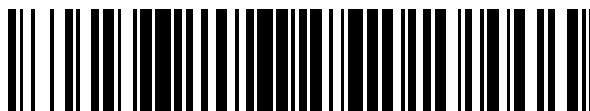


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 219**

51 Int. Cl.:

C07H 15/26 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 31/7056 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2014** **PCT/EP2014/068252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2015** **WO15028548**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014** **E 14758353 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 3039029**

54 Título: **Derivados multivalentes de ácido siálico**

30 Prioridad:

28.08.2013 SE 1350991

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2018

73 Titular/es:

ADENOVIR PHARMA AB (100.0%)

Kullagatan 8

252 20 Helsingborg, SE

72 Inventor/es:

ARNBERG, NIKLAS;

CARABALLO, RÉMI y

ELOFSSON, MIKAEL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 677 219 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

Derivados multivalentes de ácido siálico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos derivados multivalentes de ácido siálico, composiciones farmacéuticas que comprenden dichos derivados, y dichos compuestos para uso en un procedimiento para tratar o prevenir la queratoconjuntivitis epidémica (QCE) y otras enfermedades oculares causadas por virus, en las que el virus se une a los residuos siálicos terminales presentes en la superficie celular, mediante el uso de dichos compuestos.

Antecedentes

Los adenovirus humanos (AdVH), que pertenecen al género de adenovirus de los mamíferos (*Mastadenovirus*), son agentes infecciosos comúnmente encontrados. En humanos, los adenovirus se asocian a diversos síntomas clínicos, incluidas enfermedades oculares tales como conjuntivitis y queratoconjuntivitis epidémica (QCE).

Hasta la fecha, desafortunadamente no hay fármacos antivíricos específicos disponibles para el tratamiento de las infecciones por adenovirus. Los adenovirus son parásitos intracelulares estrictos, lo que indica que dependen por completo de la maquinaria de replicación de la célula. La inhibición selectiva de la replicación de adenovirus por compuestos antivíricos es, por lo tanto, muy difícil de conseguir, ya que algunas de las funciones esenciales de las células hospedadoras también se pueden ver alteradas. Sin embargo, un enfoque en la investigación de fármacos antivíricos actual consiste en bloquear los receptores celulares de los virus de modo que se impida su unión a y penetración en las células. No se ha registrado ningún fármaco basado en dicho bloqueo para su uso en el tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica (QCE).

Los adenovirus son de naturaleza ubicua y, por lo tanto, aún se están descubriendo nuevos serotipos. Así, aproximadamente 60 años después del aislamiento de los primeros AdVH, se han identificado más de 50 nuevos serotipos agrupados en siete especies (A-G).

La QCE es una infección ocular grave y altamente contagiosa que contraen millones de personas cada año. Entre los serotipos de adenovirus responsables de la QCE, el AdVH-8, el AdVH-19 y el AdVH-37 siguen siendo los principales agentes causantes de la infección, aunque recientemente también han surgido AdVH-53, AdVH-54 y AdVH-56 como tipos nuevos que causan QCE. Los síntomas asociados son queratitis, conjuntivitis, edema, dolor, lagrimeo, formación de pseudomembranas y pérdida de visión. Debido a que estos virus se transmiten por contacto (por ejemplo, por contacto de la mano con los ojos), la QCE es frecuente en áreas densamente pobladas y en salas médicas con medidas de higiene insuficientes. La infección suele durar hasta dos semanas; sin embargo, algunos pacientes continúan padeciendo discapacidad visual durante varios meses, años o incluso de forma permanente.

El ciclo de vida del virus se inicia mediante la unión de los adenovirus, a través de las cabezas de fibras homotriméricas, a glicanos que contienen ácido siálico que están situados en las células epiteliales de la córnea y/o la conjuntiva. Las cabezas de fibras, ubicadas en la parte más distal de cada una de las 12 fibras que sobresalen del virión de adenovirus, mantienen los dominios de reconocimiento de carbohidratos. Recientemente, las glicoproteínas con glicanos correspondientes a los glicanos de los gangliósidos GD1a se evidenciaron como receptores funcionales para la infección de células oculares por adenovirus causantes de QCE. La estructura cristalina del complejo AdVH-37-GD1a mostró que los residuos terminales de ácido siálico localizados en cada una de las dos ramificaciones del glicano de GD1a se acomodaron en dos de los tres sitios de reconocimiento de carbohidratos en la parte superior de la cabeza de fibra de AdVH-37.

Por lo tanto, la inhibición de los adenovirus con derivados de ácido siálico naturales o sintéticos puede evitar que el virión se una a, penetre en e infecte nuevas células (véase el documento WO 01/037846, entre otros). Como resultado, la infección se limitaría. Es importante destacar, y especialmente en el caso de la QCE, que las deficientes propiedades farmacológicas de los fármacos basados en carbohidratos, que incluyen el rápido aclaramiento del suero y la deficiente captación celular, se pueden evitar mediante el uso de un modo tópico de administración (por ejemplo, crema, ungüento, gotas para los ojos).

El documento WO 01/037846 divulga que las infecciones adenovíricas y, en particular, las infecciones adenovíricas oculares, por ejemplo la queratoconjuntivitis, se pueden tratar o aliviar mediante la administración de una sustancia, interfiriendo en la interacción entre el virus y el receptor de ácido siálico, tal como el ácido siálico, en una cantidad terapéuticamente eficaz. Desafortunadamente, las interacciones débiles entre carbohidratos y proteínas limitan el uso de carbohidratos como fármacos.

En la técnica se han divulgado diversas formas de sintetizar compuestos multivalentes para mejorar las interacciones entre carbohidratos y proteínas (véase, por ejemplo, Organic and Biomolecular Chemistry vol. 6(8), 2008, 1396-1409, Chembiochem 12(6), 2011, 887-895 y el documento WO 2007/011696).

Se han realizado intentos para superar dichas limitaciones usando un glicoconjugado con varios derivados de ácido siálico unidos a seroalbúmina humana (AS-SAH). Sin embargo, dichos glicoconjugados polivalentes no son adecuados como productos farmacéuticos por diversas razones. La estructura y composición exactas del AS-SAH variarán entre las diferentes moléculas. En consecuencia, el derivado AS-SAH representa un tipo de estructura que es difícil de definir estructuralmente. Además, la composición de los derivados AS-SAH variará entre diferentes lotes incluso si se producen de la misma manera. Desde una perspectiva de seguridad y regulación, esto es un inconveniente significativo. Además, el uso de una proteína, esto es, SAH, que se deriva del plasma humano, es una gran desventaja. El origen de SAH hace que sea difícil producir cantidades más grandes de un producto farmacéutico basado en SAH. Además, la contaminación por agentes infecciosos, tales como virus o priones, no se puede excluir en la SAH derivada de plasma humano. Por consiguiente, un producto basado en SAH no es adecuado como producto farmacéutico, y sería altamente deseable una alternativa polivalente.

En el documento WO 2011/003876 se divulgan nuevos derivados anfífilos de ácido siálico que forman agregados multivalentes en soluciones acuosas. Los agregados se divulgan para superar los inconvenientes asociados con el AS-SAH, siendo de ese modo útiles en el tratamiento de la QCE. Otros aspectos de dichos derivados han sido divulgados por Aplanter et al. en J. Med. Chem. 2011, 54, 6670.

Además, en la técnica se han descrito inhibidores multivalentes eficaces basados en ácido siálico unidos covalentemente de la infección por AdVH-37 de células epiteliales corneales humanas (ECH) (véase Spjut et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 6519; Johansson et al. Chembiochem 2005, 6, 358; y Johansson et al. Antivir. Res. 2007, 73, 92). Con el fin de eludir la eficacia relativamente baja de los derivados monovalentes de ácido siálico, los autores aprovecharon el sitio de unión trimérica en la cabeza de fibra de AdVH-37. El uso de derivados tri- y tetraivalentes de ácido siálico que se pueden unir simultáneamente a más de un dominio de reconocimiento de carbohidratos por cada cabeza, como se divulga en Spjut et al., mejoró considerablemente la potencia inhibidora en comparación con compuestos monovalentes de ácido siálico.

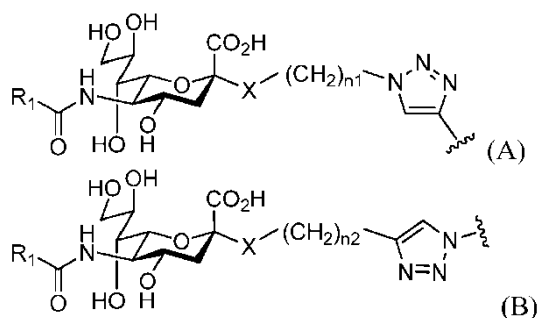
Por ejemplo, se informó de un compuesto denominado ME0322, que es un derivado trivalente sintético de ácido siálico en el que se usa ácido escuárico para unir el ácido siálico a una unidad central, con una potencia cuatro órdenes de magnitud mayor que el monosacárido natural de ácido siálico. Además, ME0322 fue tan eficaz como el conjugado ácido siálico-SAH heptadecavalente en la prevención de la unión del virus por la cabeza de fibra. Curiosamente, se encontró que ME0322 era mucho más potente que el conjugado con SAH en la inhibición de la infección de células epiteliales corneales humanas (ECH) por AdVH-37.

Si bien dicho compuesto, en efecto, muestra propiedades interesantes, aún resultaría útil proporcionar un derivado multivalente de ácido siálico que tenga incluso una potencia aún más mejorada en términos de evitar la unión de viriones de AdVH-37 a células epiteliales corneales humanas (ECH).

Por lo tanto, todavía existe una necesidad en la técnica de un derivado multivalente de ácido siálico de bajo peso molecular que presente una alta eficacia para evitar la unión de viriones de AdVH-37 a células epiteliales corneales humanas (ECH). Dicho derivado sería útil para tratar y prevenir la QCE.

Sumario

En consecuencia, la presente invención busca mitigar, aliviar, eliminar o eludir una o más de las deficiencias identificadas anteriormente en la técnica y desventajas, individualmente o en cualquier combinación, proporcionando un derivado trivalente o tetraivalente de ácido siálico, en el que dicho derivado comprende un resto central al que se unen 3 o 4 grupos de acuerdo con la fórmula A o B



en la que

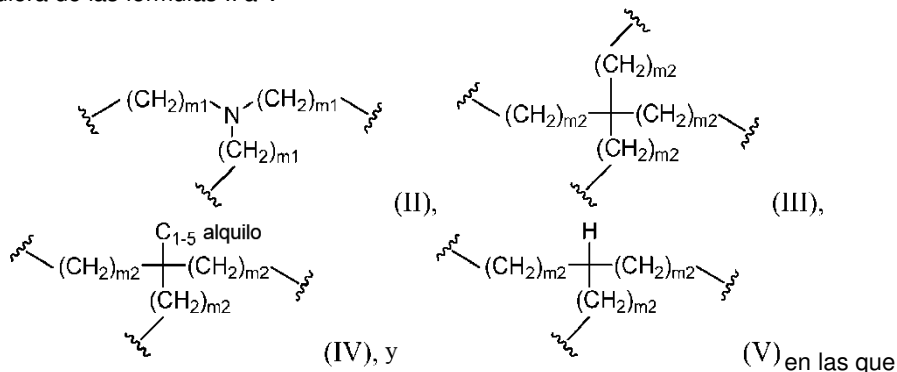
"X" es O (oxígeno) o S (azufre);

R1 es alquilo C1-3;

el número entero "n1" es de 2 a 8;

el número entero "n2" es de 1 a 8; y

la línea ondulada indica el punto de unión al resto central; en el que dicho resto central es un resto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas II a V



el número entero "m1" de la fórmula II es de 1 a 8 si los grupos unidos al resto II son grupos de acuerdo con la fórmula A;

el número entero "m1" de la fórmula II es de 2 a 8 si los grupos unidos al resto II son grupos de acuerdo con la fórmula B;

el entero "m2" es de 1 a 8; y

las líneas onduladas indican el punto de unión a los grupos de acuerdo con la fórmula A o B;

como una base libre, un ácido en su forma protonada no cargada, un zwitterión, una sal de adición farmacéuticamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal del mismo.

De acuerdo con aspectos de la invención:

"X" puede ser O (oxígeno); R1 puede ser metilo, el número entero "n1" puede ser de 2 a 3; dichos grupos pueden ser grupos de acuerdo con la fórmula A; y/o el peso molecular de dicho derivado en su forma libre es de 1500 Da o menos; o

"X" puede ser O (oxígeno); R1 puede ser metilo, el número entero "n2" puede ser 1, 2 o 3; dichos grupos pueden ser grupos de acuerdo con la fórmula B; y/o el peso molecular de dicho derivado en su forma libre es de 1500 Da o menos.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su administración en el ojo que comprende un derivado de ácido siálico del tipo descrito anteriormente en el presente documento y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser una composición acuosa que comprende de 0,001 a 10 mM, tal como de 0,01 a 1 mM, de un derivado de ácido siálico. El contenido en agua de dicha composición acuosa puede ser de al menos un 90 % en peso. Además, dicha composición acuosa puede comprender un agente, tal como glicerol, para proporcionar una solución isotónica.

De acuerdo con otro aspecto, el derivado de ácido siálico o la composición farmacéutica que comprende dicho derivado descritos anteriormente en el presente documento son para uso en terapia.

De acuerdo con otro aspecto, el derivado de ácido siálico o la composición farmacéutica que comprende dicho derivado descritos anteriormente en el presente documento son para uso en el tratamiento y/o prevención de una infección ocular causada por un virus, que se une a residuos siálicos terminales presentes en la superficie celular de la célula que va a resultar infectada por dicho virus. La infección puede ser una infección causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en AdVH-8, AdVH-19, AdVH-37, AdVH-53, AdVH-54 y AdVH-56. Además, la infección puede ser una queratoconjuntivitis epidémica.

Además, las características ventajosas de diversos modos de realización de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes y en la descripción detallada a continuación.

Descripción detallada de modos de realización preferentes

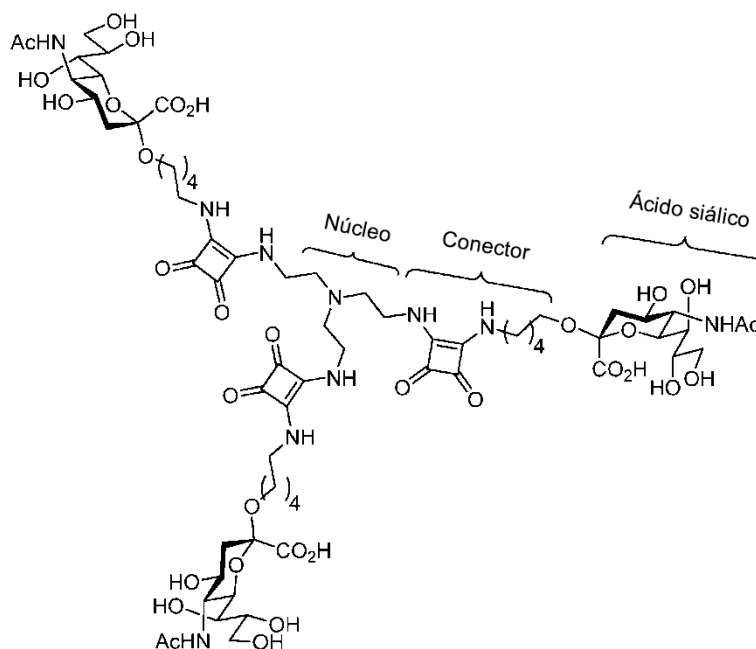
Como se usa en este documento, el término "sal de adición" pretende significar sales formadas por la adición de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácidos orgánicos o inorgánicos, o una base farmacéuticamente aceptable. El ácido orgánico puede ser, pero no se limita a, ácido acético, propanoico, metanosulfónico, bencenosulfónico, láctico, málico, cítrico, tartárico, succínico o maleico. El ácido inorgánico puede ser, pero no se limita a, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico o fosfórico. La base puede ser, pero no se limita a,

amoniaco e hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos. El término "sal de adición" también comprende los hidratos y las formas de adición de disolvente, tales como hidratos y alcoholatos.

- 5 Como se usa en el presente documento, "alquilo" usado solo o como un sufijo o prefijo, pretende incluir tanto grupos hidrocarburo alifáticos saturados de cadena lineal como ramificados que tienen un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, "alquilo C1-6" significa alquilo que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono.

Compuestos

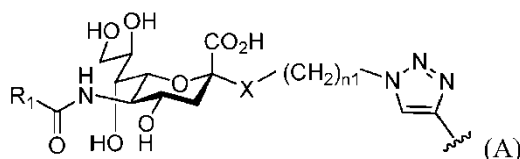
- 10 El derivado trivalente de ácido siálico denominado ME0322 (véase a continuación), conocido en la técnica por inhibir la unión de AdvH-37 a células epiteliales corneales humanas, tiene tres elementos principales, un resto central, residuos de ácido siálico y conectores, que conectan el resto central y los residuos de ácido siálico. En el conector está presente un residuo de acoplamiento basado en ácido escuárico. El derivado trivalente de ácido siálico ME0322 se diseñó de manera que proporcionara suficiente flexibilidad como para permitir la interacción
- 15 con los tres sitios de unión a ácido siálico de la cabeza de fibra de forma simultánea. Apparently, una estructura cristalina resuelta de un complejo de cabeza de fibra de AdvH-37 y ME0322 confirma que el compuesto es capaz de unirse a los tres sitios de unión a ácido siálico de forma simultánea, confirmando así que la flexibilidad proporcionada por los conectores es suficiente.

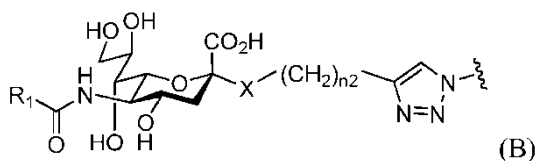


ME0322

- 20 Se especuló que reemplazar el residuo de ácido escuárico por otro residuo de acoplamiento, proporcionando medios para establecer contactos adicionales con los sitios de reconocimiento de carbohidratos en la cabeza de fibra de AdvH-37, podría aumentar potencialmente la afinidad de unión aún más. Sorprendentemente, los
- 25 presentes inventores también han confirmado que reemplazar el residuo de acoplamiento de ácido escuárico presente en ME0322 por un residuo de acoplamiento ácido de triazol da como resultado derivados de multivalentes de ácido siálico con potencia incrementada para prevenir la unión de AdvH-37 a células epiteliales corneales humanas.

- 30 Por lo tanto, un modo de realización se refiere a un derivado tri o tetravalente de ácido siálico, comprendiendo dicho derivado un resto central al que se unen 3 o 4 grupos de acuerdo con la fórmula A o B





en la que

"X" es O (oxígeno) o S (azufre);

R1 es alquilo C1-3;

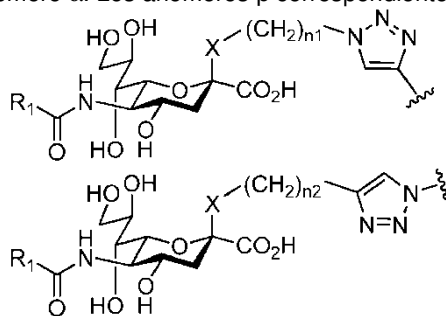
el número entero "n1" es de 2 a 8;

el número entero "n2" es de 1 a 8; y

la línea ondulada indicaba el punto de unión al resto central.

Dichos compuestos pueden estar presentes como bases libres, como ácidos en su forma protonada no cargada, como sales de adición farmacéuticamente aceptables, como solvatos, o como solvatos de una sal de adición farmacéuticamente aceptable. Dado que los compuestos comprenden un residuo de triazol alcalino, así como un resto carboxílico ácido, también pueden estar presentes como zwitteriones. Además, dicho compuesto puede estar presente como un estereoisómero puro, o en una mezcla racémica, diastereomérica, escalémica o anomérica que comprende dicho compuesto. Preferentemente, dicho compuesto está presente como un estereoisómero puro, o como una mezcla anomérica.

Si está presente en una mezcla anomérica, es preferente que prevalezca el anómero α . En consecuencia, es preferente un 75 % o más, tal como más de un 90 %, un 95 %, un 99 % o incluso más de un 99,9 % de un compuesto está presente como anómero α . Los anómeros β correspondientes se representan a continuación.



También son de interés los N- y S-glicósidos, aunque son preferentes los O-glicósidos. Por lo tanto, "X" en la fórmula A y B son "O" (oxígeno) de acuerdo con un modo de realización.

Para los derivados de SAH anteriores que se relacionan de alguna manera con el presente, se ha mostrado previamente (Johansson et al. J. Med. Chem. 2009, 52, 366) que R1 no está restringido a metilo en compuestos que tienen afinidad por los sitios de reconocimiento de carbohidratos de la cabeza de fibra de AdVH-37. Sin embargo, aunque R1 en derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico divulgados en el presente documento no está restringido a metilo, es preferente que R1 sea metilo.

En el derivado tri- o tetravalente de ácido siálico divulgado en el presente documento, el residuo de ácido siálico se une al residuo de triazol mediante un alquileo. Aunque es preferente un alquileo, también se podría considerar la sustitución del alquileo por, por ejemplo, un conector de PEG corto o un conector que comprende un resto cicloalquilo, tal como ciclopropilo (que no es parte de la invención). El alquileo puede ser de varias longitudes, es decir, de etileno a octileno para un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico que comprende grupos de acuerdo con la fórmula A y de metileno a octileno un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico que comprende grupos de acuerdo con la fórmula B. Sin embargo, es preferente que el alquileo sea etileno o propileno. Por lo tanto, es preferente que el número entero "n1" sea 2 o 3 en un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico que comprende grupos de acuerdo con la fórmula A. De manera similar, es preferente que el número entero "n2" sea 1, 2 o 3 en un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico que comprende grupos de acuerdo con la fórmula B.

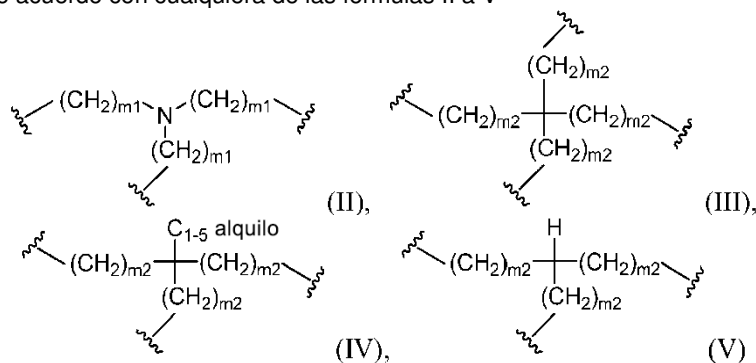
El derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento se puede obtener por acoplamiento de un residuo de ácido siálico que comprende un grupo azida con un resto central que comprende grupos etino en una cicloadición de Huisgen de azida-alquino catalizada por cobre (I) (véanse los detalles experimentales más adelante). De forma similar, un residuo de ácido siálico que comprende un grupo etino se puede acoplar a un resto central que comprende grupos azida en presencia de cobre (I). De acuerdo con un modo de realización, los derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico como se divulgan en el presente documento comprenden grupos de acuerdo con la fórmula A. De acuerdo con otro modo de realización, los derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico como se divulgan en el presente documento comprenden grupos de

acuerdo con la fórmula B. Aparentemente, los compuestos que comprenden grupos de acuerdo con la fórmula B puede ser algo más potente que los compuestos que comprenden grupos de acuerdo con la fórmula A, al menos con ciertas longitudes del conector.

Aunque la tripropargilamina y la *tris(2-azidoetil)amina*, respectivamente, se resultaron ser útiles como restos centrales en la obtención de un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico con afinidad aumentada por los sitios de reconocimiento de carbohidratos en la cabeza de fibra de AdVH-37, la presente invención no está limitada en forma alguna únicamente a este tipo de resto central trivalente. Otros compuestos de moléculas pequeñas, estructuralmente bien definidos que comprenden tres o cuatro grupos etino, o azida, también se pueden acoplar a residuos de ácido siálico en presencia de cobre (I) para obtener derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico.

De acuerdo con un modo de realización, el peso molecular del derivado tri- o tetravalente de ácido siálico en su forma libre es de 2500 Da o menos, tal como 2000 Da o menos o 1500 Da o menos. Dado que los tres sitios de unión al ácido siálico de la cabeza de fibra están situados bastante cerca (es decir, a aproximadamente 10 Å) unos de otros, es preferente que los restos de ácido siálico del derivado tri- o tetravalente de ácido siálico no estén demasiado separados. Además, un resto central demasiado flexible o una distancia demasiado grande entre los residuos de ácido siálico pueden afectar negativamente la unión del derivado a la cabeza de fibra. Un derivado pequeño y más rígido también dará como resultado menos pérdidas de entropía cuando se une a la proteína de la cabeza de fibra y contribuirá así a una potencia mejorada.

Como ya se explicó, el resto central puede ser de varios tipos. De acuerdo con un modo de realización, el resto central es un resto de acuerdo con cualquiera de las fórmulas II a V



en la que

los grupos de acuerdo con la fórmula A o B unidos al resto I son grupos de acuerdo con la fórmula A;
 el número entero "m1" en la fórmula II es de 1 a 8 si los grupos de acuerdo con la fórmula A o B unidos al resto II son grupos de acuerdo con la fórmula A;
 el número entero "m1" en la fórmula II es de 2 a 8 si los grupos de acuerdo con la fórmula A o B unidos al resto II son grupos de acuerdo con la fórmula B;
 el entero "m2" es de 1 a 8; y
 las líneas onduladas indican el punto de unión a los grupos de acuerdo con la fórmula A o B.

Aunque la naturaleza exacta del resto central es de menor importancia para la afinidad de unión, de todos modos se ha encontrado que es preferente que el resto central sea un resto de acuerdo con la fórmula II. Además, preferentemente el número entero "m1" es de 1 a 3 y el número entero "m2" es de 1 a 3. Además, los grupos de acuerdo con la fórmula A o B unidos al resto II son de acuerdo con un modo de realización grupos de acuerdo con la fórmula A. De acuerdo con otro modo de realización, son grupos de acuerdo con la fórmula B.

De acuerdo con un modo de realización, un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento comprende grupos de acuerdo con la fórmula A y se selecciona del grupo que consiste en:

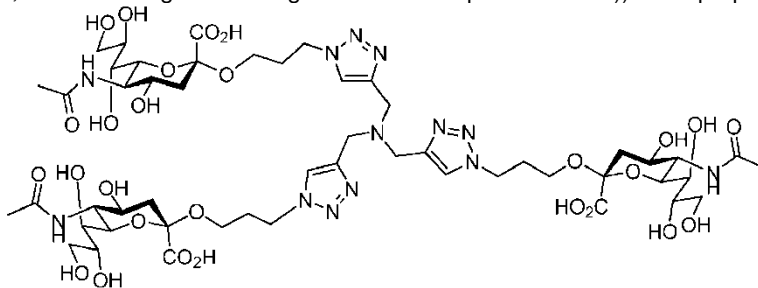
Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina;

Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina;

Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina; y

Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina

De acuerdo con dicho modo de realización, es preferente que el derivado tri- o tetravalente de ácido siálico sea Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-



1,2,3-triazol-4-il)metil)amina, es decir,

- 5 De acuerdo con otro modo de realización, el derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento comprende grupos de acuerdo con la fórmula B y se selecciona del grupo que consiste en:

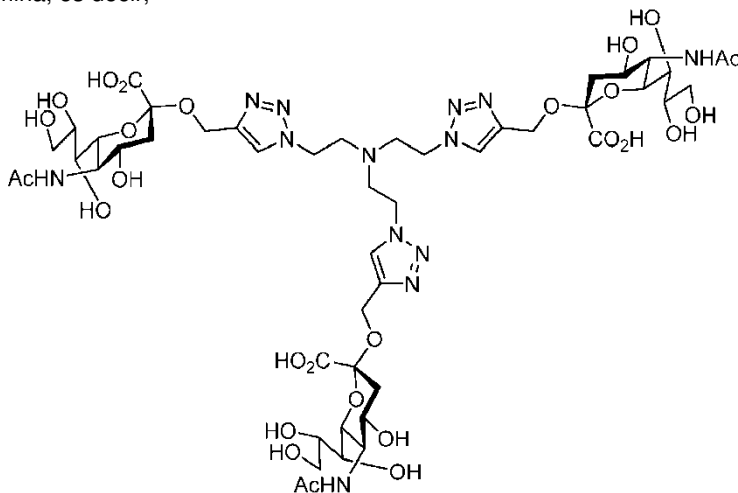
Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina;

- 10 Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina;

- 15 Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina; y

Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina.

- 20 De acuerdo con dicho modo de realización, es preferente que el derivado tri- o tetravalente de ácido siálico sea Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina, es decir,



25 Composición farmacéutica

- Otro modo de realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de la QCE, que comprende un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento. Dicha composición farmacéutica puede comprender además excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, diluyentes y/o estabilizantes. Dependiendo de la regulación aplicable, la composición farmacéutica se puede clasificar como un producto farmacéutico, o como un dispositivo médico, para el tratamiento o la prevención de una infección en los ojos. El mero hecho de que en el presente documento se haga referencia a la composición como una composición farmacéutica no se debe interpretar como que excluye el registro de la composición como un dispositivo médico.
- 35 Las propiedades de unión al virus del derivado tri- o tetravalente de ácido siálico implican que también se puede usar, por ejemplo, para evitar la contaminación de lentes de contacto, tal como en forma de una solución para lentes.

En este contexto, "farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que, a la dosificación y concentración empleadas, no causa ningún efecto no deseado en los sujetos a los que se administra. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica.

- 5 De acuerdo con un modo de realización, dicha composición farmacéutica como se divulga en el presente documento es una composición farmacéutica adecuada para administrarse en el ojo. Sin limitación, los ejemplos típicos de composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración en los ojos comprenden gotas para los ojos, ungüentos, aerosoles, apósitos y geles.
- 10 Una composición farmacéutica adecuada para la administración en el ojo puede ser una composición acuosa. Dicha composición acuosa puede tener un contenido en agua de un 90 % en peso de agua o más, tal como de un 90 a un 99,9, de un 95 a un 99 o de un 95 a un 98 % en peso de agua. Además, una composición acuosa que comprende un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento puede comprender de 0,001 a 10 mM, tal como de 0,01 a 1 mM, del derivado tri- o tetravalente de ácido siálico.
- 15 Además, una composición acuosa puede comprender un agente para proporcionar una solución isotónica. Por consiguiente, una composición acuosa puede comprender un agente seleccionado del grupo que consiste en cloruro de sodio, glicerol, polietilenglicol, sacáridos, tales como monosacáridos, por ejemplo, glucosa y manitol, y disacáridos, por ejemplo, sacarosa.
- 20 De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento es una composición acuosa que comprende un electrolito, tal como cloruro de sodio. Preferentemente, el contenido del electrolito debe estar cerca de la concentración isoosmótica, tal como aproximadamente un 0,9 % en peso para cloruro de sodio.
- 25 De acuerdo con otro modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento es una composición acuosa que comprende glicerol. El contenido en glicerol puede ser de un 2 a un 3 % en peso, tal como de un 2,3 a un 2,3 o de un 2,5 a un 2,7 % en peso. Preferentemente, dicho contenido debería estar cerca de la concentración isoosmótica, tal como aproximadamente un 2,6 % en peso.
- 30 Además, puede ser interesante ajustar el pH de la composición farmacéutica para proporcionar una composición que tenga un pH próximo al fisiológico. Por lo tanto, la composición farmacéutica de acuerdo con un modo de realización es una composición farmacéutica acuosa que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a 8. Preferentemente, dicho pH está más cerca del pH fisiológico, tal como de aproximadamente 7,2 a 7,8.
- 35 Dado que los derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico divulgados en el presente documento comprenden restos de ácido carboxílico ácidos, así como restos alcalinos, que incluyen restos de triazol, la composición farmacéutica puede comprender un ácido y/o base farmacéuticamente aceptable para ajustar el pH al nivel deseado. Además, la composición farmacéutica puede estar tamponada. Una composición farmacéutica
- 40 tamponada típicamente comprende especies tampón, tales como $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ o $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$. Además, la composición farmacéutica tamponada puede estar tamponada con borato.
- 45 De acuerdo con otro modo de realización, el pH de la composición farmacéutica es ligeramente menor que el fisiológico, tal como de aproximadamente 5 a 7. Una composición con un pH ácido, es decir, por debajo de 7, tiene la ventaja de ser menos susceptible al crecimiento de microorganismos. Además, el crecimiento de microorganismos se puede prevenir añadiendo un conservante a la composición farmacéutica. De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento comprende así un conservante. Ejemplos de dichos conservantes incluyen cloruro de benzalconio, ácido benzoico, hidroxianisol butilado, parabenos, tales como butilparabeno, propilparabeno, etilparabeno, metilparabeno y
- 50 mezclas de los mismos, fenoxietanol, alcohol feniletílico o ácido sórbico. Una composición farmacéutica que comprende un conservante puede ser más adecuada para el almacenamiento. Además, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento se puede esterilizar, tal como mediante esterilización por calor o mediante filtración estéril.
- 55 La composición farmacéutica como se divulga en el presente documento también puede comprender además otros excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como antioxidantes, agentes de isotonicidad adicionales, agentes colorantes y similares.
- 60 En modos de realización relacionados con composiciones farmacéuticas acuosas, la composición puede comprender agentes de suspensión y estabilizantes, tales como tensioactivos no iónicos, polímeros hidrófilos y similares.
- 65 De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento puede comprender un agente espesante. Típicamente, una composición farmacéutica que se ha de espesar es acuosa. Se pueden emplear agentes espesantes para crear una solución espesa, gel, jarabe, crema o ungüento. Para formar una solución espesa o gel se puede emplear un material formador de hidrogel. Dicho

material formador de hidrogel se puede seleccionar del grupo que consiste en polímeros sintéticos, polímeros semisintéticos y gomas naturales.

Los ejemplos de polímeros sintéticos incluyen alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, ácido poliacrílico, polietilenglicol, copolímeros de bloques de poloxámero. Los ejemplos de polímeros semisintéticos incluyen éteres de celulosa, tales como carboximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y etilhidroxietilcelulosa. Los ejemplos de gomas naturales incluyen goma arábica, alginato, carragenano, quitosano, pectina, almidón, goma de xantano.

Una solución espesa o gel se puede hacer mucoadhesiva empleando materiales tales como ácido hialurónico y sus derivados, ácidos poliacrílicos reticulados del tipo carbómero y policarbofilo, y polímeros que forman fácilmente geles, que se sabe que se adhieren fuertemente a las membranas mucosas.

De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento puede comprender un copolímero de bloques del tipo poloxámero. Es ventajoso usar el copolímero de bloques del tipo poloxámero, tal como polímeros que comprenden bloques de polietilenglicol y polipropilenglicol, ya que ciertos poloxámeros dispersados en agua son termorreversibles. Ejemplos de poloxámeros termorreversibles son el poloxámero 188 y el poloxámero 407.

Los poloxámeros termorreversibles dispersados en agua tienen una baja viscosidad, pero exhiben un marcado aumento de la viscosidad a temperaturas elevadas, dando como resultado la formación de un gel a temperatura corporal. De ese modo, el tiempo de contacto de una formulación farmacéutica administrada en la córnea relativamente caliente se puede prolongar. Por consiguiente, un modo de realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento que es termorreversible.

De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento puede comprender un compuesto antivírico adicional. Los ejemplos de tales compuestos incluyen N-clorotaurina y povidona yodada (PVP-I).

La N-clorotaurina (C1-HN-CH2-CH2-SO3H) es un agente antimicrobiano endógeno. Es un compuesto de cloro activo suave producido por granulocitos y monocitos durante la explosión oxidativa. Debido a su mecanismo de reacción inespecífico, esto es, la oxidación de grupos amino, compuestos tio y aromáticos, tiene una actividad microbiana de amplio espectro similar a los antisépticos. Se ha demostrado que la solución de sal de sodio de N-clorotaurina (C1-HN-CH2-CH2-SO3Na) mata bacterias y hongos in vitro. Además, se ha demostrado un efecto viricida. La povidona yodada es un complejo químico estable de polivinilpirrolidona (povidona, PVP) y yodo elemental.

De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento puede comprender un compuesto antivírico adicional, en el que dicho compuesto antivírico es un compuesto útil para tratar tópicamente infecciones causadas por herpes. Los ejemplos de dichos compuestos incluyen los análogos de guanosina aciclovir, valaciclovir, penciclovir y famciclovir, y foscarnet (fosfonoformiato de sodio hexahidratado).

De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento puede comprender un anestésico local. Dado que la QCE puede ser una enfermedad muy dolorosa, puede ser ventajoso incluir un anestésico local para aliviar el dolor. Además, dicho alivio del dolor puede tener la ventaja de alentar al paciente a continuar el tratamiento, aunque la administración en sí misma pueda ser dolorosa. Además, el uso de un anestésico local con un inicio rápido puede permitir que el paciente abra realmente el ojo para permitir una administración adicional de la composición directamente en la córnea. Los ejemplos de anestésicos locales útiles incluyen lidocaína, prilocaína y ropivacaína.

Terapia

De acuerdo con otro modo de realización, un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico, o una composición farmacéutica, como se divulga en el presente documento se puede usar en terapia

Tratamiento de infecciones oculares

Como ya se ha divulgado anteriormente, se descubrió que los derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico como se divulgan en el presente documento inhiben la unión de AdVH-37 a células corneales humanas.

Por consiguiente, un modo de realización de la invención se refiere a un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico o una composición farmacéutica, como se divulga en el presente documento, para uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección ocular causada por un virus, en la que virus que se une a residuos siálicos terminales presente en la superficie celular de la célula que va a resultar infectada por dicho virus.

De forma similar, un modo de realización de la invención se refiere al uso de un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico o una composición farmacéutica, como se divulga en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección ocular causada por virus, en la que el virus se une a residuos terminales de ácido siálico presentes en la superficie celular de la célula que va a resultar infectada por dicho virus. También se divulga un procedimiento de prevención y/o tratamiento de una infección ocular causada por un virus, en la que el virus se une a residuos terminales de ácido siálico presentes en la superficie celular de la célula que va a resultar infectada por dicho virus, tal como QCE, que comprende administrar a un mamífero, incluido el hombre, que necesita dicha prevención y/o tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento o una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un derivado tri- o tetravalente de ácido siálico como se divulga en el presente documento. Preferentemente, dicho derivado tri- o tetravalente de ácido siálico o composición farmacéutica se administra en el ojo en dicho procedimiento.

Los ejemplos de virus que se unen a residuos terminales de ácido siálico presentes en la superficie de la célula y que permiten la infección de dichas células para causar infecciones, tales como infecciones oculares, incluyen AdVH-8, AdVH-19, AdVH-37, AdVH-53, AdVH-54 y AdVH-56. Los ejemplos de adenovirus que causan infecciones oculares al unirse a residuos terminales de ácido siálico presentes en la superficie celular incluyen AdVH-8, AdVH-19 y AdVH-37, siendo AdVH-37 un ejemplo típico.

De acuerdo con un modo de realización, la infección ocular que se debe tratar y/o prevenir mediante el uso del presente derivado tri- o tetravalente de ácido siálico o composición es la queratoconjuntivitis epidémica (QCE).

Una composición farmacéutica de acuerdo con los modos de realización de la presente invención se puede administrar a un paciente en una dosis farmacéuticamente eficaz. Por "dosis farmacéuticamente eficaz" se quiere decir una dosis que sea suficiente para producir los efectos deseados en relación con la afección para la que se administra. La dosis exacta puede depender de la actividad del derivado tri- o tetravalente de ácido siálico, de la forma de administración, la naturaleza y la gravedad del trastorno y/o enfermedad y de las afecciones generales, tales como la edad y el peso corporal del paciente.

De acuerdo con un modo de realización, una composición farmacéutica como se divulga en el presente documento se debe administrar una o varias veces al día. Típicamente, dicha composición farmacéutica se administrará tres veces al día, aunque también se puede usar otro régimen de dosificación.

Cuando se usa en el presente documento, "prevenir/prevención" no se deben interpretar en el sentido de que una afección y/o una enfermedad nunca pueda volver a ocurrir después del uso de un compuesto o composición farmacéutica de acuerdo con las modos de realización divulgados en este documento para lograr la prevención. Además, el término tampoco se debe interpretar en el sentido de que una condición no pueda ocurrir, al menos en cierta medida, después de dicho uso para evitar dicha condición. Por el contrario, "prevenir/prevención" significan que la condición que se debe prevenir, si se produce a pesar de dicho uso, será menos grave que sin dicho uso.

De acuerdo con un modo de realización, el tratamiento también abarca el tratamiento previo, es decir, el tratamiento profiláctico.

Observaciones generales

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a modos de realización ilustrativos específicos, no se pretende que esté limitada a la forma específica expuesta en el presente documento. Se debe apreciar que cualquier combinación de los modos de realización mencionados anteriormente está dentro del alcance de la invención. Por el contrario, la invención está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas, y otros modos de realización además de los específicos anteriores son igualmente posibles dentro del alcance de estas reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, el término "comprende/comprendiendo" no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Adicionalmente, aunque se pueden incluir características individuales en diferentes reivindicaciones, estas posiblemente se pueden combinar de forma ventajosa, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea viable y/o ventajosa. Además, las referencias singulares no excluyen una pluralidad. Los términos "uno", "una", "primero", "segundo", etc. no excluyen una pluralidad. Las frases "al menos uno" o "uno o más" se refieren a 1 o a un número mayor que 1, como a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

Parte experimental

Los siguientes ejemplos son meros ejemplos y de ninguna manera se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención. Más bien, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Figuras 1a, 2a y 2b: Efecto del conjunto de derivados trivalentes de ácido siálico sobre la unión de AdVH-37 y la infección de células ECH - Unión de virión en presencia de inhibidores a diferentes concentraciones (los datos se presentan como % de control que es el valor obtenido en ausencia de inhibidor) .

Figuras 1b, 3a y 3b: Efecto del conjunto de derivados trivalentes de ácido siálico sobre la unión de AdVH-37 y la infección de células ECH - Infección a diferentes concentraciones de los inhibidores (los datos se presentan como % de control que es el valor obtenido en ausencia de inhibidor).

Procedimientos químicos generales

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se registraron con un espectrómetro Bruker DRX-400 a 400 MHz y 100 MHz, respectivamente. Los experimentos de RMN se realizaron a 298 K en CDCl_3 (pico del disolvente residual = 7,26 ppm (δH)), CD_3OD (pico del disolvente residual = 3,31 ppm (δH) y 49,00 ppm (δC)) y D_2O (pico del disolvente residual = 4,79 ppm (δH)).

LC-MS se llevó a cabo con un sistema Waters LC equipado con una columna Xterra C18 (50×19 mm, $5 \mu\text{m}$, $125 \text{ \AA}$), eluida con un gradiente lineal de CH_3CN en agua, ambos conteniendo ácido fórmico (0,2 %). Se utilizó un caudal de 1,5 ml/min y la detección se realizó a 214 nm. Los espectros de masas se obtuvieron en un Waters Micromass ZQ 2000 usando ionización por electronebulización positiva y negativa.

Se realizaron separaciones de HPLC semipreparativa en un sistema de HPLC Gilson, usando una columna Nucleodur C-18 HTEC de $5 \mu\text{m}$ (VP 250/21) con un caudal de 20 ml/min, detección a 214 nm y sistema de eluyente: A. CF_3COOH ac. al 0,005 % en agua, y B. CF_3COOH al 0,005 % en CH_3CN .

La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice (Merck, $60 \text{ \AA}$, ASTM 70-230 mesh). La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck) con detección bajo luz UV y/o desarrollo con H_2SO_4 al 5 % en EtOH y calor.

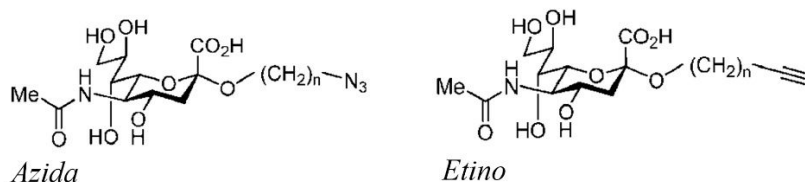
Las rotaciones ópticas se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer 343 a 20°C . Los disolventes orgánicos se secaron usando un sistema Glass Contour Solvent Systems (SG Waters USA), excepto el CH_3CN y el MeOH que se secaron sobre tamices moleculares $3 \text{ \AA}$.

Todos los reactivos comerciales se usaron tal como se recibieron.

El compuesto denominado **ME0322** se sintetizó de acuerdo con el procedimiento publicado (véase Spjut et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 6519). Todos los compuestos diana eran ≥ 95 % puros de acuerdo con la presencia de trazas en HPLC y UV. Las estadísticas se calcularon utilizando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA).

Procedimientos sintéticos*General*

Los compuestos de la presente invención se pueden obtener proporcionando ácido siálico con un conector, típicamente un conector alquileo, que tiene un grupo terminal reactivo, esto es, un grupo azida (véase el compuesto representado a la izquierda a continuación) o grupo etino (véase el compuesto representado a la derecha a continuación).



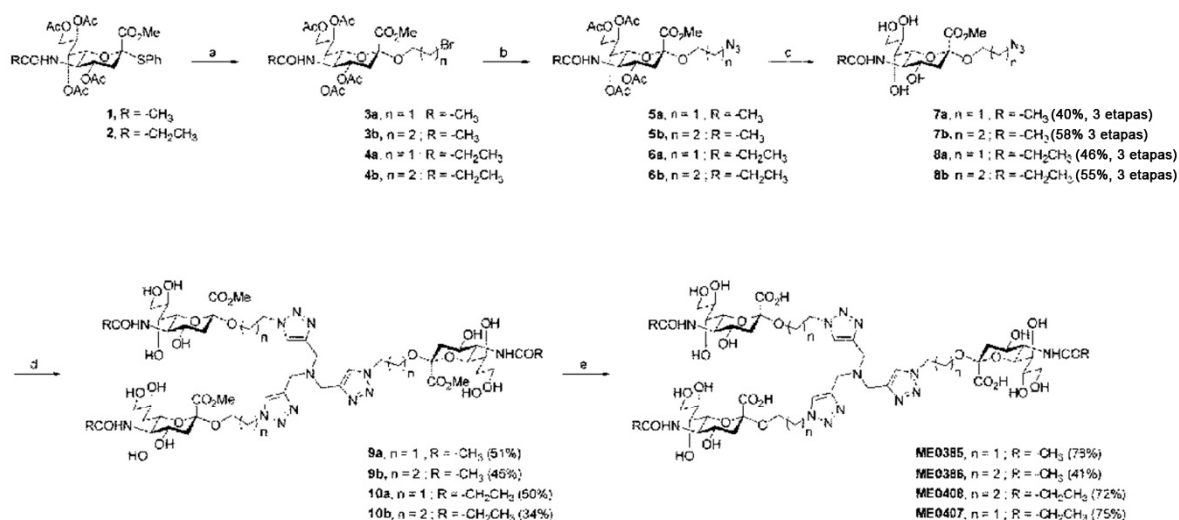
Al permitir que el ácido siálico proporcionado con un grupo terminal reactivo reaccione con un resto central que tiene 3 o 4 grupos reactivos, es decir, restos de azida o etino, en una cicloadición de Huisgen de azida-alquino, típicamente en presencia de cobre (I) que actúa como catalizador, se pueden obtener los compuestos de la presente invención. Como reconocerá fácilmente el experto, puede ser ventajoso, o incluso necesario, proteger diversos grupos en diversas etapas de la síntesis. El experto está familiarizado con los grupos que se utilizarán.

Ejemplo 1

Uso de tripropargilamina como resto central

La ruta para obtener ácidos siálicos trivalentes *N*-acilo no modificados, tal como Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**ME0385**) y Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**ME0386**), resultó sencilla y se podría lograr en ocho etapas a partir de productos químicos comercialmente disponibles o en cinco etapas a partir del intermedio clave **1** (esquema 1). La síntesis del derivado de tiofenilo del ácido siálico **1**, preparado fácilmente a partir de ácido siálico comercial, se realizó conforme a los procedimientos publicados (Marra et al., Carbohydr. Res. 1989, 187, 35). A continuación, se accedió a los sialósidos **3a** y **3b** mediante una buena conversión por glicosilación del alcohol correspondiente (2-bromoetanol y 3-bromopropan-1-ol, respectivamente) con el compuesto **1**. El uso de otros bromoalcoholes proporcionaría componentes básicos con conectores de otras longitudes. La reacción produjo una mezcla inseparable de anómeros, junto con el producto de eliminación resultante, que no se purificó adicionalmente en esta etapa. Los derivados de bromo **3a** y **3b** se convirtieron fácilmente en sus análogos azido **5a** y **5b**. La posterior *O*-desacilación usando condiciones de Zemplén estándar proporcionó **7a** y **7b** anoméricamente puros con un rendimiento de un 40 % y 58 %, respectivamente, en tres etapas. A continuación, los compuestos **7a** y **7b** se hicieron reaccionar con tripropargilamina en una reacción de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (reacción de "clic"). Así, los ésteres metílicos **9a** y **9b** se obtuvieron con un rendimiento de un 51 % y 45 %, respectivamente. La posterior saponificación proporcionó los compuestos diana finales **ME0385** y **ME0386** con un rendimiento de un 76 % y 41 %, respectivamente.

El uso de otros derivados de etino distintos de la tripropargilamina en la cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre permitiría acceder a otros tipos de derivados tri- o tetravalentes de ácido siálico.

Esquema 1.^a Síntesis de ME0385 y ME0386

^aReactivos y condiciones: (a) i: tamiz molecular 3Å, 2-bromoetanol o 3-bromopropan-1-ol, CH₃CN/CH₂Cl₂ (3:2), t.a., 2 h; ii: AgOTf, IBr, -73 °C, 4,5 h; iii: DIPEA, -73 °C, 30 min. (b) NaN₃, TBAI, DMSO, t.a. (c) i: NaOMe, MeOH, t.a., 3 h; ii: resina de intercambio de iones H⁺. (d) Tripropargilamina, CuSO₄, ascorbato de sodio, THF/H₂O (1:1), 50 °C, 3 h seguido de t.a., 18 h. (e) i: LiOH, MeOH, t.a., 9 h; ii: resina de intercambio de iones H⁺.

Los ácidos siálicos trivalentes *N*-modificados Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina **ME0408** y Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina **ME0407** se podrían producir en 13 etapas a partir de ácido siálico disponible comercialmente o 5 etapas a partir del intermedio clave **2** (esquema 1). La síntesis del compuesto **2** se realizó de acuerdo con los procedimientos publicados (Johansson et al., J. Med. Chem. 2009, 52, 3666). Las siguientes etapas fueron análogas a la ruta sintética descrita anteriormente para los compuestos **ME0385** y **ME0386**. Por lo tanto, las sucesivas reacciones de glicosilación, formación de azida y *O*-desacilación proporcionaron los productos anoméricamente puros **8a** y **8b** con un rendimiento de un 46 % y 55 % en tres etapas, respectivamente. La

reacción de "clic" posterior proporcionó los compuestos trivalentes **10a** y **10b** con un rendimiento de un 50 % y 34 %, respectivamente. Finalmente, la saponificación de los ésteres metílicos **10a** y **10b** dio los productos diana **ME0408** y **ME0407** con buenos rendimientos.

5 Procedimiento general para la reacción de glicosilación.

El donador de glicosilo **1** o **2** (1,0 equiv.) y tamices moleculares de 3 Å recién triturados (1,5 g/mmol) se disolvieron/suspendieron en una mezcla de CH₃CN/CH₂Cl₂ (3:2; 35 ml/mmol) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió 2-bromoetanol o 3-bromopropan-1-ol (4,5 equiv.) y la mezcla se agitó durante 2 h. La reacción se protegió de la luz y se añadió una solución de triflato de plata (2,0 equiv.) en CH₃CN. La mezcla se enfrió a -73 °C (-70 °C < t < -75 °C) y se añadió IBr (1,4 equiv., 1 M en CH₂Cl₂). La reacción se dejó avanzar durante 4,5 h a -73 °C. Una vez completada la reacción, se agregó DIPEA (6,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min adicionales a -73 °C y luego se dejó atemperar hasta temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite®, se lavó con CH₂Cl₂ o CH₃CN y los disolventes se concentraron a sequedad.

(2-Bromoetoxi-(5-N-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**3a**). El compuesto **3a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la reacción de glicosilación. La purificación por cromatografía en columna (gradiente *n*-heptano/EtOAc) proporcionó el compuesto **3a** y el correspondiente anómero inverso. El compuesto **3a** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(3-Bromo-propiloxi-(5-N-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**3b**). El Compuesto **3b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la reacción de glicosilación. La purificación por cromatografía en columna (gradiente *n*-heptano/EtOAc) proporcionó el compuesto **3b** y el correspondiente anómero inverso. El compuesto **3b** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(2-Bromoetoxi-(5-N-propanoilamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**4a**). El compuesto **4a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la reacción de glicosilación. La purificación por cromatografía en columna (Tolueno/EtOH, 10:1) proporcionó el compuesto **4a** y el correspondiente anómero inverso (390 mg, 95 %: α/β (6:1)). El compuesto **4a** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(3-Bromo-propiloxi-(5-N-propanoilamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**4b**). El compuesto **4b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la reacción de glicosilación. La purificación por cromatografía en columna (Tolueno/EtOH, 8:1) proporcionó el compuesto **4b** y el correspondiente anómero inverso (400 mg, 98%: α/β (22:3)). El compuesto **4b** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

40 Procedimiento general para la síntesis de derivados de azido.

A los derivados de bromo (1,0 equiv.) disueltos en DMSO (40 ml/mmol) se añadió sucesivamente azida sódica en porciones (6,0 equiv.) y TBAI (2,0 equiv.). La reacción se dejó avanzar durante 6 h a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez completada la reacción, la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a sequedad.

(2-Azidoetoxi-(5-N-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**5a**). El compuesto **5a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de derivados de azido. La purificación por cromatografía en columna (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) proporcionó el compuesto **5a** y el correspondiente anómero inverso (α/β (5:1)). El compuesto **5a** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(3-Azido-propiloxi-(5-N-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**5b**). El compuesto **5b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de derivados de azido. La purificación por cromatografía en columna (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) proporcionó el compuesto **5b** y el correspondiente anómero inverso (α/β (n.d.)). El compuesto **5b** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(2-Azidoetoxi-(5-N-propanoilamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**6a**). El compuesto **6a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de derivados de azido. La purificación por cromatografía en columna (tolueno/CH₂Cl₂/MeOH, 10:2:0,5) proporcionó el compuesto **6a** y el correspondiente anómero inverso (366 mg, cuantitativo; α/β (6:1)). El compuesto **6a** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

(3-Azido-propiloxi-(5-N-propanoilamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**6b**). El compuesto **6b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de derivados de azido. La purificación por cromatografía en columna (tolueno/CH₂Cl₂/MeOH, 8:2:0,5) proporcionó el compuesto **6b** y el correspondiente anómero inverso (419 mg, cuantitativo; α/β (22:3)). El compuesto **6b** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos.

A sialósido peracilado (1,0 equiv.) disuelto en MeOH (70 ml) se le añadió metóxido de sodio (3,9 equiv.). La reacción se dejó avanzar durante 3 h a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez completada la reacción, la solución se neutralizó por adición gota a gota de AcOH glacial o por Amberlyst® 15. El disolvente se concentró entonces a sequedad.

(2-Azidoetoxi-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**7a**). El compuesto **7a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos. La purificación por cromatografía en columna (EtOAc/EtOH/H₂O, 4:1:0,1) proporcionó el compuesto **7a** (256 mg, rendimiento de un 46 % en tres etapas).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3,93-4,02 (m, 1H, -OCH_{2b}-), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,80-3,84 (m, 2H, H-8, H-9_b), 3,77 (t, $J_{5,4} \approx J_{5,6} = 10,2$ Hz, 1H, H-5), 3,60-3,73 (m, 3H, H-4, H-9_a, -OCH_{2a}-), 3,58 (dd, $J_{6,5} = 10,7$ y $J_{6,7} = 1,8$ Hz, 1H, H-6), 3,51 (dd, $J_{7,8} = 8,7$ y $J_{6,7} = 1,8$ Hz, 1H, H-7), 3,27-3,43 (m, 2H, -CH₂N₃), 2,72 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 1H, H-3_{eq}), 2,00 (s, 3H, COCH₃), 1,77 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3ax,4} = 11,8$ Hz, 1H, H-3_{ax}).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 175,22, 170,71, 100,20, 75,05, 72,37, 70,18, 68,49, 64,74, 64,47, 53,79, 53,42, 51,74, 41,57, 22,66.

ESI-MS m/z calculado para C₁₄H₂₆N₄O₉ (M+H)⁺ 392,15 y C₁₄H₂₅N₄NaO₉ (M+Na)⁺ 415,14; encontrados 392,56 y 415,31, respectivamente.

(3-Azido-propiloxi-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**7b**). El compuesto **7b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos. La purificación por cromatografía en columna (EtOAc/EtOH/H₂O, 4:1:0,1) proporcionó el compuesto **7b** (289 mg, rendimiento de un 55 % en tres etapas).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3,80-3,92 (m, 6H, -OCH_{2b}-, H-9_b, H-8, OCH₃), 3,77 (t, $J_{5,4} \approx J_{5,6} = 10,2$ Hz, 1H, H-5), 3,61-3,69 (m, 2H, H-9_a, H-4), 3,59 (dd, $J_{6,5} = 10,3$ y $J_{6,7} = 2,0$ Hz, 1H, H-6), 3,51 (dd, $J_{7,8} = 9,2$ y $J_{6,7} = 1,9$ Hz, 1H, H-7), 3,43-3,50 (m, 1H, OCH_{2a}-), 3,38 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, -CH₂N₃), 2,68 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3eq,4} = 4,7$ Hz, 1H, H-3_{eq}), 2,00 (s, 3H, COCH₃), 1,75-1,85 (m, 2H, -CH₂-), 1,74 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3ax,4} = 11,8$ Hz, 1H, H-3_{ax}).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 175,22, 171,06, 100,21, 74,97, 72,45, 70,20, 68,52, 64,71, 62,09, 53,83, 53,38, 48,98, 41,69, 30,14, 22,65.

ESI-MS m/z calculado para C₁₅H₂₆N₄O₉ (M+H)⁺ 407,17 y C₁₅H₂₅N₄NaO₉ (M+Na)⁺ 429,16; encontrados 406,87 y 428,56, respectivamente.

(2-Azidoetoxi-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**8a**). El compuesto **8a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos. La purificación por cromatografía en columna (tolueno/CH₂Cl₂/MeOH, 3,5:6:0,5 a 3:6:1) proporcionó el compuesto **8a** (120 mg, 46 % de rendimiento en tres etapas).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3,94-4,00 (m, 1H, -OCH_{2b}-), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 3,80-3,84 (m, 2H, H-8, H-9_b), 3,77 (t, $J_{5,4} \approx J_{5,6} = 10,4$ Hz, 1H, H-5), 3,67-3,72 (ddd, $J_{4,3ax} = 11,6$, $J_{5,4} = 10,4$, $J_{4,3eq} = 4,6$ Hz, 1H, H-4), 3,60-3,66 (m, 2H, H-9_a, -OCH_{2a}-), 3,57 (dd, $J_{6,5} = 10,2$ y $J_{6,7} = 1,6$ Hz, 1H, H-6), 3,49 (dd, $J_{7,8} = 8,9$ y $J_{6,7} = 1,6$ Hz, 1H, H-7), 3,32-3,35 (m, 1H, -CH_{2b}N₃), 2,72 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 1H, H-3_{eq}), 2,27 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H, -COCH₂-), 1,76 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3ax,4} = 11,6$ Hz, 1H, H-3_{ax}), 1,14 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, -COCH₂).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 179,01, 170,73, 100,19, 75,09, 72,36, 70,17, 68,40, 64,72, 64,47, 53,64, 53,43, 51,73, 41,64, 30,16, 10,28.

ESI-MS m/z calculado para C₁₅H₂₇N₄O₉ (M+H)⁺ 407,18 y C₁₅H₂₆N₄NaO₉ (M+Na)⁺ 429,16; encontrados 407,09 y 429,02, respectivamente.

(3-Azido-propiloxi-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**8b**). El compuesto **8b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos. La

purificación por cromatografía en columna (tolueno/CH₂Cl₂/MeOH, 3,5:6:0,5 a 3:6:1) proporcionó el compuesto **8b** (157 mg, 55 % de rendimiento en tres etapas).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 3,80-3,89 (m, 3H, -OCH_{2b}-, H-9_b, H-8), 3,84 (s, 3H, OCH₃), 3,76 (t, $J_{5,4} \approx J_{5,6} = 10,2$ Hz, 1H, H-5), 3,60-3,69 (m, 2H, H-9_a, H-4), 3,58 (dd, $J_{6,5} = 10,2$ y $J_{6,7} = 1,6$ Hz, 1H, H-6), 3,49 (dd, $J_{7,8} = 8,9$ y $J_{6,7} = 1,6$ Hz, 1H, H-7), 3,43-3,50 (m, 1H, OCH_{2a}-), 3,38 (t, $J = 6,6$ Hz, 2H, -CH₂N₃), 2,68 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 1H, H-3_{eq}), 2,27 (q, $J = 7,6$ Hz, 2H, -COCH₂-), 1,75-1,83 (m, 2H, -CH₂-), 1,74 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3ax,4} = 11,8$ Hz, 1H, H-3_{ax}), 1,13 (t, $J = 7,6$ Hz, 3H, COCH₂CH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 178,99, 171,08, 100,20, 75,01, 72,43, 70,18, 68,42, 64,69, 62,07, 53,68, 53,39, 48,78, 41,76, 30,16, 30,13, 10,28.

ESI-MS *m/z* calculado para C₁₆H₂₉N₄O₉ (M+H)⁺ 421,19 y C₁₆H₂₈N₄NaO₉ (M+Na)⁺ 443,18; encontrados 420,99 y 442,93, respectivamente.

Procedimiento general para la síntesis de ácido siálico trivalente.

Al derivado de azido (3,7 equiv.) disuelto en THF/H₂O (1:1, 81 ml/mmol) se añadió sucesivamente tripropargilamina (1,0 equiv.), CuSO₄ (0,9 equiv.) y ascorbato de sodio (0,9 equiv.). La reacción se dejó avanzar a 50 °C durante 3 h y a temperatura ambiente durante 18 h adicionales. Después del consumo completo de la azida de partida, el THF se evaporó a vacío y el bruto se liofilizó. El sólido bruto se disolvió en DMSO y se purificó por HPLC (A: CF₃COOH ac. al 0,005 % en H₂O, B: CF₃COOH ac. al 0,005 % en CH₃CN, gradiente de fase orgánica de un 7 % a un 25 %). Las fracciones recogidas que contenían el compuesto se liofilizaron para proporcionar el producto puro.

Tris((1-(2-O-((metil-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil)onato))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**9a**). El compuesto **9a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ácido siálico trivalente (40 mg, 51 % de rendimiento).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,08 (s, 3H, 3ArCH), 8,01 (d, $J_{5,NH} = 8,4$ Hz, 3H, 3NH), 4,60 (t, $J = 5,0$ Hz, 6H, 3-CH₂-ArN), 4,15-4,27 (m, 3H, 3-OCH_{2b}), 3,70-3,97 (m, 27H, 3-OCH_{2a}, 3H-9_b, -N(CH₂)₃, 3H-8, 3H-5, 3-OCH₃), 3,55-3,67 (m, 9H, 3H-4, 3H-9_b, 3H-6), 3,48 (dd, $J_{7,8} = 8,8$ y $J_{6,7} = 1,4$ Hz, 3H, H-7), 2,58 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3eq,4} = 4,7$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 1,99 (s, 9H, 3-COCH₃), 1,71 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3ax,4} = 11,7$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 175,12, 170,47, 144,25, 126,94, 100,28, 75,07, 72,25, 70,16, 68,40, 64,84, 63,91, 53,68, 53,55, 51,47, 48,73, 41,44, 22,70.

ESI-MS *m/z* calculado para C₅₁H₈₂N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1308,54; encontrado 1309,47.

Tris((1-(2-O-(metil-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil)onato))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**9b**). El compuesto **9b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ácido siálico trivalente (60 mg, 45 % de rendimiento).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,01 (s, 3H, 3ArCH), 4,50 (t, $J = 6,6$ Hz, 6H, 3-CH₂-ArN), 3,70-3,88 (m, 27H, 3-OCH_{2b}-, 3H-9_b, 3-OCH₃, -N(CH₂)₃, 3H-8, 3H-5), 3,54-3,69 (m, 9H, 3H-4, 3H-9_b, 3H-6), 3,49 (dd, $J_{7,8} = 9,0$ y $J_{6,7} = 1,3$ Hz, 3H, 3H-7), 3,35-3,43 (m, 3H, 3-OCH_{2a}), 2,68 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,8$ y $J_{3eq,4} = 4,7$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,09-2,20 (m, 6H, 3-CH₂-), 2,00 (s, 9H, 3-COCH₃), 1,74 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,7$ y $J_{3ax,4} = 11,8$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 175,20, 170,86, 145,26, 125,97, 100,12, 74,92, 72,43, 70,19, 68,50, 64,77, 61,77, 53,80, 53,54, 48,48, 48,10, 41,65, 31,29, 22,72.

ESI-MS *m/z* calculado para C₅₄H₈₈N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1350,58; encontrado 1350,21.

Tris((1-(2-O-(metil-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil)onato))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**10a**). El compuesto **10a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ácido siálico trivalente (60 mg, 50% de rendimiento).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,04 (s, 3H, 3ArCH), 4,50 (t, $J = 5,1$ Hz, 6H, 3-CH₂-ArN), 4,16-4,23 (m, 3H, 3-OCH_{2b}), 3,86-3,92 (m, 3H, 3-OCH_{2a}), 3,74-3,84 (m, 15H, 3H-9_b, -N(CH₂)₃, 3H-8, 3H-5), 3,72 (s, 9H, 3-OCH₃), 3,59-3,67 (m, 6H, 3H-4, 3H-9_b), 3,57 (dd, $J_{6,5} = 10,4$ y $J_{6,7} = 1,3$ Hz, 3H, 3H-6), 3,47 (dd, $J_{7,8} = 8,9$ y $J_{6,7} = 1,3$ Hz, 3H, H-7), 2,58 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,4$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,25 (q, $J = 7,6$ Hz, 6H, 3-COCH₂-), 1,74 (aparecen como t, $J_{3eq,3ax} \approx J_{3ax,4} = 12,4$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}), 1,12 (t, $J = 7,6$ Hz, 9H, 3-COCH₂CH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 178,88, 170,43, 145,08, 126,66, 100,23, 75,04, 72,15, 69,97, 68,29, 64,73, 63,95, 53,60, 53,45, 51,43, 49,07, 41,52, 31,15, 10,36.

ESI-MS m/z calculado para $C_{54}H_{88}N_{13}O_{27}$ $(M+H)^+$ 1350,59; encontrado 1351,56.

Tris(((1-(2-O-(metil-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosil)onato))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**10b**). El compuesto **10b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la síntesis de ácido siálico trivalente (45 mg, 34 % de rendimiento).

1H -RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 8,03 (s, 3H, 3ArCH), 7,89 (d, $J_{5,NH} = 8,5$ Hz, 3H, 3NH), 4,50 (t, $J = 6,5$ Hz, 6H, 3-CH₂-ArN), 3,73-3,86 (m, 18H, 3-OCH_{2b}-, 3H-9_b-, -N(CH₂)₃, 3H-8, 3H-5), 3,81 (s, 9H, 3-OCH₃), 3,58-3,70 (m, 6H, 3H-4, 3H-9_b), 3,56 (dd, $J_{6,5} = 10,4$ y $J_{6,7} = 1,3$ Hz, 3H, 3H-6), 3,47 (dd, $J_{7,8} = 8,9$ y $J_{6,7} = 1,3$ Hz, 3H, 3H-7), 3,35-3,43 (m, 3H, 3-OCH_{2a}), 2,68 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,4$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,27 (q, $J = 7,6$ Hz, 6H, 3-COCH₂-), 2,10-2,20 (m, 6H, 3-CH₂-), 1,74 (aparece como t, $J_{3eq,3ax} \approx J_{3ax,4} = 12,4$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}), 1,13 (t, $J = 7,6$ Hz, 9H, 3-COCH₂CH₃).

^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD): δ 178,92, 170,88, 143,82, 126,16, 100,12, 75,01, 72,44, 70,22, 68,44, 64,72, 61,73, 53,67, 53,52, 49,28, 49,07, 41,75, 31,28, 30,17, 10,32.

ESI-MS m/z calculado para $C_{57}H_{94}N_{13}O_{27}$ $(M+H)^+$ 1392,64 y $C_{57}H_{93}N_{13}NaO_{27}$ $(M+Na)^+$ 1414,62; encontrados 1392,50 y 1414,47, respectivamente.

Procedimiento general para la saponificación de éster metílico.

A los derivados trivalentes de éster metílico (1,0 equiv.) disueltos en MeOH (135 ml/mmol) se añadió una solución acuosa de LiOH (1 M, 9,0 equiv.). La mezcla se dejó avanzar durante 9 h a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción, la mezcla de reacción se neutralizó con Dowex 50W8 (H^+). Después de retirar la resina Dowex, el disolvente se evaporó a vacío y el producto en bruto, disuelto en agua, se eluyó en un tapón C-18 con H_2O . Las fracciones que contenían el compuesto se liofilizaron para dar un derivado de ácido siálico trivalente puro.

Tris(((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**ME0385**). **ME0385** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la saponificación de éster metílico (22 mg, 76 % de rendimiento). $[\alpha]_D^{20}$ -15,77 (c 4,8 mg/ml, H_2O).

1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 8,40 (s, 3H, 3ArCH), 4,72 (t, $J = 5,2$ Hz, 6H, 3-CH₂-ArN), 4,60 (s.an., 6H, -N(CH₂)₃), 4,14-4,27 (m, 3H, 3-OCH_{2b}), 3,93-4,02 (m, 3H, 3-OCH_{2a}), 3,85 (dd, $J_{9a,9b} = 11,7$ y $J_{9b,8} = 2,3$ Hz, 3H, 3H-9_b), 3,73-3,82 (m, 6H, 3H-8, 3H-5), 3,59-3,72 (m, 9H, 3H-4, 3H-6, 3H-9_a), 3,56 (dd, $J_{7,8} = 9,3$ y $J_{6,7} = 1,7$ Hz, 3H, H-7), 2,66 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,5$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,04 (s, 9H, 3-COCH₃), 1,67 (aparece como t, $J_{3eq,3ax} \approx J_{3ax,4} = 12,0$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}).

^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O): δ 175,05, 172,55, 135,87, 128,64, 100,05, 72,72, 71,42, 68,10, 67,88, 62,68, 62,58, 51,73, 50,57, 46,49, 39,64, 22,0. ESI-MS m/z calculado para $C_{48}H_{76}N_{13}O_{27}$ $(M+H)^+$ 1266,49; encontrado 1266,29.

Tris(((ácido 1-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**ME0386**). **ME0386** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la saponificación de éster metílico (27 mg, 75 % de rendimiento). $[\alpha]_D^{20}$ -3,83 (c 3,9 mg/ml, H_2O).

1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 8,02 (s, 3H, 3ArCH), 4,45-4,64 (m, 6H, 3-CH₂-ArN), 3,92 (s.an., 6H, N(CH₂)₃), 3,56-3,87 (m, 24H, 3H-9_b, 3-OCH₂-, 3H-8, 3H-5, 3H-4, 3H-6, 3H-9_a), 3,46-3,54 (m, 3H, 3H-7), 2,73 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,5$ y $J_{3eq,4} = 4,7$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,15-2,25 (m, 6H, 3-CH₂-), 2,05 (s, 9H, COCH₃), 1,63 (aparece como t, $J_{3eq,3ax} \approx J_{3ax,4} = 12,1$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}).

^{13}C -RMN (100 MHz, D_2O): δ 175,05, 173,52, 142,34, 125,79, 100,48, 72,56, 71,71, 68,28, 68,16, 62,51, 61,22, 51,89, 47,54, 47,30, 40,29, 29,64, 22,02.

ESI-MS m/z calculado para $C_{51}H_{82}N_{13}O_{27}$ $(M+H)^+$ 1308,54; encontrado 1308,51.

Tris(((ácido 1-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina (**ME0408**). **ME0408** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la saponificación de éster metílico (19 mg, 72 % de rendimiento). $[\alpha]_D^{20}$ -14,34 (c 4,6 mg/ml, H_2O).

1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 8,17 (s, 3H, 3ArCH), 4,64 (s.an., 6H, 3-CH₂-ArN), 4,07-4,20 (m, 9H, 3-OCH_{2b}-, -N(CH₂)₃), 3,87-3,93 (m, 3H, 3-OCH_{2a}), 3,82 (dd, $J_{9a,9b} = 11,7$ y $J_{9b,8} = 2,4$ Hz, 3H, 3H-9_b), 3,75 (ddd, $J_{8,7} = 8,9$, $J_{8,9a} = 5,6$ Hz, $J_{9b,8} = 2,4$ Hz, 3H, 3H-8), 3,72 (t, $J_{5,6} \approx J_{5,4} = 10,1$ Hz, 3H, 3H-5), 3,63-3,69 (m, 3H, 3H-4), 3,56-3,63

(m, 6H, 3H-6, 3H-9_a), 3,51 (dd, $J_{7,8} = 8,9$ y $J_{6,7} = 1,6$ Hz, 3H, H-7), 2,66 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,3$ y $J_{3eq,4} = 4,6$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,28 (q, $J = 7,6$ Hz, 6H, 3-COCH₂-), 1,74 (aparece como t, $J_{3eq,3ax} \approx J_{3ax,4} = 12,3$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}), 1,10 (t, $J = 7,6$ Hz, 9H, 3-COCH₂CH₃).

5 ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O): δ 179,90, 174,12, 127,82, 101,35, 73,50, 72,50, 69,00, 68,91, 63,74, 63,40, 52,51, 51,39, 49,84, 40,87, 30,05, 10,36.

ESI-MS m/z calculado para C₅₁H₈₂N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1308,54; encontrado 1308,44.

10 Tris((ácido 1-(2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosilónico) -3-oxopropil-1H-1,2,3 -triazol-4-il)metil)amina (**ME0407**). **ME0407** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la saponificación de éster metílico (27 mg, 75 % de rendimiento). $[\alpha]_D^{20}$ -0,76 (c 4,8 mg/ml, H₂O).

15 ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ 8,31 (s, 3H, 3ArCH), 4,53-4,63 (m, 12H, 3-CH₂-ArN, N(CH₂)₃), 3,82 (dd, $J_{9b,9a} = 11,8$ y $J_{9b,8} = 2,4$ Hz, 3H, H-9_b), 3,74-3,83 (m, 12H, 3-OCH_{2b}-, 3H-8, 3H-5), 3,67-3,73 (m, 3H, 3H-4), 3,67 (dd, $J_{6,5} = 10,4$ y $J_{6,7} = 1,5$ Hz, 3H, 3H-6), 3,60 (dd, $J_{9a,9b} = 11,8$ y $J_{9a,8} = 5,9$ Hz, 3H, 3H-9_a), 3,53 (dd, $J_{7,8} = 8,9$ y $J_{6,7} = 1,5$ Hz, 3H, 3H-7), 3,42-3,50 (m, 3H, 3-OCH_{2a}), 2,69 (dd, $J_{3eq,3ax} = 12,4$ y $J_{3eq,4} = 4,5$ Hz, 3H, 3H-3_{eq}), 2,29 (q, $J = 7,6$ Hz, 6H, 3-COCH₂-), 2,15-2,25 (m, 6H, 3-CH₂-), 1,65 (aparece como t, $J_{3eq,3ax} \approx J_{3ax,4} = 12,4$ Hz, 3H, 3H-3_{ax}), 1,11 (t, $J = 7,6$ Hz, 9H, 3-COCH₂CH₃).

20 ¹³C-RMN (100 MHz, D₂O): δ 178,87, 173,77, 136,66, 128,98, 100,86, 73,47, 72,34, 69,04, 68,66, 63,47, 61,82, 52,52, 48,52, 47,57, 40,83, 30,17, 30,01, 10,30.

ESI-MS m/z calculado para C₅₄H₈₈N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1350,59; encontrado 1350,28.

25

Ejemplo 2

Uso de Tris(2-azidoetil)amina como resto central

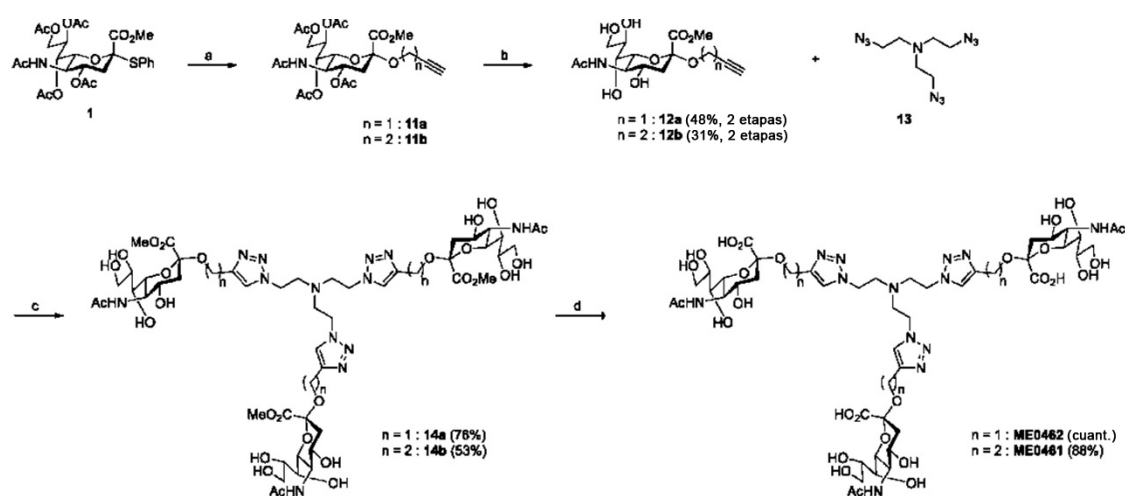
30 La ruta para obtener ácidos siálicos trivalentes N-acilo, tal como Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina (**ME0461**) y Tris ((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi)-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina (**ME0462**), resultó sencilla y se podría lograr en siete etapas a partir de productos químicos comercialmente disponibles o en cuatro etapas a partir del intermedio clave **1** (esquema 2). La síntesis del derivado de tiofenilo del ácido siálico **1**, preparado fácilmente a partir de ácido siálico comercial, se realizó conforme a los procedimientos publicados (Marra et al., Carbohydr. Res. 1989, 187, 35). Se accedió a los sialósidos **11a** y **11b** en una conversión moderada mediante glicosilación del alcohol correspondiente (alcohol propargílico y 3-butin-1-ol, respectivamente) con el compuesto **1**. El uso de otros alcoholes de alquino proporcionaría componentes básicos con conectores de otras longitudes. La reacción produjo una mezcla inseparable de anómeros, junto con el producto de eliminación resultante, que no se purificó adicionalmente en esta etapa.

La posterior O-desacilación usando condiciones de Zemplén estándar proporcionó **12a** y **12b** anoméricamente puros con un rendimiento de un 48 % y 31 %, respectivamente, en dos etapas.

45 A continuación, los compuestos **12a** y **12b** se hicieron reaccionar con Tris(2-azidoetil)amina (**13**) en una reacción de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (reacción de "clic").

El derivado de Tris-azido **13** se sintetizó en dos etapas a partir de trietanolamina comercialmente disponible. En primer lugar, la trietanolamina se convirtió en tris(2-cloroetil)amina conforme al procedimiento publicado (M. Sun et al., J. Am. Chem. Soc. 2012, 134(51), 20581). A continuación, el derivado de cloro se convirtió fácilmente en su análogo azido **13**. (Nota: **13** es altamente explosivo, por lo tanto, es fundamental almacenarlo siempre en solución y en la oscuridad). Los ésteres metílicos **14a** y **14b** se obtuvieron en un 76 % y 53 % de rendimiento, respectivamente.

55 La posterior saponificación proporcionó los compuestos diana finales **ME0462** y **ME0461** con un rendimiento cuantitativo y de un 88 %, respectivamente.



Esquema 2.^a Síntesis de ME0462 y ME0461

a Reactivos y condiciones: (a) i: tamiz molecular 3Å, 3-butin-1-ol o alcohol propargílico, CH₃CN/CH₂Cl₂ (3:2), t.a., 2 h; ii: AgOTf, IBr, -73 °C, 4,5 h; iii: DIPEA, -73 °C, 30 min. (b) i: NaOMe, MeOH, t.a., 3 h; ii: resina de intercambio de iones H⁺. (c) CuSO₄, ascorbato de sodio, THF/H₂O (1:1), 50 °C, 3 h seguido de t.a., 18 h. (d) i: LiOH, MeOH, t.a., 9 h; ii: resina de intercambio de iones H⁺.

Procedimiento general para la reacción de glicosilación.

- 5 El donador de glicosilo **1** (1,0 equiv.) y tamices moleculares de 3 Å recién triturados (1,5 g/mmol) se disolvieron/suspendieron en una mezcla de CH₃CN/CH₂Cl₂ (3:2; 35 ml/mmol) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Se añadió 3-butin-1-ol o alcohol propargílico (4,5 equiv.) y la mezcla se agitó durante 2 h. La reacción se protegió de la luz y se añadió una solución de triflato de plata (2,0 equiv.) en CH₃CN. La mezcla se enfrió a -73 °C (-70 °C < t < -75 °C) y se añadió IBr (1,4 equiv., 1 M en CH₂Cl₂). La reacción se dejó avanzar durante 4,5 h a -73 °C. Una vez completada la reacción, se agregó DIPEA (6,0 equiv.). La mezcla de reacción se agitó durante 30 min adicionales a -73 °C y luego se dejó atemperar hasta temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de Celite®, se lavó con CH₂Cl₂ o CH₃CN y los disolventes se concentraron a sequedad.
- 10
- 15 2-(Prop-2-iniloxi-(5-N-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**11a**). El compuesto **11a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la reacción de glicosilación. La purificación por cromatografía en columna (gradiente n-heptano/EtOAc) proporcionó el compuesto **11a** y el correspondiente anómero inverso. El compuesto **11a** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 20 2-(But-3-iniloxi-(5-N-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetil-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**11b**). El compuesto **11b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la reacción de glicosilación. La purificación por cromatografía en columna (gradiente n-heptano/EtOAc) proporcionó el compuesto **11b** y el correspondiente anómero inverso. El compuesto **11b** se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 25

Procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos.

- 30 A sialósido peracilado (1,0 equiv.) disuelto en MeOH (70 ml) se le añadió metóxido de sodio (3,9 equiv.). La reacción se dejó avanzar durante 3 h a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez completada la reacción, la solución se neutralizó por adición gota a gota de AcOH glacial o por Amberlyst® 15. El disolvente se concentró entonces a sequedad.
- 35 2-(Prop-2-iniloxi-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**12a**). El compuesto **12a** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos. La purificación por HPLC (A: HCOOH ac. al 0,005 % en H₂O, B: HCOOH ac. al 0,005 % en CH₃CN, gradiente de fase orgánica de un 5 % a un 20 %) proporcionó el compuesto **12a** (178 mg, rendimiento de un 48 % en dos etapas).

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 4,40 (dd, *J* = 4,3 Hz, *J* = 15,9 Hz, 1H), 4,33 (dd, *J* = 4,3 Hz, *J* = 15,9 Hz, 1H), 3,81-3,91 (m, 5H), 3,78 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 3,63-3,72 (m, 2H), 3,60 (dd, *J* = 1,5 Hz, *J* = 10,4 Hz, 1H), 3,52 (dd, *J* = 1,4 Hz, *J* = 9,0 Hz, 1H), 2,86 (t, *J* = 2,4 Hz, 1H), 2,72 (dd, *J*_{3eq,4} = 4,6 Hz, *J*_{3eq,3ax} = 12,7 Hz, 1H), 2,01 (s, 3H), 1,75 (dd, *J*_{3eq,3ax} = 12,7 Hz, *J*_{3ax,4} = 11,8 Hz, 1H).

2-(But-3-iniloxi-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (**12b**). El compuesto **12b** se sintetizó siguiendo el procedimiento general para la O-desacilación de sialósidos. La purificación por cromatografía en columna(EtOAc/EtOH/H₂O, 4:1:0,1) proporcionó el compuesto **12b** (218 mg, 31 % de rendimiento en dos etapas).

¹H-RMN (360 MHz, CD₃OD): δ 3,72-3,95 (m, 7H), 3,45-3,71 (m, 6H), 2,69 (dd, *J*_{3eq,4} = 4,6 Hz, *J*_{3eq,3ax} = 12,8 Hz, 1H), 2,35-2,45 (m, 2H), 2,26 (t, *J* = 2,7 Hz, 1H), 2,00 (s, 3H), 1,73 (dd, *J*_{3eq,3ax} = 12,3 Hz, *J*_{3ax,4} = 12,0 Hz, 1H).

Tris(2-azidoetil)amina (13)

Se añadió lentamente una solución de trietanolamina (0,298 g, 2,0 mmol) en 0,5 ml de CHCl₃ a una solución de cloruro de tionilo (0,52 ml, 7,0 mmol) en 0,8 ml de CHCl₃ con agitación. Después de la adición, la mezcla de reacción se calentó a temperatura de reflujo durante 4 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, el producto sólido blanco se filtró y se lavó con diclorometano (1,0 ml × 2) para dar clorhidrato de tris(2-cloroetil)amina con un rendimiento de un 82 % (0,395 g) después de secar a vacío durante la noche. A continuación, se añadió clorhidrato de tris(2-cloroetil)amina (0,198 g, 0,82 mmol) y azida sódica (0,320 g, 4,92 mmol) a DMSO (7,0 ml) y la mezcla resultante se agitó a 92 °C durante 22 horas. Después de enfriar la mezcla, se vertió en agua destilada (40,0 ml) y la solución se alcalinizó con Na₂CO₃ (10 % ac.) hasta pH = 10 y se extrajo con diclorometano (15,0 ml × 3). La fase orgánica se lavó con agua (20,0 ml) y después se secó sobre Na₂SO₄. El diclorometano se concentró hasta 1 ml y luego se agregaron 15,0 ml de THF, se concentró nuevamente hasta 1,0 ml, se añadieron 15,0 ml de THF y se concentraron hasta 1,8 ml. Esta solución de THF que contiene 0,8 mmol de tris(2-azidoetil)amina se podría usar en la siguiente etapa. (Nota: **13** es altamente explosivo, por lo tanto, es fundamental almacenarlo siempre en solución y en la oscuridad).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3,33 (t, *J* = 6,2 Hz, 6H), 2,76 (t, *J* = 6,2 Hz, 6H).

ESI-MS *m/z* calculado para C₆H₁₃N₁₀ (M+H)⁺ 225,13; encontrado 225,33.

Ref.: M. Sun, C-Y. Hong, C-Y. Pan, Journal of the American Chemical Society 2012, 134(51), 20581-20584.

Tris((4-(2-O-(metil-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina (14a)

A una solución de tris(2-azidoetil)amina (0,075 ml, 0,033 mmol) en una mezcla 1:1 de agua (1,7 ml) y THF (1,7 ml) se añadió 2-(prop-2-iniloxi-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (0,0538 g, 0,149 mmol), ascorbato de sodio (5,9 mg, 0,030 mmol) y sulfato de cobre (II) (4,8 mg, 0,030 mmol) mientras se agita. La mezcla se calentó primero a 50 °C durante 3,5 horas y a temperatura ambiente durante 18 horas adicionales. Después de la evaporación de THF a presión reducida, el residuo se diluyó hasta 2,6 ml con agua destilada y luego se purificó por HPLC preparativa (A: HCOOH al 0,005 % en H₂O, B: HCOOH al 0,005 % en CH₃CN, gradiente de fase orgánica de un 5 % a un 20 % / 30 min) para dar un producto blanco con un rendimiento de un 76 % después de la liofilización.

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,78 (s, 3H), 4,92 (d, *J* = 12,6 Hz, 3H), 4,64 (d, *J* = 12,1 Hz, 3H), 4,30 (t, *J* = 6,2 Hz, 6H), 3,79-3,93 (m, 18H), 3,60-3,74 (m, 9H), 3,47-3,58 (m, 3H), 3,03 (t, *J* = 5,9 Hz, 6H), 2,67 (dd, *J*_{3eq,4} = 4,6 Hz, *J*_{3eq,3ax} = 12,8 Hz, 3H), 2,00 (s, 9H), 1,74 (t, *J*_{3eq,3ax} = 12,3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 175,05, 170,75, 145,52, 126,09, 100,06, 74,98, 72,26, 70,33, 68,53, 64,93, 58,51, 55,09, 53,71, 53,59, 41,65, 22,75.

ESI-MS *m/z* calculado para C₅₁H₈₂N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1308,54; encontrado 1309,13.

Tris((4-(2-O-(metil-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina (14b)

A una solución de tris(2-azidoetil)amina (0,113 ml, 0,05 mmol) en una mezcla 1:1 de agua (2,5 ml) y THF (2,5 ml) se añadió 2-(but-3-iniloxi-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosil))onato de metilo (0,0845 g, 0,225 mmol), ascorbato de sodio (8,9 mg, 0,0449 mmol) y sulfato de cobre (II) (7,2 mg, 0,0451 mmol) mientras se agita. La mezcla se calentó primero a 50 °C durante 3,5 horas y a temperatura ambiente durante 18 horas adicionales. Después de la evaporación de THF a presión reducida, el residuo se diluyó hasta 3,0 ml con agua destilada y luego se purificó por HPLC preparativa (A: HCOOH al 0,005 % en H₂O, B: HCOOH al

0,005 % en CH₃CN, gradiente de fase orgánica de un 5 % a un 20 % / 30 min) para dar 35,9 mg (53,2 %) de producto blanco después de la liofilización.

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8,02 (d, *J* = 8,5 Hz, 3H), 7,66 (s, 3H), 4,30 (t, *J* = 5,9 Hz, 6H), 4,06 (dt, *J* = 9,3 Hz, *J* = 6,5 Hz, 3H), 3,74-3,87 (m, 18H), 3,57-3,72 (m, 12H), 3,50 (dd, *J* = 1,2 Hz, *J* = 8,7 Hz, 3H), 3,04 (t, *J* = 5,7 Hz, 6H), 2,93 (t, *J* = 6,1 Hz, 6H), 2,65 (dd, *J*_{3eq,4} = 4,6 Hz, *J*_{3eq,3ax} = 12,7 Hz, 3H), 2,00 (s, 9H), 1,72 (t, *J*_{3eq,3ax} = 12,3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 175,16, 170,90, 146,05, 124,81, 100,22, 74,94, 72,44, 70,25, 68,52, 64,86, 64,05, 54,85, 53,80, 53,48, 41,74, 27,27, 22,72. ESI-MS *m/z* calculado para C₅₄H₈₈N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1350,59; encontrado 1351,70.

Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina (ME0462)

El éster metílico (**14a**) obtenido anteriormente se disolvió en soluciones de MeOH (1,9 ml) y LiOH (0,15 ml, 1,0 M). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 44 horas, seguido de LC-MS, se neutralizó con Amberlite IR120 hasta pH = 7,0, se concentró y se liofilizó para dar 20,2 mg de producto blanco. $[\alpha]_D^{20}$ -11,7 (c 1,0 mg/ml, H₂O).

¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ 7,84 (s, 3H), 4,85 (d, *J* = 12,0 Hz, 3H), 4,61 (d, *J* = 12,0 Hz, 3H), 4,35 (t, *J* = 6,0 Hz, 6H), 3,77-3,94 (m, 9 H), 3,49-3,76 (m, 12 H), 3,04 (t, *J* = 6,0 Hz, 6H), 2,73 (dd, *J*_{3eq,4} = 4,5 Hz, *J*_{3eq,3ax} = 12,4 Hz, 3H), 2,03 (s, 9H), 1,66 (t, *J*_{3eq,3ax} = 12,3 Hz, 3H).

¹³C-RMN (100 MHz, D₂O): δ 174,99, 173,20, 143,93, 125,23, 100,66, 72,64, 71,61, 68,25, 68,21, 62,58, 57,31, 52,67, 51,81, 48,17, 40,23, 22,00.

ESI-MS *m/z* calculado para C₄₈H₇₆N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1266,50; encontrado 1267,10.

Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero-α-D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina (ME0461)

Se disolvió metiléster (25,8 mg, **14b**) en soluciones de MeOH (2,5 ml) y LiOH (0,17 ml, 1,0 M). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 72 horas, seguido de LC-MS, se neutralizó con Amberlite IR120, se concentró y se liofilizó para dar 22,0 mg (88,0 %) de producto blanco. $[\alpha]_D^{20}$ -5,3 (c 1,0 mg/ml, MeOH).

¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ 7,68 (s, 3H), 4,47 (t, *J* = 5,3 Hz, 6H), 3,96-4,10 (m, 3H), 3,66-3,87 (m, 18H), 3,59-3,66 (m, 3H), 3,52-3,58 (m, 3H), 3,30 (t, *J* = 5,3 Hz, 6H), 2,99 (t, *J* = 5,8 Hz, 6H), 2,63 (dd, *J*_{3eq,4} = 4,4 Hz, *J*_{3eq,3ax} = 12,7 Hz, 3H), 2,03 (s, 9H), 1,67 (t, *J*_{3eq,3ax} = 12,5 Hz, 3H).

¹³C-RMN (100 MHz, D₂O): δ 175,01, 173,49, 144,82, 124,00, 100,60, 72,54, 71,68, 68,27, 68,16, 63,21, 62,55, 52,48, 51,85, 48,02, 40,20, 25,67, 22,00.

ESI-MS *m/z* calculado para C₅₁H₈₂N₁₃O₂₇ (M+H)⁺ 1308,54; encontrado 1309,29.

Evaluación biológica

Ensayo de unión celular

Con el fin de investigar la eficacia de los compuestos recién sintetizados (**ME0385**, **ME0386**, **ME0407**, **ME0408**, **ME0461** y **ME0462**) para evitar la unión de viriones de AdVH-37 a células ECH, se llevaron a cabo ensayos de unión celular basados en viriones marcados con ³⁵S. En base a los estudios previos, el **ME0322**, el ácido siálico y el glicano de GD1a se usaron como compuestos de referencia (Nilsson et al., N. Nat. Med. 2011, 17, 105 y Spjut et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 6519). Los ensayos se llevaron a cabo (ver a continuación para más detalles) esencialmente como se describió previamente (Arnberg et al., J. Virol. 2000, 74, 42 y Arnberg et al., J. Virol. 2000, 74, 7691).

En resumen, los viriones de AdVH-37 marcados con ³⁵S se preincubaron con o sin los derivados trivalentes de ácido siálico, el glicano de GD1a y el ácido siálico en diversas concentraciones. Las mezclas se incubaron con células ECH y los viriones no unidos se lavaron. Finalmente, se contó la radiactividad asociada a células usando un contador de centelleo.

Los resultados mostrados en la figura 1a y 2a son muy llamativos y, por lo tanto, la unión de viriones de AdVH-37 a células ECH se vio obstaculizada de manera drástica en presencia de los ácidos siálicos trivalentes de nuevo

diseño. De hecho, se evaluó el conjunto de nuevos compuestos y se encontró que eran más de cuatro órdenes de magnitud más potentes que el ácido siálico monovalente ($CI_{50} = 1,2 \text{ mM}$). Además, los nuevos compuestos trivalentes eran considerablemente más potentes que el glicano de GD1a bivalente ($CI_{50} = 91 \text{ } \mu\text{M}$).

Como se puede ver, **ME0385**, **ME0386** y **ME0461** son eficientes en la prevención de la unión de viriones de AdvH-37 a células ECH con valores de CI_{50} de 107 nM, 40 nM y 376 nM, respectivamente. El compuesto de partida inicial (**ME0322**, $CI_{50} = 3,2 \text{ } \mu\text{M}$) resultó ser de menor potencia. Por lo tanto, se puede concluir que los compuestos de la presente invención son superiores a los conocidos previamente en la técnica. Se encontró además (véase la figura 2b) que el análogo **ME0462** ($CI_{50} = 1,4 \text{ nM}$) era incluso más potente que **ME0385**, **ME0386** y **ME0461**.

Por último, los derivados *N*-acil modificados **ME0407** y **ME0408** con valores de CI_{50} de 23,4 μM y 4,5 μM , respectivamente, completaron la serie. Desafortunadamente, el aumento de la lipofilia de los ligandos en el resto *N*-acilo no aumentó la potencia en comparación con **ME0385** y **ME386**, respectivamente, lo que está respaldado por investigaciones previas (Johansson et al., J. Med. Chem. 2009, 52, 3666).

Detalles experimentales - Ensayo de unión celular

Los viriones de AdvH-37 marcados con S (5×10^8 /pocillo) se preincubaron en tampón de unión (50 μl ; BB: medio de Eagle modificado por Dulbecco que contiene BSA al 1 % (Roche AB, Estocolmo, Suecia) y HEPES (20 mM, EuroClone, Milán, Italia), pH 7,5) con o sin derivados trivalentes de ácido siálico, glicano de GD1a o ácido siálico en diversas concentraciones (véase la figura 1a) en una microplaca de 96 pocillos a +4 °C durante 1 h. Estas mezclas se añadieron después a las células ECH presedimentadas (1×10^5 /pocillo) en una microplaca de 96 pocillos. Después de la resuspensión, las mezclas se incubaron a +4 °C durante 1 h. Finalmente, los viriones no unidos se lavaron con BB y se contó la radiactividad asociada a células usando un contador de centelleo Wallac 1409.

Ensayo de infección

Con el fin de confirmar los resultados de los ensayos de unión celular y evaluar adicionalmente nuestro conjunto de compuestos, se realizaron experimentos de infección (figuras 1b, 3a y 3b). Los ensayos se llevaron a cabo (ver a continuación para más detalles) esencialmente como se describió previamente ((Arnberg et al., J. Virol. 2000, 74, 42 y Arnberg et al., J. Virol. 2000, 74, 7691)).

En resumen, los viriones no marcados se preincubaron con o sin los derivados de ácido siálico trivalente, glicano de GD1a o ácido siálico a diversas concentraciones. Estas mezclas se añadieron a las células ECH y se incubaron a +4 °C. Los viriones no unidos se lavaron, las mezclas resultantes se incubaron a +37 °C y luego se obtuvo una infección sincronizada (todos los viriones ingresan en las células simultáneamente). Después de 44 h de infección, las células se enjuagaron, se fijaron, se incubaron con anticuerpos policlonales anti-AdvH-37 de conejo antes de lavarse y teñirse. Finalmente, las células se lavaron y examinaron por microscopía de inmunofluorescencia.

Por lo tanto, las tendencias de los ensayos de unión celular (figuras 1a, 2a y 2b) se confirmaron en los experimentos de infección (figuras 1b, 3a y 3b). Los compuestos **ME0386** y **ME0385** previnieron la infección de células ECH por viriones de AdvH-37 más eficazmente que **ME0322** con valores de CI_{50} de 118 nM y 166 nM, respectivamente. Se calculó en el presente documento que la mitad de la concentración inhibitoria máxima de **ME0322** que se había estimado previamente en 380 nM era de 228 nM. Además, **ME0461** y **ME0462** previnieron la infección de células ECH por viriones de AdvH-37 más eficazmente que **ME0322**. Además, también en el ensayo de infección (véase la figura 3b), el análogo **ME0462** ($CI_{50} = 2,1 \text{ nM}$) fue el más potente.

Detalles experimentales - Ensayo de infección

Se preincubaron 7×10^7 viriones no marcados/pocillo en placas de 48 pocillos en medio de crecimiento libre de suero (200 μE) con o sin derivados trivalentes de ácido siálico, glucano GD1a o ácido siálico a diversas concentraciones (véase la figura 2B) a +4 °C. Después de 1 h, las mezclas se transfirieron a nuevas placas de 48 pocillos que contenían 1×10^5 células de ECH adherentes/pocillo y se incubaron a +4 °C. Después de 1 h, los viriones no unidos se lavaron con medio de crecimiento libre de suero y las mezclas resultantes se incubaron con medio de crecimiento que contenía suero fetal bovino (FBS) al 1 % a +37 °C. Después de 44 h de infección, las células se enjuagaron en PBS, se fijaron con metanol al 99 % frío (-20 °C) durante 10 min y se incubaron con anticuerpos policlonales anti-AdvH-37 de conejo diluidos 1:200 en PBS (pH 7,4) a temperatura ambiente. Después de 1 h, las células se lavaron en PBS y se tiñeron con anticuerpos de cerdo anti-IgG de conejo marcados con FITC (Dako-cytomation, Glostrup, Dinamarca) diluidos 1:100 en PBS durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron en PBS y se examinaron en un microscopio de inmunofluorescencia (Axiovert 25, Carl Zeiss, Alemania, ampliación 10x).

Resonancia de plasmón superficial (SPR)

Finalmente, se investigaron ME0385, ME0386 y ME0322 en experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR) y se determinaron sus respectivas afinidades de unión (Kd) para cabezas de fibra de AdvH-37 inmovilizadas (ver a continuación para más detalles). Los datos de SPR corroboraron las tendencias de los ensayos de unión celular e infección celular y los tres compuestos demostraron interactuar con la cabeza de fibra de AdvH-37 en un modo de unión uno a uno. Por lo tanto, se confirmó que ME0386 (Kd = 69 μ M) era el que mejor interactuaba con la cabeza de fibra de AdvH-37, seguido de ME0385 y ME0322 (Kd = 76 μ M y Kd = 126 μ M, respectivamente). También vale la pena señalar la influencia de la construcción de la cabeza de fibra de AdvH-37 en los valores de Kd. De forma similar al ensayo de unión e infección, ME0462 tenía la mayor afinidad de unión (Kd = 9,5 μ M).

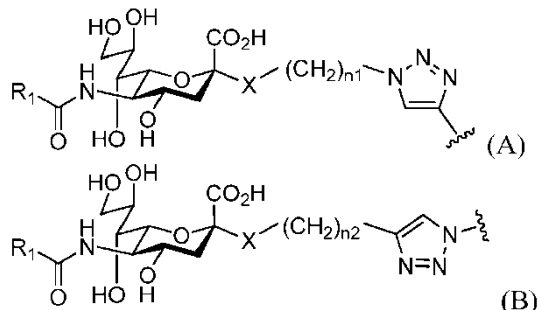
Detalles experimentales - Resonancia de plasmón superficial

Las mediciones cinéticas se realizaron utilizando un instrumento de resonancia de plasmón superficial BIAcore T100. Las proteínas de cabeza de AdvH-37 se acoplaron covalentemente a un chip sensor CM5 utilizando el kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare), a una concentración de 14-15 ng/mm² (~15 000 UR). La unión de los conjugados trivalentes de ácido siálico **ME0322**, **ME0385** y **ME0386** a la cabeza inmovilizada se realizó en HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M y P20 al 0,05 % a pH 7,4 (1x HBS-EP+, GE Healthcare). Las concentraciones de ácido siálico trivalente utilizadas fueron 400, 200, 100, 50 (dos veces), 25, 12,5 (dos veces), 6,25, 3,125, 1,56 y 0,78 μ M. Las afinidades de unión (Kd) se calcularon usando el software de evaluación Biacore T100.

En resumen, se ha encontrado que los compuestos de la presente invención, tales como **ME0385**, **ME0386**, **ME0461** y **ME0462**, muestran una potencia superior en comparación con los compuestos de la técnica, tales como **ME0322**, en la prevención de una infección ocular causada por un virus, tal como AdvH-37, que se une a residuos siálicos terminales presentes en la superficie celular de la célula que va a resultar infectada por dicho virus. Por lo tanto, se considera que los compuestos de la presente invención son altamente útiles en el tratamiento de la queratoconjuntivitis epidémica.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado tri- o tetravalentes de ácido siálico, comprendiendo dicho derivado un resto central al que se unen 3 o 4 grupos de acuerdo con la fórmula A o B



en el que

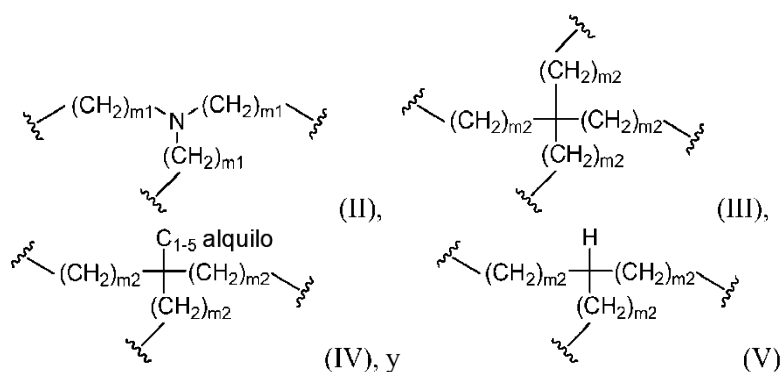
"X" es O (oxígeno) o S (azufre);

R1 es alquilo C1-3;

el número entero "n1" es de 2 a 8;

el número entero "n2" es de 1 a 8; y

la línea ondulada indica el punto de unión al resto central; en el que dicho resto central es un resto de acuerdo con una cualquiera de las fórmulas II a V



en la que

el número entero "m1" de la fórmula II es de 1 a 8 si los grupos unidos al resto II son grupos de acuerdo con la fórmula A;

el número entero "m1" de la fórmula II es de 2 a 8 si los grupos unidos al resto II son grupos de acuerdo con la fórmula B;

el entero "m2" es de 1 a 8; y

las líneas onduladas indican el punto de unión a los grupos de acuerdo con la fórmula A o B;

como una base libre, un ácido en su forma protonada no cargada, un zwitterión, una sal de adición farmacéuticamente aceptable, un solvato o un solvato de una sal del mismo.

2. El derivado de ácido siálico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que "X" es O (oxígeno), en el que R1 es metilo y/o en el que el número entero "n1" es de 2 a 3; y el entero "n2" es 1, 2 o 3.
3. El derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichos grupos son grupos de acuerdo con la fórmula A.
4. El derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dichos grupos son grupos de acuerdo con la fórmula B.
5. El derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el peso molecular de dicho derivado en su forma libre es de 1500 Da o menos.
6. El derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho resto central es un resto de acuerdo con la fórmula (II); preferentemente el número entero "m1" es de 1 a 3.

7. El derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho derivado de ácido siálico se selecciona del grupo que consiste en:

Tris((ácido 2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-4-il)etil)amina;
 Tris((ácido 3-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina;
 Tris((ácido 2-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina;
 Tris((ácido 3-O-(5-N-propanoilamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-3-oxopropil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)amina;
 Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxometil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina; y
 Tris((ácido 4-(2-O-(5-N-acetamido-3,5-didesoxi-D-glicero- α -D-galacto-2-nonulopiranosilónico))-2-oxoetil-1H-1,2,3-triazol-1-il)etil)amina.

8. El derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho derivado de ácido siálico está presente como un estereoisómero puro o en una mezcla anomérica que comprende dicho compuesto, en el que en la mezcla anomérica predomina el anómero α .

9. Una composición farmacéutica para la administración en el ojo que comprende un derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que dicha composición es una composición acuosa que comprende de 0,001 a 10 mM, tal como de 0,01 a 1 mM, de un derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, teniendo dicha composición acuosa preferentemente un contenido en agua de al menos un 90 % en peso y que comprende opcionalmente un agente, tal como glicerol o NaCl, para proporcionar una solución isotónica.

11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que dicha composición acuosa comprende NaCl para proporcionar una solución isotónica.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en la que dicha composición acuosa está tamponada y tiene un pH de aproximadamente 6,5 a 8.

13. Un derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para uso en terapia.

14. Un derivado de ácido siálico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, para uso en el tratamiento y/o la prevención de una infección ocular causada por un virus, que se une a residuos siálicos terminales presentes en la superficie celular de la célula que va a resultar infectada por dicho virus.

15. Un derivado de ácido siálico o una composición farmacéutica para uso según la reivindicación 14, en el que dicha infección es causada por un virus seleccionado del grupo que consiste en AdVH-8, AdVH-19, AdVH-37, AdVH-53, AdVH-54 y AdVH-56 y/o en el que dicha infección es una queratoconjuntivitis epidémica.

Figura 1a

