla bruta resultante se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con DCM/MeOH (8:2 a 7:3) para dar 5 y después 6. Rendimientos: 5, 16 mg (9,5%); 6, 177 mg (58%);

¹H RMN (300 MHz, en MeOD) δ 1,28-1,35 (s, 16H, CH₂), 1,52-1,61 (m, 4H, CH₂CH₂O), 1,92 (s, 6H, CH₃ timina), 2,27-2,31 (dd, J= 6,0 Hz, 4H, H-2'), 3,48-3,60 (m, 10H, H-3, H-4, H-5, CH₂O), 3,67-3,73 (dd, J= 12,0, 5,2 Hz, 2H, H-6a), 3,85-3,93 (m, 4H, H-2, H-6b), 4,17-4,22 (m, 2H, H-4'), 4,41-4,46 (m, 2H, H-3'), 4,56 (s, 4H, triazol CH₂O), 4,74-4,77 (m, 4H, H-5'), 5,21 (s, 4H, triazol CH₂N), 5,59 (d, J= 9,2 Hz, 2H, H-1), 6,23 (dd, J= 6,0 Hz, 2H, H-1'), 7,28 (s, 2H, H-6 timina), 7,99 (s, 2H, H triazol), 8,13 (s, 2H, H triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en MeOD) δ 11,80 (CH₃ timina), 25,76 (CH₂), 29,23 (CH₂CH₂O), 35,67 (CH₂N triazol), 38,21 (C-2'), 48,45 (C-5'), 60,95 (C-6), 63,16 (OCH₂ triazol), 69,42, 76,98, 79,69 (C-3, C-4, C-5), 70,32 (CH₂O), 70,98 (C-3'), 72,51 (C-2), 84,23 (C-4'), 86,63 (C-1'), 88,17 (C-1), 122,91, 124,79 (CH triazol), 135,44 (C-6 timina).

HRMS: (M+Na) 1321,5802 (calculado 1321,5783)

Ejemplo 3

5'-[4-((β-D-Glucopiranosiloxi)dodecanoiloxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]timidina (11)

Se añadió a una solución desgaseada del compuesto 10 obtenido en la Preparación 7 (0,87 g, 1,49 mmoles) en 24 ml de THF/H₂O (6:4), 1-azido-β-D-glucopiranososa (0,62 g, 3,00 mmoles), sulfato de cobre (120,00 mg, 0,60 mmoles) y ascorbato de sodio (47,80 mg, 0,30 mmoles). La mezcla se agitó a 60° C durante 3 horas. Después de la eliminación de los disolventes *in vacuo*, el sólido verde resultante se disolvió en metanol y se filtró a través de celita, la solución resultante se concentró a presión reducida y se aplicó a una columna de gel de sílice. El producto se eluyó con DCM/MeOH (8:2). Rendimiento: 0,81 g (54%).

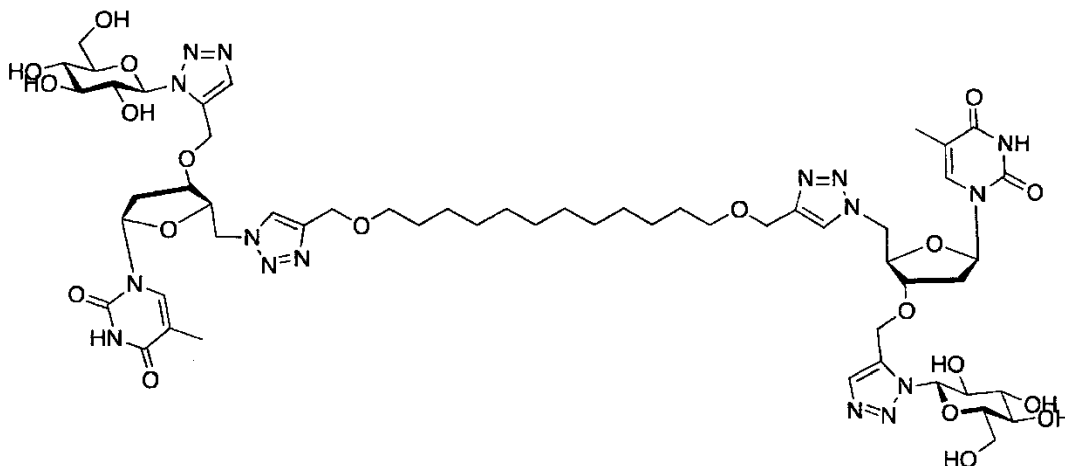
¹H RMN (300 MHz, en MeOD) δ 1,30-1,33 (m, 16H, CH₂), 1,50-1,62 (m, 4H, cadena-CH₂CH₂O), 1,93 (d, J= 1,0 Hz, 3H, CH₃ timina), 2,26-2,47 (m, 1H, H-2'), 3,49-3,60 (m, 10H, 2 cadena-CH₂O, H-3A, H-3B, H-4A, H-4B, H-5A, H-5B), 3,67-3,76 (2 dd, 2H, J= 11,6, 5,2 Hz, H-6A,a y H-6B,a), 3,85-3,97 (m, 4H, H-6A,b, H-6B,a y H-2A, H-2B), 4,33-4,37 (m, 2H, H-3' y H-4'), 4,56 (s, 2H, triazol-CH₂O), 4,68-4,70 (d, J= 4,7 Hz, 2H, triazol-CH₂O), 4,74-4,76 (m, 2H, H-5'), 5,22 (s, 2H, triazol-CH₂N), 5,58 (d, J= 9,2 Hz, 1H, H-1A o H-1B), 5,65 (d, J= 9,2 Hz, 1H, H-1B o H-1A), 6,19 (t, J= 7,0 Hz, H-1'), 7,30 (d, 1H, H-6 timina), 7,98, 8,13 y 8,25 (3s, 1H, CH triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en MeOD) δ 11,75 (CH₃ timina), 25,55, 25,80, 29,18, 29,22, 29,26, 29,33 (CH₂ y CH₂CH₂O), 32,26 (CH₂CH₂O), 32,50 (triazol-CH₂-timina), 51,07 (C-5'), 60,94 (C-6A, C-6B), 61,58 (cadena-CH₂O), 61,93 y 63,11 (triazol-CH₂O), 69,40, 69,44 (C-3, C-4 o C-5 A y B), 70,36 (cadena-CH₂O), 72,49, 72,61 (C-2A, C-2B), 76,98, 77,01 (C-3, C-4 o C-5 A y B), 78,49, 82,12 (C-3', C-4'), 79,69, 79,74 (C-3, C-4 o C-5 A y B), 87,04 (C-1'), 88,17, 88,25 (C-1A, C-1B), 122,93, 123,18, 124,79 (CH triazol), 135,53 (C-6 timina).

HRMS: (M+Na) 1016,4648 (calculado 1016,4859).

Ejemplo 4

1,12-Bis-dodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-3'-O-1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil timidina



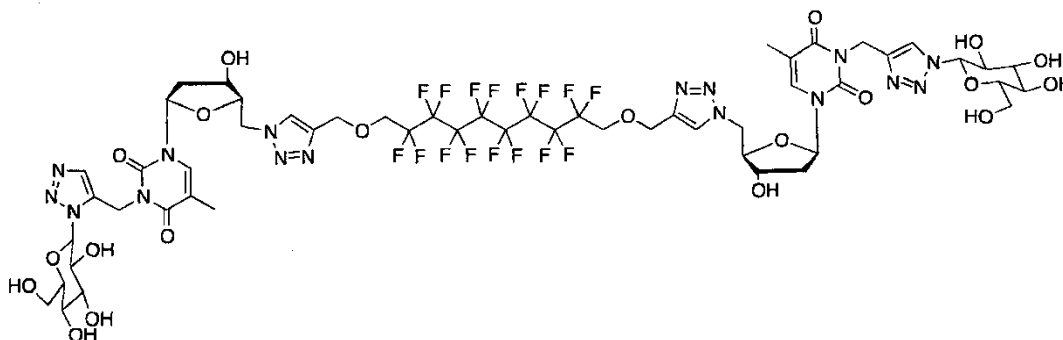
Se añadió a una solución desgaseada de 7 obtenido en la preparación 1 (139,0 mg, 0,5 mmoles) en 30 ml de THF/H₂O (2:1), 5'-azido-5'-desoxi-3'-O-1-((β-D-glucopiranosido tetraacetato)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil timidina [L. Latxague, A. Patwa, E. Amigues, P. Barthélémy, *Molecules* 18 (2013) 12241-63], sulfato de cobre (15,9 mg, 0,1 mmoles) y ascorbato de sodio (39,6 mg, 0,2 mmoles). La mezcla se agitó a 65° C durante 6 horas y después durante la noche a temperatura ambiente. Después de la eliminación de los disolventes *in vacuo*, el material bruto remanente se aplicó a una columna de gel de sílice. El producto se eluyó con DCM/MeOH (95:5) y después se sometió a una desacetilación de Zemplen. Rendimiento: 301 mg (46%).

¹H RMN (300 MHz, en MeOD @ 323 K) δ 1,30 (s, 16H, CH₂), 1,55-1,63 (m, 4H, CH₂CH₂O), 1,91 (s, 6H, CH₃ timina), 2,22-2,31 (m, 2H, H-2'a), 2,39-2,47 (m, 2H, H-2'b), 3,39 (t, *J* = 6,5 Hz, 4H, CH₂CH₂O), 3,54-3,66 (m, 6H, H-3, 4, 5), 3,74-3,81 (m, 2H, H-6a), 3,91-4,00 (m, 4H, H-2, 6b), 4,34-4,39 (m, 4H, H-3', 4'), 4,60 (s, 4H, OCH₂ triazol), 4,71-4,76 (m, 8H, H-5' y OCH₂ triazol), 5,66 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H, H-1), 6,18 (dd, *J* = 6,7 Hz, 2H, H-1'), 7,22 (s, 2H, H-6 timina), 7,96 (s, 2H, H triazol), 8,21 (s, 2H, H triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en MeOD @ 323 K) δ 9,75 (CH₃ timina), 24,49 (CH₂), 27,76, 27,89, 27,97 (CH₂ y CH₂CH₂O), 34,39 (C-2'), 49,87 (C-5'), 59,91 (C-6), 60,97 y 62,07 (CH₂ triazol), 68,47, 75,95, 78,55 (C,3, 4, 5), 69,20 (CH₂CH₂O), 71,49 (C-2), 77,42, 80,77 (C-3', 4'), 84,60 (C-1'), 87,08 (C-1), 109,44 (C-5 timina), 121,88, 123,43 (CH triazol), 135,32 (C-6 timina), 142,91, 143,87 (C-4 triazol), 149,51, 163,46 (C=O timina).

Ejemplo 5

1,10-Bis-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexafluorodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina



Se añadió a una solución desgaseada de 1,10-bis-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexafluorodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-propargil-5'-desoxi timidina obtenida a partir de 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexadecafluoro-1,10-decanodiol comercial sometido a un conjunto de reacciones similar a las mostradas en la Figura 1, a saber propargilación/acoplamiento con azidotimidina/propargilación de núcleo base (782,00 mg, 0,68 mmoles) en 15 ml de THF/H₂O (2:1), 1-azido-1-desoxiglucopiranososa, sulfato de cobre (26,90 mg, 0,14 mmoles) y ascorbato de sodio (43,40 mg, 0,27 mmoles). La mezcla se agitó a 60° C durante la noche. Después de la eliminación de los disolventes *in vacuo*, el material bruto remanente se lavó con agua y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo oleoso se aplicó a una columna de gel de sílice. El producto se eluyó con DCM/MeOH (8:2 después 7:3). Rendimiento: 514,00 mg (48%).

¹H RMN (300 MHz, en MeOD) d 1,91 (d, *J* = 1,1 Hz, 6H, CH₃ timina), 2,28-2,32 (t, *J* = 6,2 Hz, 4H, H-2'), 3,47-3,58 (m, 6H, H-2,3,5), 3,66-3,71 (dd, *J* = 5,1, 12,1 Hz, 2H, H-6a), 3,83-3,90 (m, 4H, H-4, 6b), 4,09-4,18 (t, *J* = 14,1 Hz, 4H, CH₂CF₂), 4,17-4,22 (m, 2H, H-4'), 4,40-4,45 (dd, *J* = 5,2 Hz, 2H, H-3'), 4,74-4,79 (m, 8H, H-5' y OCH₂ triazol), 5,20 (s, 4H, OCH₂ triazol), 6,56 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H, H-1), 6,20 (dd, *J* = 6,7 Hz, 2H, H-1'), 7,29 (d, 2H, H-6 timina), 8,05 (s, 2H, H triazol), 8,10 (s, 2H, H-triazol).

¹³C RMN (75 MHz, en MeOD) d 10,14 (CH₃ timina), 34,15 (OCH₂ triazol), 36,72 (C-2'), 49,76 (C-5'), 59,47 (C-6), 63,11 (OCH₂ triazol), 64,97 (t, ²*J*_{C-F} = 26,0 Hz, CH₂CF₂), 67,98, 75,54, 78,22 (C2, 3 o 5), 69,60 (C-3'), 71,05 (C-4), 82,80 (C-4'), 85,44 (C-1'), 86,72 (C-1), 108,26 (C-5 timina), 121,36, 123,75 (CH triazol), 134,00 (C-6 timina), 141,91 (C-4 triazol), 149,05 y 161,87 (C=O timina).

Ejemplo 6

1,12-Bis-dodecanoil-5'-[(4-metilurea)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina (16)

Se añadió a una solución de 15 obtenido en la Preparación 11 (1 g, 1,47 mmoles) en 36 ml de *tert*-butanol/H₂O (1:1) el compuesto 12 obtenido en la Preparación 8 (243 mg, 0,67 mmoles), sulfato de cobre (33 mg, 0,13 mmoles) y ascorbato de sodio (53 mg, 0,27 mmoles). La mezcla se agitó a 75° C durante 20 horas. El disolvente se eliminó a presión reducida y el sólido residual se disolvió en DCM (150 ml) y después se lavó con agua (3x50 ml). El extracto

orgánico se secó (Na_2SO_4) y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con acetato de etilo/MeOH (10:0 a 90:10) y se obtuvo como un sólido blanco. Rendimiento: 0,90 g (78%).

5 ^1H RMN (300 MHz, en $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,23-1,32 (m, 20H, cadena CH_2), 1,76-2,00 (m, 15H), 2,17 (m, 2H), 2,95 (q, 4H), 4,08 (m, 6H), 4,20-4,36 (m, 8H), 4,57-4,73 (m, 4H), 4,97-5,11 (c, 4H), 5,16 (t, 2H), 5,54 (m, 2H), 5,66 (t, 2H), 6,21 (t, 2H), 6,31 (d, 2H), 7,50 (s, 2H), 7,85 (s, 2H), 8,26 (s, 2H).

^{13}C RMN (75 MHz, en $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,12, 20,32-20,96, 35,41, 36,36, 38,54, 51,53, 62,27, 67,97, 70,38, 71,18, 72,68, 72,85, 73,73, 84,20, 84,74, 85,72, 109,18, 123,07, 135,55, 143,81, 150,61, 158,32, 162,69, 168,68, 169,82, 170,03, 170,51.

10 Ejemplo 7: Prueba de gelación

Se calentaron las dispersiones acuosas (agua Milli-Q, $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$) que contenían 1,5% en peso de los compuestos 5 y 6 obtenidos en los ejemplos 1 y 2 hasta su disolución (a 45°C) y se dejaron enfriar gradualmente a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario. La masa agregada de sólido resultante fue estable a la inversión del recipiente cuando el tubo de ensayo se puso boca abajo, lo que muestra que los compuestos 5 y 6 forman geles.

15 Ejemplo 8: Medición del tamaño de partícula por dispersión dinámica de la luz (DLS)

20 Las mediciones del tamaño de partícula se realizaron por dispersión dinámica de la luz (DLS) con un aparato Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). La solución del compuesto 11 del ejemplo 3 (30 mg en 1 ml de agua Milli-Q) se extruyó a 50 nm para dar objetos con un promedio de diámetro de 5,9 nm. Este tamaño corresponde a sistemas micelares (la longitud del GNBA 11 es de aproximadamente 3,2 nm en una conformación extendida). El experimento se llevó a cabo dos veces.

Los perfiles de DLS que muestran el diámetro de la intensidad promediada del compuesto 11 se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 9: Reología

25 Las mediciones reológicas se llevaron a cabo en un reómetro Pro+ de Malvern Kinexus con geometría de placa-placa de acero (20 mm de diámetro). La placa inferior está equipada con un sistema de control de temperatura de Peltier, y todas las muestras se estudiaron a $25 \pm 0,01^\circ \text{C}$ a menos que se indique de otro modo. Se usó una trampa de disolvente para asegurar una temperatura homogénea y prevenir la evaporación del agua. Se mantuvo una distancia de separación de 0,3 mm entre las placas. Los geles basados en los compuestos 5 (ejemplo 1) y 6 (ejemplo 2) obtenidos en los ejemplos se calentaron a 55°C y el líquido resultante se colocó en el reómetro y se sometió a oscilaciones sinusoidales. Todas las mediciones se llevaron a cabo dentro del régimen viscoelástico lineal (LVR). Para este propósito las condiciones experimentales para conseguir un régimen viscoelástico lineal se determinaron realizando un barrido de tensión de amplitud desde 0,01 a 10% a una frecuencia angular de 1 Hz ($6,283 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$).

35 La Figura 4 muestra los resultados del barrido de frecuencia para los hidrogeles obtenidos a partir del compuesto 5 y 6 (a 23,10mM) a una tensión constante de 0,03%.

La Figura 5 muestra las mediciones de tensión escalonada del hidrogel obtenido a partir del compuesto 6 al 1% (p/v) a una frecuencia angular fija de $6,283 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1}$. Este experimento se repitió al menos tres veces para verificar su reproducibilidad.

40 Estos resultados muestran el comportamiento tixotrópico del hidrogel según la invención. La energía mecánica que se proporciona desestabiliza el gel, que es capaz de auto-regeneración cuando la tensión mecánica desaparece, sin causar el envejecimiento de la muestra (se observaron varios ciclos de tensión/ restauración de los módulos G' y G'').

Temperatura de transición de sol-gel (T_{gel})

45 La determinación de la temperatura de transición gel-sol también se puede determinar por reología. El hidrogel (al 3% p/v, producto 6 del ejemplo 2) se calentó progresivamente de 25 a 60°C ($3^\circ \text{C}/\text{minuto}$). La tensión oscilatoria aplicada se ajustó a 5 Pa a una frecuencia constante (1 Hz). El punto de transición sol-gel se tomó como la temperatura a la que el gel se convirtió en un líquido. Esta temperatura de fusión se alcanza en la intersección de los módulos viscoelásticos (G' y G''). Este valor es de 46°C que es compatible con el cultivo celular en estado de gel (37°C).

50 Ejemplo 10: Citotoxicidad y citocompatibilidad

Los experimentos se realizaron usando el compuesto 6 del ejemplo 2, a saber el 1,12-bis-dodecanoil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β -D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina.

a) Cultivo celular - Aislamiento y cultivo de hASCs

Se aislaron células madre mesenquimales del tejido adiposo humano. Se obtuvo grasa subcutánea humana de pacientes sanos de 20 a 80 años de edad que se sometieron a cirugía de la cadera en Bordeaux Pellegrin CHU (Bordeaux, Francia). Se separó la masa de grasa de otros tejidos, se lavó con PBS esterilizado, se cortó muy fina y se incubó con 0,1% (p/v) de collagenasa tipo I (Worthington, Lakewood, NJ, USA) a 37° C con agitación suave durante 1 hora y media. Después de la filtración y centrifugación, se eliminó la capa líquida superior y se trató la fracción vascular del estroma (SVF) remanente durante 10 minutos con ELB (tampón de lisis de eritrocitos; 155mM NH₄Cl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5,7mM K₂HPO₄, 7,4mM K₂HPO₄-3H₂O, 0,1 mM EDTA (todo de Sigma-Aldrich)), y después se centrifugó. La pellet se volvió a suspender en medio DMEM F12 (Invitrogen/Life Technologies, Serigny Pontoise, Francia) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (Lonza, Basilea, Suiza) y se filtró secuencialmente a través de coladores celulares de 100, 70 y 40 µm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). Las células se depositaron en placas y se cultivaron a 37° C en 5% de CO₂. El medio de cultivo se reemplazó cada dos días.

b) Cultivo celular - D1-ORL-UVA

D1-ORL-UVA (ATCC® CRL-12424) se cultivaron en DMEM (Invitrogen/Life Technologies) que contenía 10% de FBS, and 1% de Penicilina-Estreptomicina (Invitrogen/Life Technologies). El medio de cultivo se reemplazó cada dos días.

c) Preparación de la estructura 3D con la siembra de hASCs o D1

En todos los ensayos *in vitro*, el hidrogel obtenido a partir del compuesto 6 se preparó a una concentración de 3% (p/v). El polvo del compuesto 6 se solubilizó en PBS 1X con agitación (900 rpm) a 25° C durante 45 minutos. Después, cuando se formó el gel, se dejó a temperatura ambiente, sin agitación, durante de 3 a 4 horas. Para permitir la siembra de las células, se calentó el gel durante 30 minutos a 55° C. Una vez que se obtuvo la solución líquida, se enfrió rápidamente a 37° C y se mezcló muy bien con 10 µl de suspensión celular a una concentración de 1 millón de células por ml de gel. Finalmente, el hidrogel con las células se mantuvo con agitación (600 rpm), a 25° C durante 45 minutos. Después de este periodo, se añadió medio (250 µl / tubo) y los tubos se incubaron en una atmósfera controlada (5% de CO₂, 37° C)

d) Evaluación de la citotoxicidad del compuesto 6 y de la citocompatibilidad del gel BOLA

Se evaluó la citotoxicidad del compuesto 6 por la medición de la actividad metabólica celular (ensayo MTT). Las células (hASCs o D1) se sembraron en una placa de 96 pocillos (Nunc) a una densidad de 10.000 células/cm². El producto 6 se solubilizó a concentraciones desde 5µM a 5mM en medio de cultivo.

El ensayo de MTT se llevó a cabo después de 72 horas de incubación. Como un control positivo, se utilizó el medio de cultivo sin GNBA. Como control negativo, se añadió Triton X100 al medio de cultivo. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la actividad metabólica del control positivo. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm con sustracción del ruido de fondo a 630 nm.

La citotoxicidad del compuesto 6 se determinó por la prueba de MTT para medir la actividad metabólica de las células madre mesenquimales humanas (ASCs) 48 horas después de la incubación con concentraciones crecientes del compuesto 6. Los resultados se muestran como porcentaje del control positivo que consiste en medio de cultivo celular libre de BOLA. **: p<0,01 (Prueba -U de Mann-Whitney).

Los resultados, representados en la Figura 6, muestran que el compuesto 6 no es tóxico a las concentraciones de aproximadamente hasta 1mM.

Se evaluó también la viabilidad de las células mediante el uso del ensayo de actividad metabólica de Alamar Blue. Una solución de sal sódica de resazurina (Sigma-Aldrich), se suspendió a una concentración de 0,1 mg/ml en PBS 1X), y se diluyó a 1/10 (v/v) en el medio de cultivo. La solución se añadió a cada pocillo (250 µl) e incubó 3 horas a 37° C. Después de ese tiempo, la fluorescencia se midió a longitudes de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm. Las muestras por triplicado fueron analizadas para cada experimento. Los resultados se muestran en la Figura 7A.

La citocompatibilidad se determinó mediante la monitorización del metabolismo de alamar blue en células osteoblásticas de rata (A) o ASCs humanas (B) crecidas en geles basados en el compuesto 6. Los resultados se muestran como porcentaje del valor obtenido en el día 1. *: p<0,05; p<0,01 (Prueba -U de Mann-Whitney).

Los resultados se muestran en la Figura 7B.

La viabilidad se evaluó después de 1, 4 y 7 días mediante el uso de la tinción de Vivo/Muerto con calceína-AM y homodímero de etidio (Molecular Probes, Invitrogen, USA). Las células sembradas dentro de los geles se incubaron durante 1 hora a 37° C en medio de Hank suplementado con 1,25 µl de calceína-AM y 5 µl de EthD-1. Las muestras se observaron con un microscopio confocal (Leica TCS SPE).

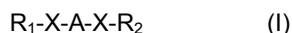
ES 2 660 752 T3

El teñido de Vivo/Muerto a las 2 semanas mostró una gran mayoría de células verde (vivas).

Los resultados muestran que el compuesto 6 no es citotóxico y tiene buena citocompatibilidad cuando se usa como medio de cultivo de células.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



en el que

5 - X is oxígeno, -NH-C(O)-NH- o -C(O)-NH-

- A es una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que esta sustituida o no sustituida con uno o más grupos alquilo C₁-C₁₂ lineal o ramificado, o A representa una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está parcial o completamente halogenada;

- R₁ y R₂, iguales o diferentes, representan hidrógeno o -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆

10 en donde

• n, m y p, idénticas o diferentes, son de 0 a 10;

• R₃ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 átomo(s) de oxígeno o átomo(s) de nitrógeno;

• R₄ representa un grupo nucleosidilo;

• R₅ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 heteroátomo(s);

15 • R₆ representa un residuo de un carbohidrato cíclico o un derivado de dicho carbohidrato; en donde dicho derivado se selecciona de un oligosacárido tipo glicano que deriva de dicho carbohidrato cíclico, un derivado de N-acetilo de dicho carbohidrato cíclico y un derivado protegido de dicho carbohidrato cíclico,

siempre que R₁ y R₂ no sean simultáneamente hidrógeno.

20 2. Un compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que al menos una de las siguientes condiciones se satisface:

- R₃ y R₅, iguales o diferentes, representan un grupo heteroarilo que contiene de 1 a 4 átomos de nitrógeno seleccionado del grupo que consiste de pirazol, triazol, tetrazol e imidazol;

- R₄ representa un grupo nucleosidilo seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, guanosina, desoxiguanosina, timidina, desoxitimidina, uridina, desoxiuridina, citidina y desoxicitidina.

25 - R₆ representa un residuo de un carbohidrato cíclico seleccionado de D-glucopiranososa, D-galactopiranososa, D-manopiranososa, D-fructopiranososa D-ribofuranosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilmanosamina y ácido siálico o un derivado protegido del mismo.

3. Un compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que:

- A representa una cadena de hidrocarburo C₁₂ saturada;

30 - R₁ es hidrógeno, o -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆;

- R₂ es -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆;

- n=m=p=1;

- R₃ es un grupo triazol;

- R₄ es timidina;

35 - R₅ es un grupo triazol, y

- R₆ es D-glucopiranosilo o 2,3,4,6 tetraglucopiranosilo O-protegido.

4. Un compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1, en el que:

- A representa una cadena de hidrocarburo C₁₀ que está parcialmente fluorada;

- R₁ y R₂ son -(CH₂)_n-R₃-(CH₂)_m-R₄-(CH₂)_p-R₅-R₆;

40 - n=m=p=1;

- R₃ es un grupo triazol;

- R₄ es timidina;

- R₅ es un grupo triazol, y

R₆ es D-glucopiranosilo o 2,3,4,6 tetraglucopiranosilo O-protégido.

5 5. Un compuesto de la fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R₅ está covalentemente unido a R₄, por medio de -(CH₂)_p-, al átomo de carbono en posición 5' del anillo de ribosa o desoxiribosa.

6. Un compuesto de la fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que R₅ está covalentemente unido a R₄, por medio de -(CH₂)_p-, al átomo de oxígeno en la posición 3' del anillo de ribosa o desoxiribosa.

10 7. Un compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste de:

5'-[4-(12-hidroxidodecanoiloxi)metil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-N3-(1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)timidina,

1,12-bis-dodecanoil-5'-[(4-oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina,

15 1,12-bis-dodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-5'-desoxi-3'-O-1-((β-D-glucopiranosido)-1-H-1,2,3-triazol-4-il)metil)timidina

1,10-bis-2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-hexafluorodecanoil-5'-[4-(oximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1-H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxitimidina, y

20 1,12-bis-dodecanoil-5'-[(4-metilurea)-1H-1,2,3-triazol-1-il]-N-3-[1-((β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]-5'-desoxi timidina.

8. Un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que X es oxígeno, que comprende los pasos siguientes:

- hacer reaccionar un alcanodiol o un fluoralcánodiol de fórmula R₁-O-A-O-R₂ en ambos extremos con un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH, donde q es 1 o 2 y R es un haluro, en particular cloruro o bromuro,

25 - hacer reaccionar el compuesto resultante con el derivado 5'-azido de R₄,

- hacer reaccionar la base de purina o pirimidina o el resto de base universal de R₄ en el compuesto resultante con un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH, donde q y R es como se definió anteriormente, para obtener el derivado N-alquilado de la base de purina o pirimidina o de la base universal, de R₄, y

- hacer reaccionar el compuesto resultante con el derivado 1-azido de R₆ (reacción de click).

30 9. Un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula (I) según la reivindicación 1 en el que X es -NH-C(O)-NH-, que comprende las etapas de :

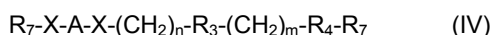
- hacer reaccionar un diisocianatoalcano de la fórmula OCN-A-NCO con NH₂-CH₂-C≡CH (propargilamina) o cualquier amina primaria que contiene un grupo alquino terminal para obtener un compuesto de la fórmula (II) CH≡C-CH₂-NH-C(O)-NH-A-NH-C(O)-NH-CH₂-C≡CH (II),

35 - hacer reaccionar una base de purina o pirimidina o una base universal con un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH, donde q es 1 o 2 y R es un haluro, preferiblemente bromuro o cloruro, para obtener el derivado N-alquilado de la base de purina o pirimidina o de la base universal de R₄,

- hacer reaccionar el compuesto resultante con el derivado 1-azido de R₆ (reacción de click),

40 - convertir el grupo 5'-OH del resto de la ribosa o desoxiribosa de R₄ en una azida, y someter el compuesto resultante a una segunda reacción de click con un compuesto de la fórmula (II).

10. Un compuesto de la fórmula (IV)



en el que

- X es -NH-C(O)-NH-;

45 - A es una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está no sustituida o

sustituida con uno o más grupos alquilo C₁-C₁₂ lineales o ramificados, o A representa una cadena de hidrocarburo C₄-C₃₀, lineal o ramificada, saturada o insaturada, que está parcial o completamente halogenada;

- R₃ representa un grupo heteroarilo que comprende de 1 a 4 átomo(s) de oxígeno o nitrógeno;

- R₄ representa un grupo nucleosidilo;

5 - R₇ es el resto de un agente alquilante de la fórmula R-(CH₂)_q-C≡CH donde q es 1 o 2 y R es un haluro; el cual está ligado a un enlace covalente con un átomo de nitrógeno de la purina, pirimidina o resto de la base universal de R₄;

- n y m, iguales o diferentes, son de 0 a 10.

11. El hidrogel formado de uno o más compuesto(s) de la fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10 12. El hidrogel según la reivindicación 11, caracterizado por que está formado de una solución acuosa de los compuestos de la fórmula (I) que contienen de 0,1 a 10% en peso del compuesto de la fórmula (I), en particular de 1 a 5%.

15 13. El hidrogel según las reivindicaciones 11 o 12, caracterizado por que comprende uno o más compuesto(s) de la fórmula (I), o una mezcla de uno o más compuesto(s) de la fórmula (I) y uno o más glicosil-nucleósido(s)-lípidos(s) (GNL) y/o glicosil-nucleósido(s)-fluorolípido(s) (GNF), o si no una mezcla de uno o más compuesto(s) de la fórmula (I) con una o más proteína(s) o glicoproteína(s), tales como por ejemplo colágeno o ácido hialurónico, donde dicha mezcla contiene, opcionalmente, uno o más GNL o GNF.

14. El uso de un hidrogel según las reivindicaciones 11 o 12, como medio de cultivo de células.

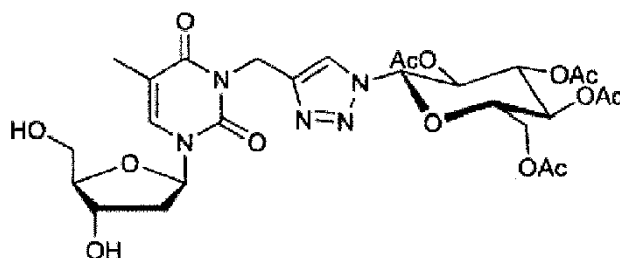
15. El uso según la reivindicación 14, en donde las células son células eucariotas.

20 16. El uso según la reivindicación 14, en donde las células son células madre.

17. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para uso como material biocompatible para ingeniería de tejidos, terapia celular o prevención de la formación de adhesiones después de la cirugía pelvicoabdominal.

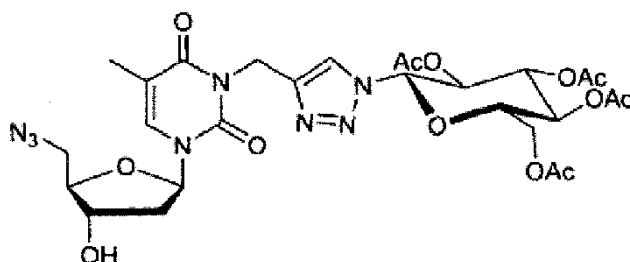
25 18. Un hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, para uso como material biocompatible para la entrega de liberación controlada de un ingrediente activo que está atrapado en el gel.

19. Un compuesto de la fórmula



5'-Desoxi-N3-(1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il) timidina (14)

o



30

5'-Azido-N3-(1-(2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido)-1H-1,2,3-triazol-4-il) timidina (15)

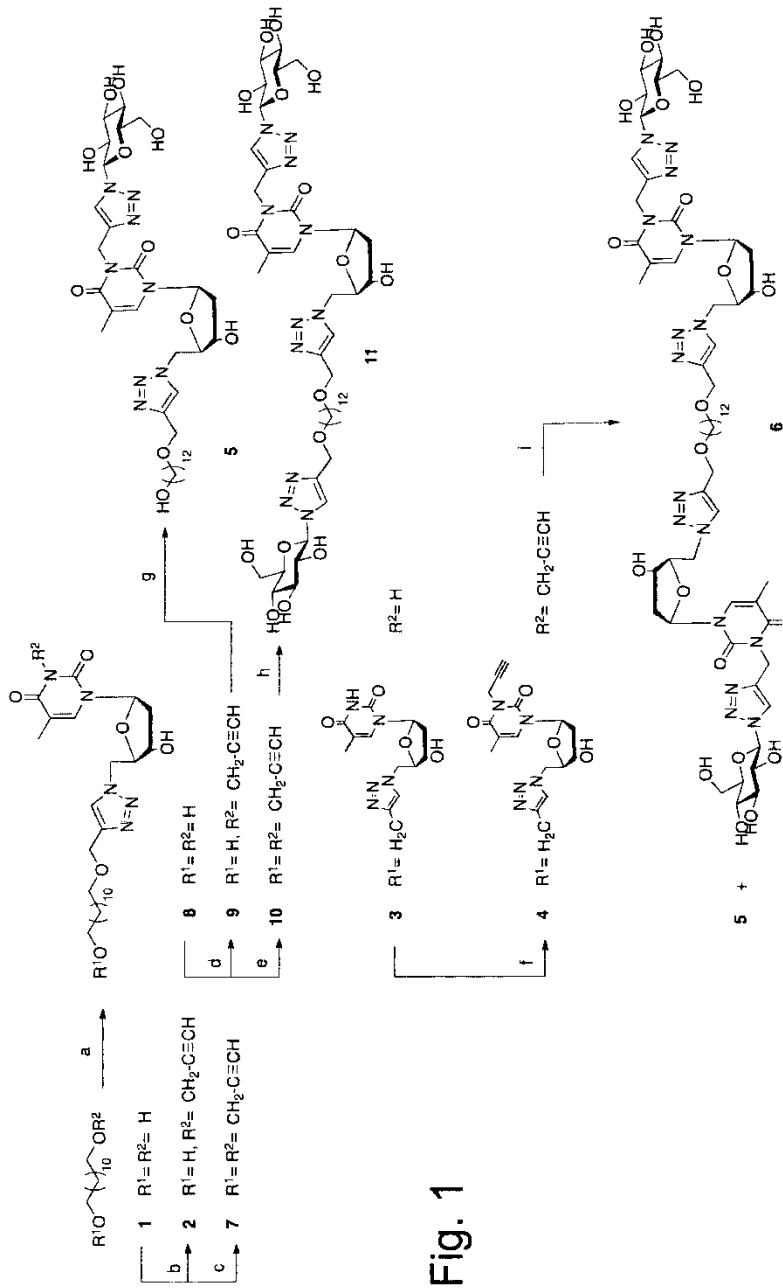


Fig. 1

- (a) Azido timidina, DCM/H₂O (1:1) 60° C, 20 horas CuSO₄/ascorbato sódico (91%) para 3: THF/H₂O, 4 horas (71%) para 8
- (b) Bromuro de propargilo/DMF, NaH, TBAI, Rendimiento (65%)
- (c) Bromuro de propargilo/DMF, NaH, ta (46%)
- (d) Bromuro de propargilo/DMF, K₂CO₃, TBAI, ta, 24 horas (87%)
- (e) Bromuro de propargilo/DMF, NaH, 0° C a ta (40%)
- (f) Bromuro de propargilo/DMF, K₂CO₃, TBAI, ta, (77%)
- (g) Azidoglucosa, THF/H₂O (1:1), CuSO₄/ascorbato sódico, 60° C, 18 horas (55%)
- (h) Azidoglucosa, THF/H₂O(1:1), CuSO₄/ascorbato sódico 60° C, 18 horas (54%)
- (i) Azidoglucosa, THF/H₂O(1:1), CuSO₄/ascorbato sódico 60° C, 18horas (54%) radiación de MW, 200 W, 75° C, 5 minutos (58% para 6 y 9, 5% para 5

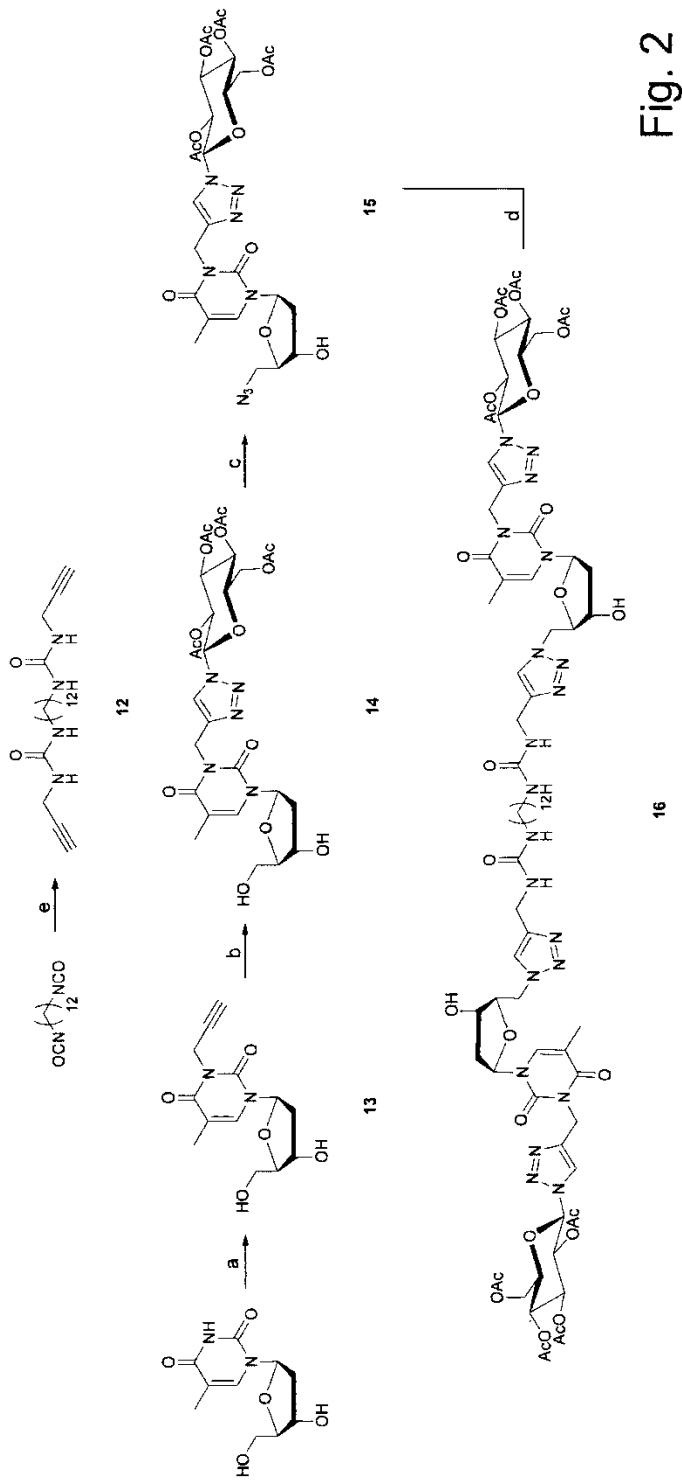


Fig. 2

- (a) Bromuro de propargilo, DMF, K₂CO₃, ta, 2 días (86%)
- (b) 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil azida terc-butanol/H₂O (1:1), CuSO₄/ascorbato sódico, 60° C, 20 horas (82%)
- (c) PPh₃, NaN₃, CBr₄, DMF, ta, 24 horas (88%)
- (d) 1,1'-(dodecan-1,12-dil)bis(3-(propargil)urea), *tert*-butanol/H₂O (1:1), CuSO₄/ascorbato sódico 60° C, 20 horas (78%)
- (e) Propargil amina, DCM, ta, 16 horas (99%)

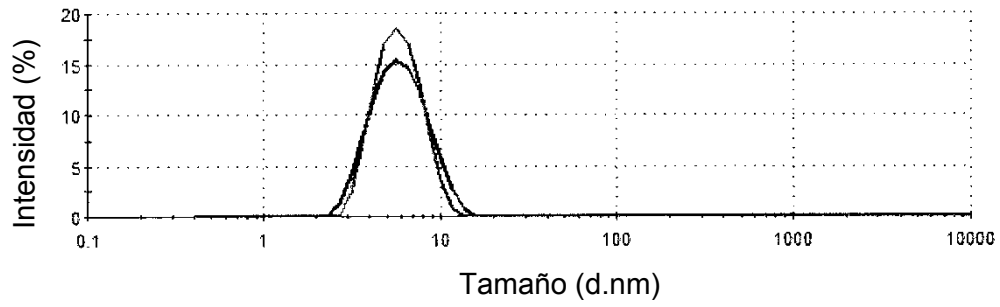


Fig. 3

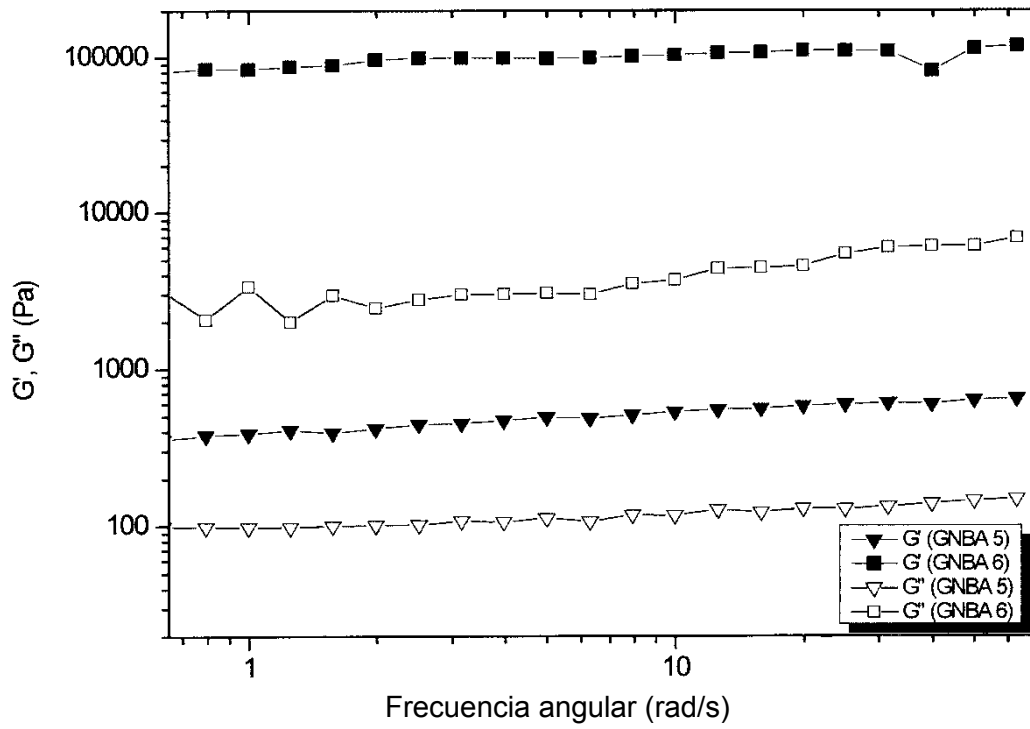
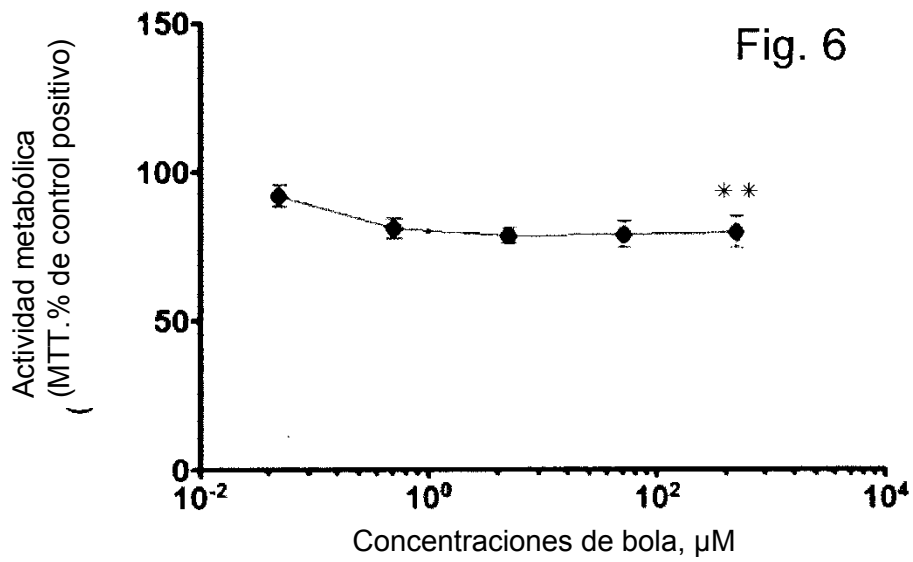
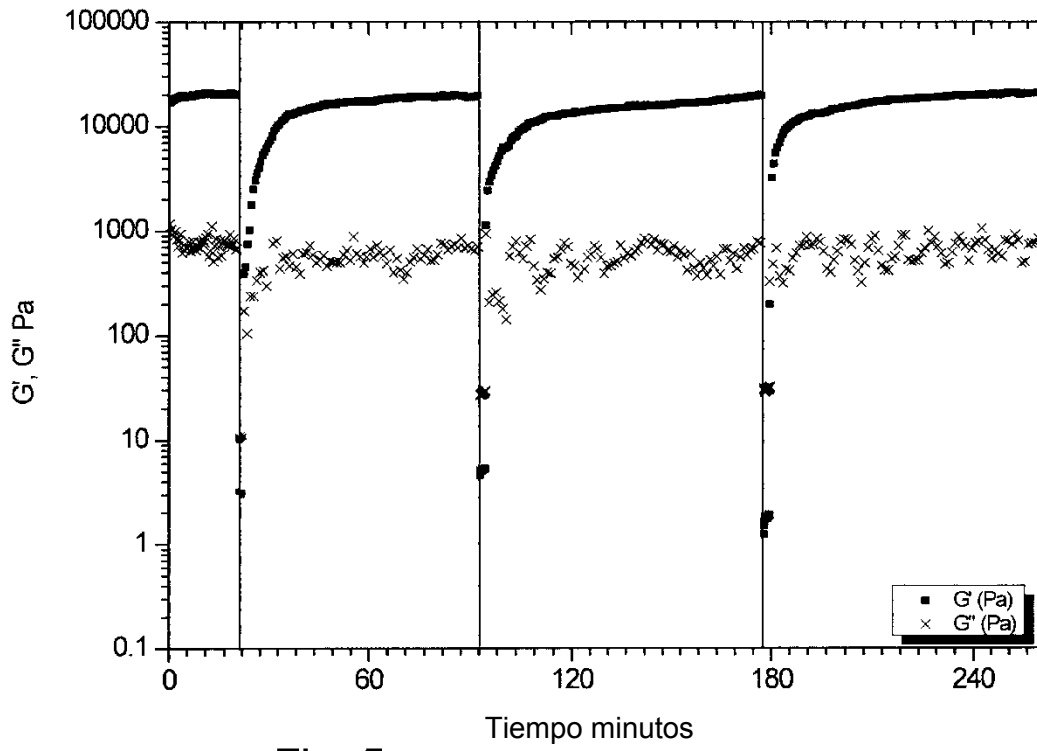


Fig. 4



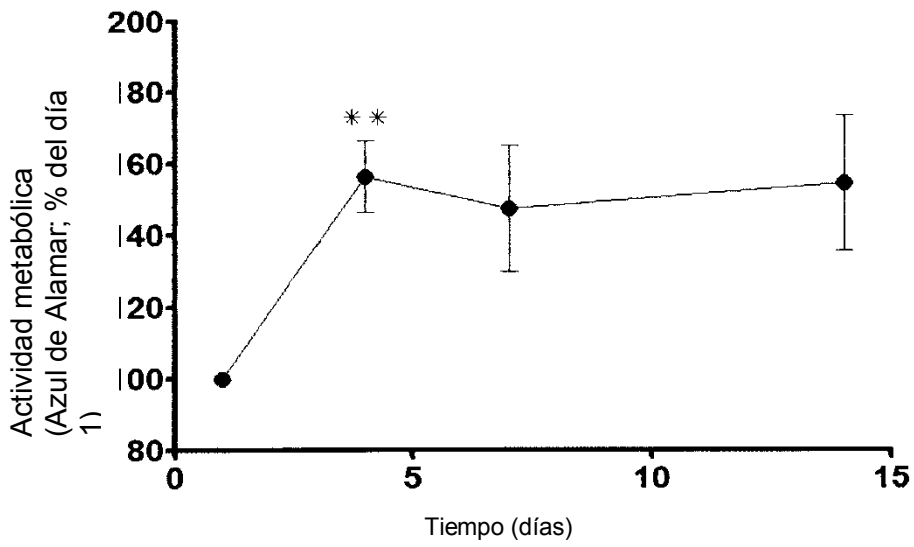


Fig. 7a

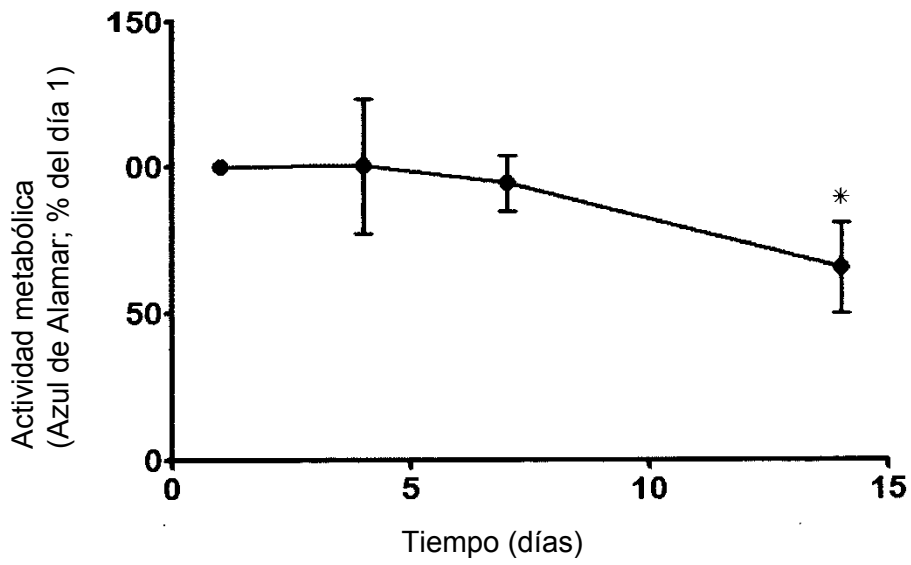


Fig. 7b