

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 702**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016 PCT/FR2016/052339**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016 E 16787487 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3350192**

54 Título: **Compuestos de polisacárido multifuncionalizados y su uso para dirigirse al receptor de manosa 6-fosfato independiente de catión**

30 Prioridad:

18.09.2015 FR 1558806

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

03.03.2020

73 Titular/es:

**NANOMEDSYN (33.3%)
15 avenue Charles Flahault, Faculté de
Pharmacie Bat. E 2ème étage
34093 Montpellier cedex 5, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MORERE, ALAIN;
DA SILVA, AFITZ;
BOUFFARD, ELISE;
EL CHEIKH, KHALED;
DURAND, JEAN-OLIVIER;
MAYNADIER, MARIE y
BASILE, ILARIA**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 745 702 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de polisacárido multifuncionalizados y su uso para dirigirse al receptor de manosa 6-fosfato independiente de catión

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a nuevos compuestos polisacáridos multifuncionalizados, y más particularmente a compuestos di-, tri- o tetra-manosídicos multifuncionalizados. La invención también se refiere al método de preparación de dichos compuestos, y su uso para dirigirse al receptor de manosa 6-fosfato independiente de catión (RM6P-CI).

10

Estado de la técnica

El receptor de manosa 6-fosfato independiente de catión (RM6P-CI) es un receptor ubicuo que está presente tanto en el citoplasma como en la membrana celular. Su función principal es transportar enzimas lisosómicas recién sintetizadas desde la red trans-Golgi hasta los lisosomas donde están activas. También participa en la endocitosis de enzimas lisosómicas secretadas por las células. Esta endocitosis por RM6P-CI permite la internalización de compuestos que transportan restos de manosa 6-fosfato (M6P) dentro de la célula y su direccionamiento hacia los lisosomas.

15

20

RM6P-CI, por lo tanto, desempeña un papel crucial en el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (enfermedad rara), y más particularmente para la terapia de reemplazo enzimático. La enzimoterapia sustitutiva es una terapia exitosa para tratar estas enfermedades raras que se caracterizan por una deficiencia de una enzima lisosómica específica. Consiste en la administración de enzimas lisosómicas recombinantes que se dirigirán hacia los lisosomas mediante RM6P-CI gracias a los restos M6P presentes en el extremo de sus cadenas glicosiladas.

25

Además, RM6P-CI se sobreexpresa en algunos tipos de cáncer¹, lo que lo convierte en una diana atractiva para el desarrollo de tratamientos específicos, limitando así la toxicidad en las células sanas.

30

Dichas terapias se pueden obtener por funcionalización, por ejemplo, de nanopartículas que encapsulan un principio activo y se injertan en la superficie con restos de manosa 6-fosfato (M6P).

35

Sin embargo, la principal desventaja de la manosa 6-fosfato (M6P) es la sensibilidad de su función fosfato a la hidrólisis por fosfatasas presentes en todos los órganos y en el suero. M6P luego se desfosforila y RM6P-CI ya no lo reconoce. La estabilidad de este marcador de reconocimiento es, por lo tanto, un factor determinante para su uso en el transporte de moléculas bioactivas.

40

Los análogos isostéricos de M6P no tienen el inconveniente de degradación por fosfatasas^{2,3,4}. El ligamiento de estos análogos isostéricos de M6P a la parte oligosacárida de las enzimas lisosómicas mejora la eficacia de estas enzimas para aplicaciones en la terapia enzimática sustitutiva⁵. El uso de estos análogos isostéricos también permite una focalización muy eficaz de las células cancerosas de los tumores de próstata que sobreexpresan el RM6P-CI, así como su tratamiento¹.

45

Para mejorar la afinidad por RM6P-CI, estos mismos análogos se sintetizaron en series de dimanosídica con un enlace glicosídico de tipo $\alpha(1,2)$. El disacárido 6-P-Man- $\alpha(1,2)$ -Man tiene una afinidad por RM6P-CI mayor que la del monosacárido M6P⁶. El enlace alfa 1,2 entre los dos restos manosa es muy importante para obtener una buena afinidad frente a RM6P-CI. Los enlaces alfa 1,3 o alfa 1,4 o alfa 1,6 conducen a una menor afinidad.

50

Sin embargo, el disacárido 6-P-Man- $\alpha(1,2)$ -Man tiene la desventaja de no ser estable en la sangre. En efecto, la función fosfato del disacárido 6-P-Man- $\alpha(1,2)$ -Man sufre hidrólisis por las fosfatasas presentes en el suero. Después de la desfosforilación por hidrolasas séricas, el disacárido formado Man- $\alpha(1,2)$ -Man no es reconocido por RM6P-CI, que es la diana biológica.

55

Hasta la fecha subsiste la necesidad de encontrar nuevos análogos isostéricos de M6P con afinidad mejorada hacia RM6P-CI, y que también sean estables en fluidos fisiológicos.

Objeto de la invención

60

Por lo tanto, uno de los objetos de la presente invención es proponer nuevos análogos isostéricos de M6P que tengan una afinidad muy alta hacia RM6P-CI.

65

Por análogo isostérico de M6P se entiende, un compuesto químico sintético que tiene la misma actividad biológica que M6P, pero mejor estabilidad.

Otro objeto de la invención es proponer nuevos análogos isostéricos de M6P que sean estables en fluidos fisiológicos.

5 Otro objeto de la invención es proponer nuevos análogos isostéricos M6P que tengan una afinidad mejorada hacia RM6P-Cl en relación con los análogos isostéricos de M6P descritos en la solicitud PCT/EP2010/05950⁵.

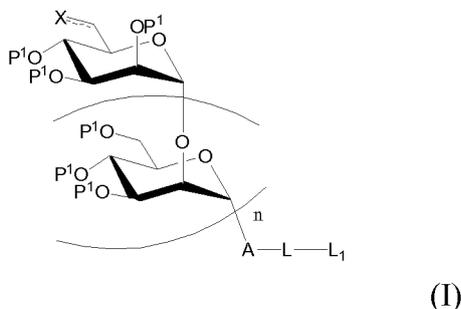
Por tanto los inventores han concebido nuevos compuestos di-, tri- o tetra-manosídicos multifuncionalizados todos, es decir, que tienen diferentes grupos funcionales, siendo dichos grupos funcionales capaces respectivamente de formar uno (o más) enlace(s) con RM6P-Cl y uno (o más) enlace(s) con un compuesto de interés Y.

10 La dificultad encontrada con los compuestos propuestos en la invención es encontrar una forma ventajosa de sintetizarlos, es decir, particularmente, una manera que sea sencilla de realizar, eficaz (buen rendimiento) y económica.

15 Por tanto, otro objeto de la invención es encontrar un método para la preparación de compuestos di-, tri- o tetra-manosídicos multifuncionalizados que sea ventajoso, es decir, que sea sencillo de realizar, eficaz y no costoso.

En efecto, la síntesis de compuestos di-, tri- o tetra-sacáridos es más complejo de realizar que el de los compuestos monosacáridos.

20 La presente invención se refiere a un compuesto caracterizado por que tiene la fórmula general (I):

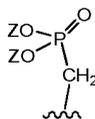


25 en donde:

- n es un número entero que varía de 1 a 3,
- ----- representa un enlace sencillo o un enlace doble,
- cada uno de P¹ representa independientemente entre si H, un grupo protector elegido particularmente entre trimetilsililo (TMS: (CH₃)₃Si-), tercbutildimetilsililo (TBDMS: tBuMe₂Si-), bencilo (Bn: C₆H₅CH₂-), para-metoxibencilo (PMB: 4-CH₃OC₆H₅CH₂-), orto-nitrobencilo (o-NO₂C₆H₅CH₂-), acetilo (Ac: CH₃CO-), benzoilo (Bz: C₆H₅CO-) o CF₃CO- (trifluoroacetilo),
- X representa:

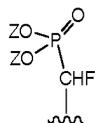
35 ◦◦ cuando ----- es un enlace sencillo:

◦◦◦ grupo fosfonato:



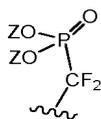
40

◦◦◦ grupo fluorofosfonato:

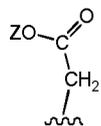


45

◦◦◦ grupo bi-fluorofosfonato:

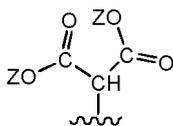


°°° grupo carboxilato:



5

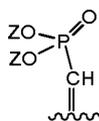
°°° el grupo malonato:



10

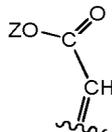
°° cuando ----- es un doble enlace:

°°° grupo fosfonato:



15

°°° grupo carboxilato:



20

con Z representando independientemente entre si H; un alquilo C₁-C₅, elegido particularmente entre metilo (Me: CH₃-), etilo (Et: C₂H₅) o isopropilo (iPr: (CH₃)₃C-); 2,2,2-trifluoroetilo (CF₃CH₂-); C₆H₅CH₂-; fenilo (Ph: C₆H₅-); (CH₃)₃Si-; un metal alcalino elegido entre Na, Li o K; un amonio NH₄;

° A representa un radical divalente elegido entre -O-, -S-, -NH-, -CH₂-

° L representa:

25

°° -H; -NH₂; -(CH₂)_{n1}-CH=CH₂ o -(CH₂)_{n1}-C≡CH con n₁ representando un número entero de 0 a 4, entonces en cada uno de estos casos L₁ está ausente,

°° un radical hidrocarburo divalente saturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, un radical hidrocarburo divalente insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 2 a 30 átomos de carbono,

30

°° un radical hidrocarburo divalente saturado o insaturado como se definió anteriormente de los cuales uno o más grupos -CH₂-, -CH=CH- y/o -C=C- del radical hidrocarburosaturado o insaturado se reemplaza(n) independientemente entre sí por un grupo éter (-O-); amino (-NH-); alquilamino (-NR₁-) con R₁ representando un alquilo C₁-C₅; tioéter (-S-); amido (-CO-NH-); carbamato (-NH-CO-O-); oxima -O-N=CH-; acilhidrazona -CO-NH-N=CH-; un sistema cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, sustituido o no;

35

° L₁ representa:

-(CH₂)_{n1}-CH=CH₂; -(CH₂)_{n1}-C≡CH; -(CH₂)_{n1}-N₃; -(CH₂)_{n1}SH; -(CH₂)_{n1}-NH₂; -(CH₂)_{n1}-N=C=O; -(CH₂)_{n1}-N=C=S; -(CH₂)_{n1}-NHR₁; -(CH₂)_{n1}-NR₁R₂; -(CH₂)_{n1}-A₁-NH₂; -(CH₂)_{n1}-A₁-NHR₁; -(CH₂)_{n1}-A₁-NR₁R₂; -(CH₂)_{n1}-NHCO-CH₂Ha₁; -(CH₂)_{n1}-COZ₁; -(CH₂)_{n1}-A₁COZ₁; -(CH₂)_{n1}-O-N=CH₂; -(CH₂)_{n1}-CO-NH-N=CH₂; -(CH₂)_{n1}-H; un sistema cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, sustituido o no; un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I; con n₁ como se definió anteriormente,

40

R₁ y R₂ representando independientemente entre sí un alquilo C₁-C₅,

A₁ representando -O-, -NH-,

Hal representando Cl, Br o I;

45

Z₁ representando -OH, -OR₁, -NHR₁, -NH-NH₂, -NH-NHR₁, -NH-NR₁R₂ con R₁ y R₂ como se definió anteriormente, un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I.

Como ejemplos de un radical hidrocarburo divalente saturado, lineal o ramificado, que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, se puede citar particularmente:

$-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_m-$; $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-$; $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-$; $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-$; $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-$;

5 $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-$;

con m representando independientemente entre sí un número entero de 0 a 30 con la condición de que la longitud de la cadena principal de hidrocarburo no supere los 30 átomos de carbono, y C_1-C_7 representando un alquilo que tiene de 1 a 7 átomos de carbono. Como un ejemplo de alquilo C_1-C_7 , puede mencionarse particularmente metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, heptilo.

10 Un radical hidrocarburo divalente insaturado, lineal o ramificado, que tiene de 2 a 30 átomos de carbono, representa un radical hidrocarburo que comprende uno o más dobles enlaces carbono-carbono y/o uno o más triples enlaces carbono-carbono. Como ejemplos de un radical hidrocarburo insaturado divalente se podrá mencionar particularmente:

- 15
- $\text{CH}=\text{CH}-$; $-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-$;
 - 20 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}$;
 - 25 - $\text{C}\equiv\text{C}-$; $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_m-$; $-(\text{CH}_2)_m-\text{C}=\text{C}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}=\text{C}-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_m-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{C}=\text{C}-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-$;
 - $(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-$;
 - 30 - $(\text{CH}_2)_m-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{C}_1-\text{C}_7)_2-(\text{CH}_2)_m-\text{CH}(\text{C}_1-\text{C}_7)-(\text{CH}_2)_m-\text{C}\equiv\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_m-$;

con m como se definió anteriormente.

35 Según la invención, el término "sistema" cíclico o heterocíclico significa, según el caso, el radical monovalente o divalente que proviene de un compuesto cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, como tal.

Entonces cuando L_1 representa un sistema cíclico o heterocíclico, será más precisamente un radical monovalente derivado de un compuesto cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado.

40 Cuando L representa un radical hidrocarburo saturado o insaturado que incluye uno o más grupos $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ y/o $-\text{C}=\text{C}-$ es (son) reemplazado(s) independientemente entre sí por un sistema cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, entonces dicho sistema cíclico o heterocíclico es un radical divalente derivado de un compuesto cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado.

45 A modo de ejemplo de un compuesto cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, será posible mencionar particularmente azetidina, oxetano, tietano, pirrol, piranosa, furanosa, furano, pirrolina, tetrahidrofurano, tiofeno, tetrahidrotiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, isoxazol, pirazolina, imidazolina, pirazolidina, imidazolidina, dioxolano, tiazol, isotiazol, tiazolidina, isoxazolidina, triazol, oxadiazol, tiadiazol, tiosuccinimida, tetrazol, piridina, naftiridina, ftalimida, pirano, dihidropirano, piperidina, piridazina, piridinio, pirimidina, purina, pirazina, pteridina, oxazina, dioxina, piperazina, maleimida, morfolina, dioxano, tiazina, tiomorfolina, oxatiano, ditiano, triazina, trioxano, tiadiazina, ditiadiazina, tritiano, 3-ciclobuteno-1,2-diona, ciclobutano, ciclobuteno, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexeno, cicloheptano, ciclohepteno, benceno, tolueno, naftaleno, indeno, indano, indolizina, indol, benzofurano, indolina, benzotiofeno, indazol, bencimidazol, benzotiazol, tetralina, quinolina, cromeno, cromano, cinolina, quinazolina, quinoxalina, ftalazina.

55 Según la invención, y como se indicó anteriormente, dicho radical hidrocarburo divalente saturado o insaturado, lineal o ramificado, y dicho sistema cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, también pueden estar sustituidos con uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C_1-C_7 , alqueno C_2-C_7 , alquiniilo C_2-C_7 , arilo, o por grupos funcionales.

60 Los ejemplos de grupos funcionales que pueden mencionarse incluyen funciones alcohol, amina, amida, cetona, éster, éter, tioéter o ácido carboxílico.

65 El término alqueno C_2-C_7 designa un radical hidrocarburo, lineal o ramificado, que tiene de 2 a 7 átomos de carbono y que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

El término alquinilo C₂-C₇ designa un radical hidrocarburo, lineal o ramificado, que tiene de 2 a 7 átomos de carbono y que tiene uno o más enlaces triples carbono-carbono.

5 El término arilo designa un sistema de hidrocarburo aromático mono-, bi- o tricíclico, que tiene de 6 a 18 átomos de carbono. A modo de ejemplo, se puede mencionar fenilo (C₆H₅), bencilo (C₆H₅CH₂), fenetilo (C₆H₅CH₂CH₂), toliilo (C₆H₄CH₃), xililo (C₆H₃(CH₃)₂), bencilideno (C₆H₅CH=CH), benzoilo (C₆H₅CO), bifenilo (o difenilo) (C₁₂H₉), naftilo (C₁₀H₇).

De acuerdo con una realización de la invención, en el compuesto de fórmula (1) como se definió anteriormente:

10

L representa:

◦ -NH₂, -(CH₂)_{n1}-CH=CH₂ o -(CH₂)_{n1}-C≡CH, con n₁ como se definió anteriormente (número entero que varía de 0 a 4), entonces en cada uno de estos casos L₁ está ausente,

15

◦ un radical hidrocarburo divalente saturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un radical hidrocarburo divalente insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 2 a 10 átomos de carbono,

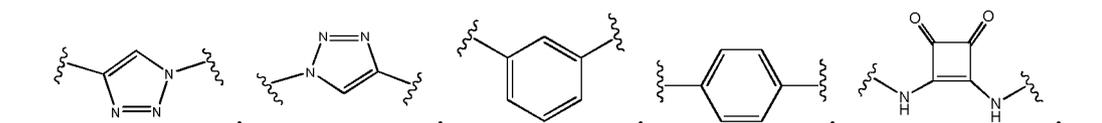
20

◦ un radical hidrocarburo divalente saturado o insaturado como se definió anteriormente, en que uno o más grupos -CH₂-, -CH=CH- y/o -C=C- del radical hidrocarburo saturado o insaturado es(son) reemplazado(s) independientemente entre sí por:

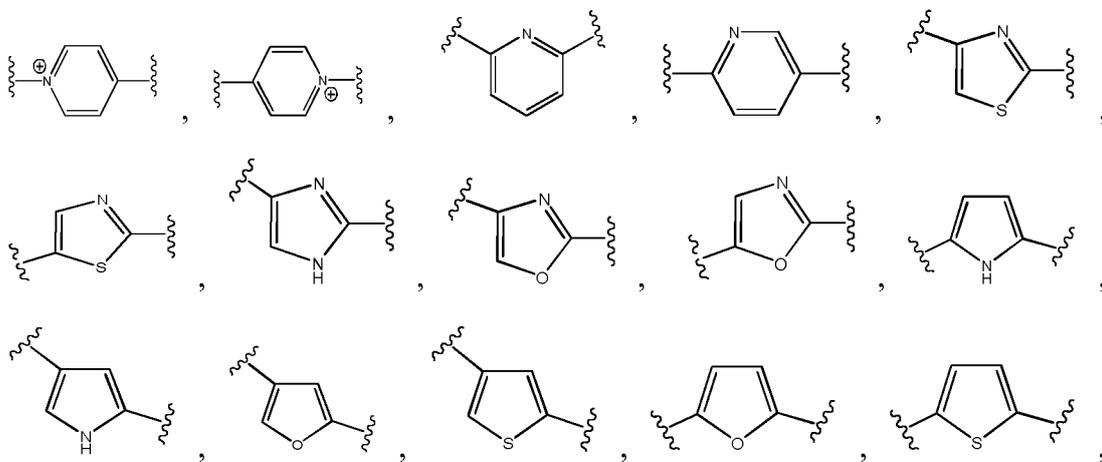
◦ un grupo -O-; -NH-; -S-; -CO-NH-; -NH-CO-O-; y/o

◦ un sistema cíclico o heterocíclico elegido entre:

25



30



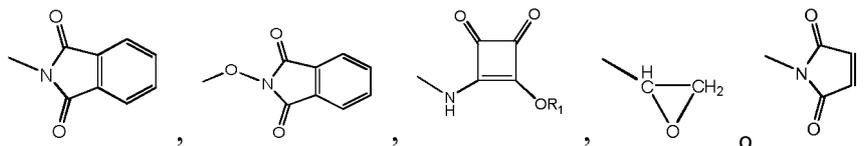
35

L₁ representa:

-(CH₂)_{n1}-CH=CH₂; -(CH₂)_{n1}-C≡CH; -(CH₂)_{n1}-N₃; -(CH₂)_{n1}-SH; -(CH₂)_{n1}-NH₂; -(CH₂)_{n1}-N=C=O; -(CH₂)_{n1}-N=C=S; -(CH₂)_{n1}-O-NH₂; -(CH₂)_{n1}-NHCO-CH₂Hal; -(CH₂)_{n1}-COOH; -(CH₂)_{n1}COOR₁; -(CH₂)_{n1}-CO-NH-NH₂; -(CH₂)_{n1}-H; un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I;

40

◦ un sistema cíclico o heterocíclico elegido entre:

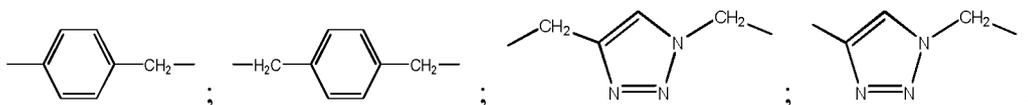


con n_1 , R_1 y Hal como se definió anteriormente.

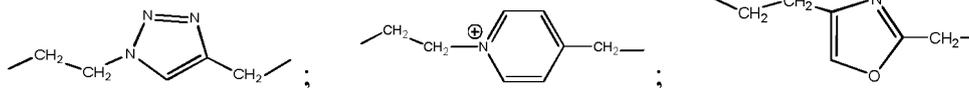
5 A modo de ejemplos de compuestos de fórmula (I) como se definió anteriormente, se pueden mencionar aquellos para los que:

◦ el sustituyente L se elige entre:

10 ∞ $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}\equiv\text{CH}$ o $-\text{NH}_2$ entonces en cada uno de estos casos L_1 está ausente,
 ∞ $-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; $-(\text{CH}_2)_3-$; $-(\text{CH}_2)_4-$; $-(\text{CH}_2)_5-$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$; $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$;

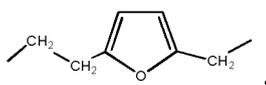


15



o

20

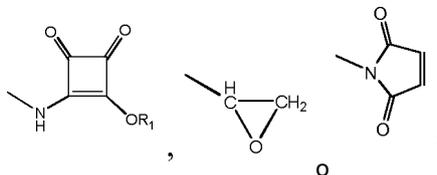


y

◦ el sustituyente L_1 se elige entre:

25

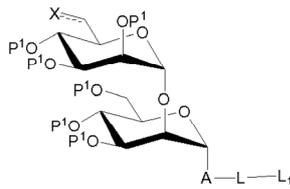
∞ $-\text{CH}=\text{CH}_2$; $-\text{C}=\text{CH}$; $-\text{N}_3$; $-\text{SH}$; $-\text{NH}_2$; $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$; $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$; $-\text{O}-\text{NH}_2$; $-\text{NHCO}-\text{CH}_2\text{Cl}$; $-\text{COOH}$; $-\text{COOR}_1$; $-\text{CO}-\text{NH}-\text{NH}_2$, un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I,
 ∞ un sistema cíclico o heterocíclico elegido entre:



30

con R_1 como se definió anteriormente.

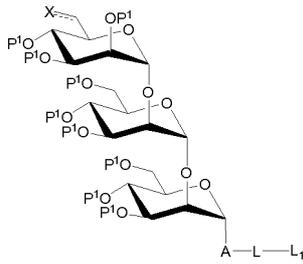
35 Un compuesto de fórmula (I) en donde n es igual a 1 es un disacárido, y más particularmente un di-manósido multifuncionalizado que corresponde a la fórmula:



(I)

Un compuesto de fórmula (I) en donde n es igual a 2 es un trisacárido, y más particularmente un tri-manósido multifuncionalizado que corresponde a la fórmula:

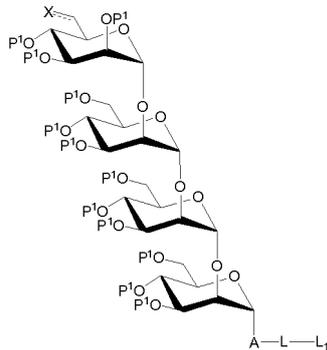
5



(I)

Un compuesto de fórmula (I) en donde n es igual a 3 es un compuesto de tetrasacárido, y más particularmente un tetra-manósido multifuncionalizado que corresponde a la fórmula:

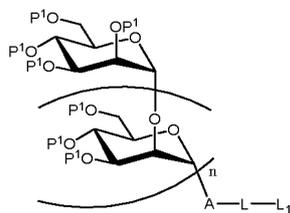
10



(I)

La invención también se refiere a un método para preparar un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, caracterizado por que el compuesto de partida utilizado es un compuesto de fórmula (II):

15

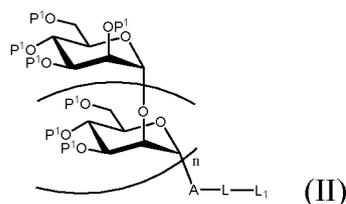


(II)

en donde P¹, n, A, L y L₁, son como se definieron anteriormente.

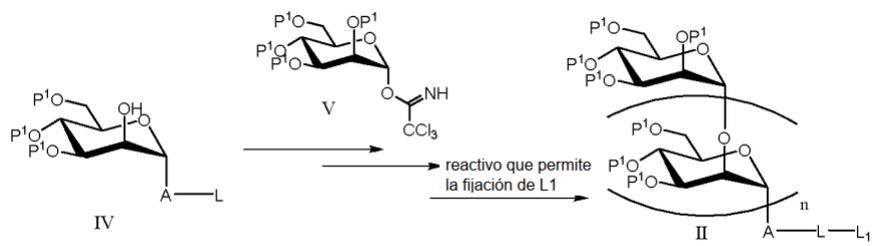
20 Estos compuestos son muy ventajosos porque permiten particularmente preparar compuestos de fórmula (I) en un número limitado de etapas y con un buen rendimiento.

El objeto de la invención es, por lo tanto, también un compuesto correspondiente a la fórmula general (II):

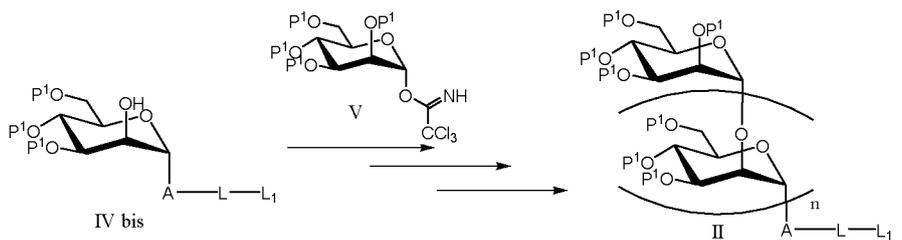


en donde P¹, n, A, L y L₁ son como se definieron anteriormente.

- 5 La preparación del compuesto de fórmula (II) se realiza por reacción entre un aceptor de glucósido (IV) o (IVbis) con un donante de glucósido (V), según uno de los esquemas de reacción a continuación:



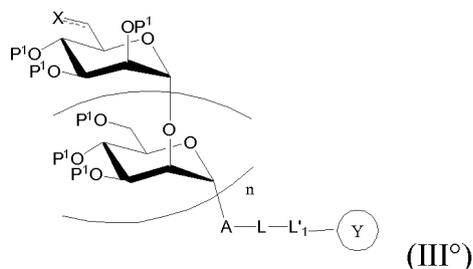
10 o



- 15 Los compuestos de la invención de fórmula (I) son particularmente ventajosos porque permiten, por un lado, dirigirse a RM6P-Cl con una afinidad muy alta y, por otro lado, porque son capaces de formar enlaces covalentes a nivel del grupo LL₁ con una gran cantidad de compuestos de interés ☉.

La presente invención también se refiere a un conjugado formado entre un compuesto de interés ☉ y el compuesto de fórmula (I).

- 20 La invención, por lo tanto, también se refiere a un conjugado caracterizado por que corresponde a la fórmula general (III):



- 25 en donde X, P¹, n, A y L son como se definieron anteriormente, L₁' representa el sustituyente L₁ como se definió anteriormente implicado en un enlace covalente con un grupo funcional llevado por un compuesto de interés ☉, dicho compuesto de interés ☉ siendo seleccionado entre enzimas, nanopartículas, proteínas, anticuerpos o agentes citotóxicos.

30 De acuerdo con una realización de la invención, el conjugado de fórmula (III) como se definió anteriormente tiene un

valor CI_{50} para el receptor de manosa 6-fosfato independiente de catión (RM6P-CI) de al menos 10^{-5} M, y preferentemente de 10^{-6} a 10^{-9} M.

5 Por valor de CI_{50} se entiende la concentración de compuestos capaces de inhibir la unión de RM6P-CI a su ligando, pentamano 6-fosfato (PMP), previamente adsorbido.

Como ejemplos más específicos del compuesto de interés \textcircled{Y} , se puede mencionar una enzima lisosómica como una nanopartícula, especialmente una nanopartícula de sílice.

10 De acuerdo con una realización de la invención, la nanopartícula puede incorporar un fotosensibilizador neutro de tipo porfirina.

Como ejemplos de enzimas lisosómicas, se podrán mencionar las elegidas entre alfa glucosidasa ácida, betagalactosidasa-1 ácida, esfingomielinasa ácida, alfa-D-manosidasa, alfa-fucosidasa, alfa-galactosidasa A, 15 alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, alfa-glucosidasa, alfa-L-iduronidasa, alfa-N-acetilgalactosaminidasa, alfaacetilglucosaminidasa, alfa-D-neuraminidasa, arilsulfatasa A, arilsulfatasa B, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, beta-manosidasa, catepsina D, catepsina K, ceramidasa, cistinosina, factor de activación del gangliósido GM2, galactocerebrosidasa, glucocerebrosidasa, heparán sulfatasa, hexosaminidasa A, hexosaminidasa B, hialuronidasa, iduronato-2-sulfatasa, LAMP2, lipasa de ácido lisosómico, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, 20 N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, N-aspartilbeta-glucosaminidasa, palmitoil-tioesterasa-1, fosfatasa ácida, proteína protectora/catepsina A (PPCA), sialina, tripeptidil peptidasa 1.

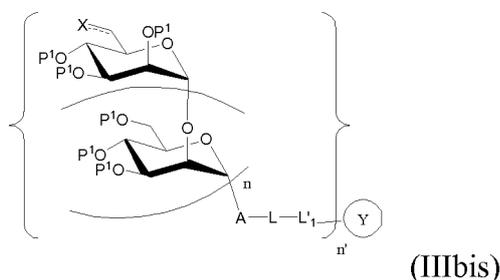
25 Dichas enzimas se obtienen por ingeniería genética en sistemas de producción que permiten obtener proteínas recombinantes biológicamente activas y funcionales. Por ejemplo, para la producción de glicoproteínas lisosómicas, se utiliza el sistema de baculovirus/células de insecto sf9.

La invención también se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, para formar al menos un enlace covalente con al menos un grupo funcional portado por un compuesto de interés \textcircled{Y} , dicho 30 compuesto de interés \textcircled{Y} siendo seleccionado entre enzimas, nanopartículas, proteínas, anticuerpos o agentes citotóxicos.

Según una realización ventajosa de la invención, los compuestos de fórmula (I) pueden reaccionar con uno o varios grupo(s) funcional(es) portado(s) por dicho compuesto de interés Y, siendo n' un número entero que varía de 1 a 1000, y preferentemente de 1 a 100, para formar enlaces covalentes. 35

Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de uno o varios compuestos de fórmula (I) para formar un enlace o enlaces covalentes con un grupo o grupos funcionales del compuesto de interés, con n' como se definió anteriormente. 40

El objeto de la invención es también el uso de uno o más compuestos de fórmula (I) como se definió anteriormente para formar el conjugado de fórmula general (IIIbis):



45 en donde P^1 , X, n, n' , A, L, $L'1$ y \textcircled{Y} son como se definieron anteriormente.

Cuando n' es un número entero igual a 1, entonces el conjugado de fórmula general (III) y el conjugado de fórmula general (IIIbis) son idénticos.

50 El término conjugado de fórmula general (III) se refiere a un polisacárido de fórmula (I) unido covalentemente a nivel de su grupo L-, con un grupo funcional del compuesto de interés \textcircled{Y} .

El término "conjugado de fórmula general (IIIbis)" se refiere, cuando n' no es igual a 1, a al menos dos polisacáridos de fórmula (I) unidos covalentemente con al menos dos grupos funcionales del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$.

5 Por ejemplo, cuando el compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ es una nanopartícula, el conjugado (IIIbis) puede comprender 100 polisacáridos de fórmula (I) que forman respectivamente 100 enlaces covalentes con 100 grupos funcionales portados por la nanopartícula.

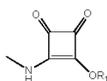
10 El grupo LL_1 de los compuestos (I) de la invención son como se definieron anteriormente y son capaces de unirse mediante un enlace covalente, directamente o después de la activación, a al menos una de las funciones presentes naturalmente o introducidas artificial en el compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$.

15 Como se mencionó anteriormente en la definición de los sustituyentes L y L_1 , el sustituyente LL_1 de los compuestos (I) de la invención puede comprender particularmente un grupo reactivo elegido entre ácido carboxílico y sus sales, cloruro de ácido, éster (éster de alquilo, éster de p-nitrofenilo, éster de succinimidilo, éster de sulfosuccinimidilo, etc.), azido (acil azida, azidonitrofenilo, etc.), hidrazida, 3-acil-1,3-tiazolidina-2-tiona, amina sustituida o no, O-alquiloxiamina, amonio cuaternario, isocianato, isotiocianato, hidracina, ftalimido, maleimida, haloacetamida, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina mono- o dihalogenada, tiol, cloruro de sulfonilo, sulfona, disulfuro, hidroxilo, epóxido o imidazolilo.

20 En una realización particular, el sustituyente LL_1 comprende un grupo carbonilo reactivo seleccionado entre acil hidrazida, hidrazina u O-alquiloxiamina. La reacción entre dicha acilhidrazida, hidrazina u O-alquiloxiamina con un grupo carbonilo del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ conduce respectivamente a un enlace acilhidrazona, hidrazona o un enlace de oxima. Este tipo de grupos químicos generalmente es útil para unir glicoproteínas (compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$): los grupos carbonilo (ya sea de naturalmente presentes o inducidos por la oxidación de las funciones hidroxilo de las cadenas de glicosilo de la glicoproteína) disponibles en los fragmentos de oligosacáridos de la glicoproteína se hacen reaccionar con los grupos carbonilo reactivos de los compuestos (I) de la invención.

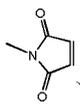
Como ejemplos más particulares:

- 30 - funciones carbonilo del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ pueden reaccionar con las funciones O-alquilamina o acilhidrazida del compuesto (I) (es decir, $L_1 = -O-NH_2$ o $-CO-NH-NH_2$) para conducir a la formación de oxima o enlaces de acilhidrazona;
- funciones de amina del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ pueden reaccionar con funciones de escuarato de etilo o éster activado del compuesto (I) (es decir, por ejemplo $L_1 =$



o $-COOH$ activado con N-hidroxisuccinimida (NHS) o con hidroxibenzotriazol (HOBt)) para conducir a la formación de enlaces escuarato o enlaces amida;

- 40 - funciones tiol del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ pueden reaccionar con las funciones tiol, disulfuro, maleimida del compuesto (I) (es decir, $L_1 = -SH$, $-S-S-R_1$ con R_1 alquilo C_1-C_5),



- 45 para conducir a la formación de enlaces disulfuro o tioleno;
- funciones alquino o azida del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ pueden reaccionar respectivamente con una función azida del compuesto (I) (es decir, $L_1 = N_3$) o alquino (es decir, $L_1 = -C=CH$) para conducir a la formación de un triazol (que implica una reacción de cicloadición entre la azida y el alquino).

50 Según la invención, la elección del sustituyente LL_1 , del compuesto (I) dependerá de la naturaleza del compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ y los grupos funcionales portados por este último.

En efecto, los expertos en la materia entienden fácilmente que la longitud del sustituyente LL_1 aumentará con el impedimento estérico asociado al compuesto de interés $\text{\textcircled{Y}}$ que debe unirse.

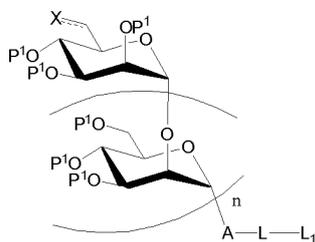
55

Por ejemplo, si el compuesto de interés ☉ es una proteína o glicoproteína, entonces un sustituyente LL₁ que no tiene más de 2 o 3 átomos consecutivos será suficiente para asegurar una afinidad satisfactoria entre el compuesto (I) y RM6P-CI.

5 Por el contrario, si el compuesto de interés ☉ es una proteína o nanopartícula que provoca un impedimento estérico significativo en la proximidad de los sitios de enlace M6P del RM6P-CI, entonces un sustituyente LL₁ que comprende más de 2 o 3 átomos consecutivos será necesario para asegurar una afinidad satisfactoria entre el compuesto (I) y RM6P-CI.

10 La presente invención también se refiere a un método para preparar un conjugado de fórmula (III) como se definió anteriormente o un conjugado de fórmula (IIIbis) como se definió anteriormente, caracterizado por que se hacen reaccionar:

- al menos un grupo funcional portado por un compuesto de interés ☉, dicho compuesto de interés siendo como se definió anteriormente, con
- al menos un compuesto correspondiente a la fórmula (I):



(I)

20 en donde P¹, X, n, A, L y L₁, son como se definieron anteriormente.

De acuerdo con una realización de la invención, se hará reaccionar por ejemplo un compuesto de fórmula (I) como se definió anteriormente, en donde P¹ representa un hidrógeno, y X, n, A, L, L₁ son como se definieron anteriormente, con al menos un grupo funcional portado por el compuesto de interés ☉ como se definió anteriormente.

Otro objeto de la invención se refiere a un conjugado de fórmula (III) como se definió anteriormente o un conjugado de fórmula (IIIbis) como se definió anteriormente:

- 30 - para su uso en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, particularmente elegido entre enzimoterapia sustitutiva, terapia fotodinámica o tratamiento del cáncer, y/o
- para su uso en un método de diagnóstico, particularmente de diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas a un aumento o disminución de la expresión de RM6P-CI.

35 En efecto, debido a su alta afinidad por RM6P-CI, los conjugados (III) y (IIIbis) de la invención son particularmente útiles para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la expresión de RM6P-CI.

40 Cuando el compuesto de interés ☉ es una nanopartícula que incorpora un fotosensibilizador de tipo porfirina, entonces el conjugado de la invención de fórmula (III) o (IIIbis) será particularmente adecuado para la terapia fotodinámica.

Como ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con el conjugado (III) o (IIIbis) de la invención, se pueden mencionar las enfermedades causadas por una deficiencia del compuesto de interés ☉ en el lisosoma. Esta deficiencia puede compensarse mediante la administración del conjugado de la invención, que es capaz de administrar específicamente al lisosoma el compuesto de interés ☉ deficiente.

Descripción de las figuras

50 La invención se entenderá mejor a la luz de los siguientes ejemplos no limitantes y puramente ilustrativos, y las Figuras 1 y 2 siguientes.

La figura 1 es una comparación de la citotoxicidad de los disacáridos de fosfonato **18**, **19** (es decir, M6Pn-α(1,2)-Man-Etil-NH₂ y M6Pn-α(1,2)-Man-EtilSq) y carboxilatos **24** y **25** (es decir, M6C-α(1,2)-Man-Etil-NH₂ y M6C-α

(1,2)-Man-EtilSq) de fórmula (I) de la invención en células LNCaP y sus respectivos homólogos de monosacáridos.

La **figura 2** representa los efectos fototóxicos, en células LNCaP, nanopartículas de sílice solas (MSN) y nanopartículas de sílice (MSN) injertadas en análogos carboxilatos monosacárido (M6C-EtilSq) y disacárido **25** (M6C- α (1,2)-Man-EtilSq) en diferentes tiempos de incubación. Las nanopartículas injertadas en el análogo carboxilato monosacárido y en el análogo carboxilato disacárido están representadas respectivamente por "MSN-M6C-EtilSq" y "MSN-M6C- α (1,2)-Man-EtilSq".

La **figura 3** indica el ensayo de la actividad catalítica de GAA en mioblastos de pacientes con la forma adulta de la enfermedad de Pompe después de incubación durante 48 h en presencia de rhGAA 50 nM o el conjugado de fórmula (III) de la invención, es decir, el conjugado rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (**28**) (denominado rhGAA-M6Pn**28** en la fig. 3).

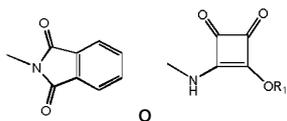
La **figura 4** presenta el análisis de las cantidades de GAA maduro por transferencia de Western con un anticuerpo anti-GAA humano (anti-LYAG, Genetex) o anti-actina humana (Invitrogen) después de incubación de mioblastos durante 48 h en presencia de rhGAA 50 nM o el conjugado de fórmula (III) de la invención, es decir, el conjugado rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (**28**) (denominado rhGAA-M6Pn**28** en la fig. 4).

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1:

Síntesis de compuestos de fórmula (I)

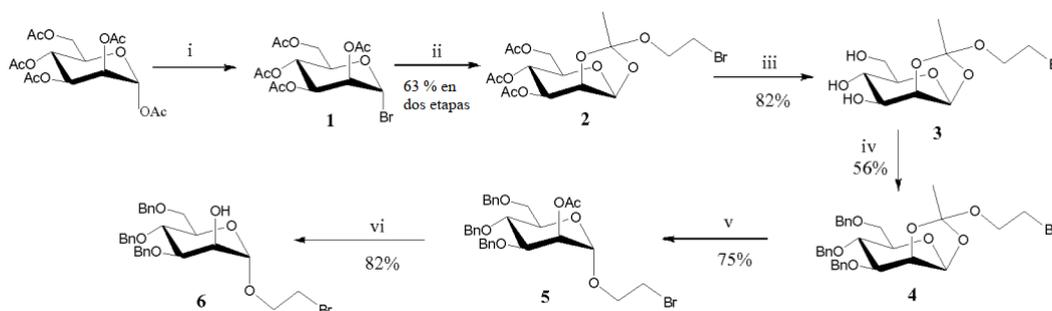
Este ejemplo describe la preparación de disacáridos multifuncionalizados correspondientes a la fórmula (I) en donde n es un número entero igual a 1; P¹ representa independientemente entre sí H, (CH₃)₃Si- o C₆H₅CH₂-; ----- representa un enlace sencillo o doble; X representa el grupo fosfonato o el grupo carboxilato con Z representando independientemente entre sí H, etilo, Na; A representa oxígeno; L representa -CH₂CH₂-; L₁ representa -Br, -NH₂, -N₃,



1) Preparación de disacáridos. **9, 10, 11 y 12** que responden a la fórmula (II)

a) Preparación de un aceptor de sacárido **6**: 3,4,6-tri-O- bencil- α -D-manopiranosido de 2-bromoetilo

El método para preparar un compuesto aceptor de sacárido **6** según la fórmula general (IVbis), en donde P¹ representa Bn, A representa O, L representa CH₂-CH₂ y L₁ representa Br, se ilustra a continuación:



El compuesto de partida es α -D-manosa pentaacetilada sobre la que se introduce un bromo anomérico usando ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético para formar el compuesto. **1**. el intermedio **1** luego se hace reaccionar con 2-bromoetanol y 2,6-lutidina para formar el ortoéster **2** con un rendimiento del 63 % en dos etapas. Los acetatos presentes en las posiciones 3, 4 y 6 del ortoéster **2** luego se saponifican para conducir al intermedio **3** con un rendimiento del 82 %. Esta etapa de desprotección es total y no requiere purificación. Estas mismas posiciones 3, 4 y 6 luego se bencilan por la acción del bromuro de bencilo para formar el compuesto **4** con un rendimiento del 56 %. El ortoéster **4** luego se abre en presencia de BF₃.Et₂O y 2-bromoetanol para formar el intermedio clave **5** con un rendimiento del 75 %. El compuesto **5** se funcionaliza así en la posición anomérica y lleva un grupo protector en la posición 2 ortogonal a los grupos de las posiciones 3, 4 y 6. Por tanto es posible desproteger selectivamente esta posición 2 con la ayuda de una solución de sosa para obtener el intermedio **6** con un rendimiento del 82 %.

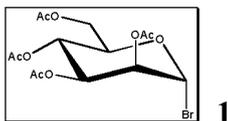
El aceptor sacárido **6** está funcionalizado en posición anomérica: el sintón **6** por lo tanto, será común independientemente del disacárido de fórmula (II) deseado.

Condiciones y reactivos: (i) HBr 33 %, AcOH, TA, 1h; (ii) 2-bromoetanol, 2-6-lutidina, DCM, 40 °C, 3h; (iii) NaOH 1 N, THF, TA, 16h; (iv) BnBr, NaH, DMF, TA, 21h; (v) 2-bromoetanol, BF₃.Et₂O, TA, 1h30; (vi) NaOH 1 N, THF, TA 21 h.

Parte experimental

5

Preparación de 1-bromo-2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranososa 1:



10 Se disuelven 10 g de α -D-manosa pentaacetato en 20 ml de una solución de ácido bromhídrico al 33 % en ácido acético. La solución amarilla se agita durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se enfría a 0 °C, se diluye con 30 ml de CH₂Cl₂ y se neutraliza con solución saturada de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (5x100 ml). Las fases orgánicas se combinan, se secan en MgSO₄ y se concentran para conducir al compuesto **1** (11,9 g) que se usa para la siguiente etapa sin purificación.

15

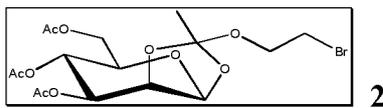
Fórmula química **1:** C₁₄H₁₉BrO₉

Masa exacta: 410,02 g.mol⁻¹

Rr: 0,76 [AcOEt/Ciclo (1:1)]

20

Preparación de 1,2-O-(1-(2-bromoetoxi)etiliden)-3,4,6-tri-O-acetil- α -D-manopiranososa 2:



25 Se añaden 11,08 g (1 eq; 26,9 mmol) del compuesto **1** se disuelven en 9,5 ml de CH₂Cl₂ y 9,4 ml (3 eq; 80,7 mmol) 2,6-lutidina. 4,8 ml (2,5 eq; 67,25 mmol) de 2-bromoetanol. El medio de reacción naranja se calienta a 40 °C y se agita durante 4 horas. Se forma un precipitado blanco. La solución se enfría a temperatura ambiente y se añaden 12 ml de Et₂O. El precipitado se filtra. El filtrado se diluye con 30 ml de CH₂Cl₂ y se lava sucesivamente con 30 ml de agua, 30 ml de solución saturada de NaHCO₃ y 30 ml de salmuera. Las fases acuosas combinadas se extraen con 50 ml de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinan y luego se secan sobre MgSO₄ y se concentran. El residuo obtenido se disuelve en 20 ml de CH₂Cl₂ y se añaden 25 ml de etanol. La solución se enfría a -30 °C para producir el compuesto **2** en forma de cristales blancos con un rendimiento del 51 % (6,268 g, 13,8 mmol) en dos etapas.

30

Fórmula química **2:** C₁₆H₂₃BrO₁₀

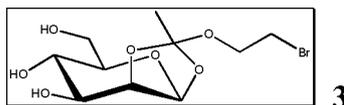
Masa exacta: 454,05 g.mol⁻¹

Rr: 0,49 [Ciclo/AcOEt (1:1)]

SM, ESI⁺ m/z: 477 [M+Na]⁺

35

Preparación de 1,2-O-(1-(2-bromoetoxi)etiliden)- α -D-manopiranososa 3:



4,79 g (1 eq; 10,6 mmol) del compuesto **2** se disuelven en 22 ml de THF. Se añaden 43 ml de una solución acuosa de NaOH 1 N. La solución se vuelve turbia. Se añaden 2 ml de metanol y la solución se vuelve transparente. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 h. Se añaden 250 ml de acetato de etilo y la fase acuosa se extrae con 3x200 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinan y luego se secan sobre MgSO₄ y se concentran. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida automatizada sobre gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH: de 0 a 5 % en 15 min; 5 % durante 10 min; de 5 a 10 % durante 15 minutos) para producir el compuesto **3** como un aceite incoloro con un rendimiento del 82 % (2,86 g, 8,69 mmol).

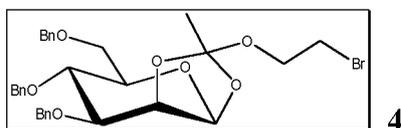
45

50

Fórmula química **3:** C₁₀H₁₇BrO₇

Masa exacta: 328,02 g.mol⁻¹
 Rf: 0,36 [CH₂Cl₂/MeOH (9:1)]
 SM, ESI⁻ m/z: 373 [M-H+HCOOH]⁻

5 Preparación de 1,2-O-(1-(2-bromoetoxi)etiliden-3,4,6-tri-O-bencil-α-D-manopiranososa 4

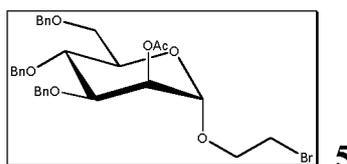


2,86 g (1 eq; 8,69 mmol) del compuesto **3** se disuelven en 40 ml de DMF. Se añaden 4,2 ml (4 eq; 34,76 mmol) de bromuro de bencilo. La mezcla de reacción se enfría a 0 °C y se añaden 874 mg (3 eq; 26 mmol) de dispersión de NaH al 60 % en aceite. Después de 17h30 de agitación a temperatura ambiente, queda algo de producto parcialmente bencilado. La adición de un equivalente de bromuro de bencilo y NaH no hacer evolucionar la reacción. Se añaden 50 ml de Et₂O y 40 ml de agua. La fase acuosa se extrae con 2x100 ml de Et₂O. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con 5x80 ml de agua y luego se secan sobre MgSO₄ y se concentran. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida automatizada sobre gel de sílice (ciclohexano/Et₂O: de 0 a 10 % en 15 min; 10 % durante 10 min; del 10 al 20 % en 15 min; 20 % durante 50 min; 20 a 40 % en 30 min) para conducir al compuesto **4** como un sólido blanco con un rendimiento del 56 % (2,92 g, 4,87 mmol).

Fórmula química **4**: C₃₁H₃₅BrO₇

Masa exacta: 598,16 g.mol⁻¹
 Rf: 0,43 [Ciclo/Et₂O (1: 1)]
 SM, ESI⁺ m/z: 621 [M+Na]⁺

25 Preparación de 2-O-(3-acetil-3,4,6-tri-O-(3-bencil-α-D-manopiranosido de 2-bromoetilo 5

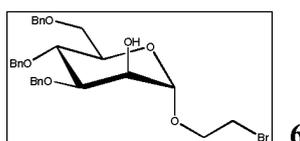


1 g (1 eq; 1,67 mmol) del compuesto **4** se disuelve en 20 ml de CH₂Cl₂. Se añaden 236 μl (2 eq; 3,34 mmol) de 2-bromoetanol y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 min. 211 μl (1 eq; 1,67 mmol) de BF₃.Et₂O. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 h. La solución se vuelve de color amarillo pálido. La reacción se diluye con 50 ml de solución saturada de NaHCO₃. La fase acuosa se extrae con 3x50 ml de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinan, se lavan con 100 ml de salmuera y luego se secan sobre MgSO₄ y se concentran. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida automatizada sobre gel de sílice (ciclohexano/Et₂O: 0 a 30 % en 30 min; 30 % durante 20 min) para conducir al compuesto **5** como un aceite incoloro con un rendimiento del 75 % (750 mg; 1,25 mmol).

Fórmula química **5**: C₃₁H₃₅BrO₇

Masa exacta: 598,16 g.mol⁻¹
 Rf: 0,45 [Ciclo/Et₂O (1: 1)]
 SM, ESI⁺ m/z: 621 [M+Na]⁺

45 Preparación de 3,4,6-tri-O-bencil-α-D-manopiranosido de 2-bromoetilo 6:



750 mg (1 eq; 1,25 mmol) del compuesto **5** se disuelven en 1,6 ml de THF. Se añaden 2,5 ml (2 eq; 2,5 mmol) de una solución de NaOH 1 N. La solución se vuelve turbia. La solución se agita a temperatura ambiente durante 21 h. La solución se neutraliza con solución de HCl 1 N. Se añaden 40 ml de CH₂Cl₂. La fase acuosa se extrae con 3x40 ml de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinan y luego se secan sobre MgSO₄ y se concentran. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida automatizada sobre gel de sílice (ciclohexano/Et₂O: de 0 a 20 % en 15 min; 20 % durante 10 min; del 20 al 30 % en 15 min; 30 % durante 15 min) para conducir al compuesto **6** como un aceite

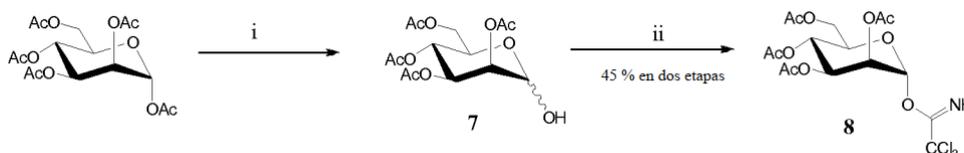
incolore con un rendimento del 82 % (575 mg; 1,03 mmol).

Fórmula química **6**: $C_{29}H_{33}BrO_6$

5 Masa exacta: 556,16 g.mol⁻¹
Rf: 0,29 [Ciclo/Et₂O (7:3)]
SM, ESI⁺ m/z: 579 [M+Na]⁺

b) Preparación de un dador de sacárido **8: tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranososa**

10 El método para preparar un compuesto dador de sacárido **8** que responde a la fórmula general (V), en donde P¹ representa Ac, se ilustra a continuación:



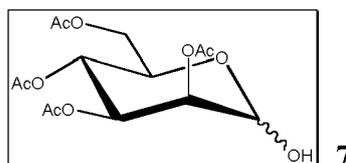
15 El compuesto de partida es α -D-manosa pentaacetilada que se desprotege en la posición anomérica usando morfolina para dar el compuesto **7** sin purificación. El tricloroacetimidato **8** luego se forma por reacción del compuesto **7** con tricloroacetinitrilo en presencia de DBU.

20 Condiciones y reactivos: (i) morfolina, DCM, reflujo, 3h30; (ii) Cl₃CCN, DBU, DCM, TA, 4 h.

Parte experimental

Preparación de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-manosa **7**:

25



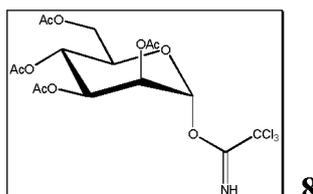
30 3 g (1 eq; 7,69 mmol) de α -D-manosa pentaacetato se disuelven en 18 ml de CH₂Cl₂. Se añaden 2,7 ml (4 eq; 30,76 mmol) de morfolina. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3h30 y luego se enfría a temperatura ambiente. La solución se neutraliza con una solución de HCl 1 N. La fase orgánica se lava con 3x10 ml de agua, se seca sobre MgSO₄ y se concentra para producir el producto **7** como un aceite amarillo usado directamente para la siguiente etapa.

Fórmula química **7**: $C_{14}H_{20}O_{10}$

35

Masa exacta: 348,30 g.mol⁻¹
Rf: 0,38 [Ciclo/AcOEt (1:1)]
SM, ESI⁻ m/z: 393 [M-H+HCOOH]⁻

40 Preparación de tricloroacetimidato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranososa **8**:



45 1,34 g (1 eq; 3,85 mmol) del compuesto **7** se disuelven en 8,6 ml de CH₂Cl₂. La solución amarilla se enfría a 0 °C. Se añaden 2,7 ml (7 eq; 26,95 mmol) de tricloroacetinitrilo y 575 μ l de DBU (1,8-diazabicyclo[5.5.0]undec-7-eno). La solución se vuelve marrón. El medio de reacción se agita durante 4 h a temperatura ambiente y luego se concentra. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ciclohexano/Et₂O: 50 % durante 25 min) para conducir al producto **8** como un aceite amarillo pálido con un rendimiento del 45 % (860 mg; 1,75 mmol). El producto relativamente inestable se usa rápidamente.

50

Fórmula química **8**: $C_{16}H_{20}Cl_3NO_{10}$

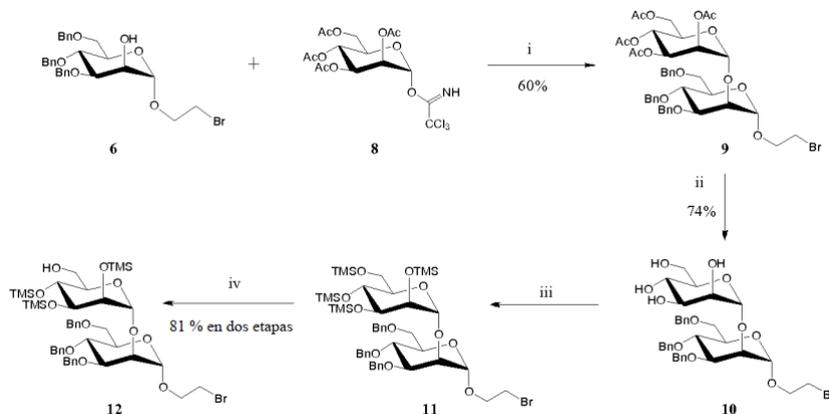
Masa exacta: 492,69 g.mol⁻¹

Rf: 0,4 [Ciclo/Et₂O (3:7)]

5

c) Preparación de los disacáridos **9**, **10**, **11** y **12**

El método para preparar los disacáridos **9**, **10**, **11** y **12** que responden a la fórmula (II) se ilustra a continuación:



10

La reacción de glicosilación entre el aceptor de fórmula IV o IVbis, especialmente el sacárido **6**, y el dador de fórmula V, especialmente el sacárido **8**, permite obtener el compuesto de fórmula (II), especialmente el disacárido **12**, que ocupa una posición central en la estrategia de síntesis de la invención. En efecto, el compuesto de fórmula (II) permite divergir hacia todos los compuestos de fórmula (I) de la invención. Los análogos isostéricos de M6P de la invención (I) son de hecho accesibles desde el compuesto de fórmula (II).

15

El método de síntesis de la invención confiere flexibilidad en la producción de los análogos disacáridos de fórmula (I) de la invención, pero también a los análogos tri- o tetra-sacáridos de fórmula (I) de la invención.

20

Los respectivos compuestos "aceptor sacárido" **6** y "dador sacárido" **8** como se prepararon anteriormente, se hacen reaccionar en presencia de triflato de trimetilsililo para formar el disacárido **9** con un rendimiento del 60 %. Los grupos acetato se saponifican luego para producir el compuesto **10** con un rendimiento del 74 %. Los alcoholes desprotegidos así se trimetilsililan por la acción del cloruro de trimetilsililo para formar el intermedio **11**. La posición 6 luego se desilila selectivamente en presencia de carbonato potásico en metanol para dar el disacárido **12** con un rendimiento del 81 % en dos etapas.

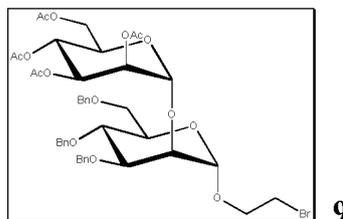
25

Condiciones y reactivos: (i) TMSOTf, DCM, -30 °C, 30 min; (ii) NaOH 1 N, THF, TA, 18h; (iii) TMSCl, NEt₃, DCM, TA, 18h; (iv) K₂CO₃, MeOH, TA, 1h45.

30

Parte experimental

Preparación de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosido bromoetilo **9**:



35

430 mg (1 eq; 0,77 mmol) del compuesto **6** y 860 mg (2,27 eq; 1,75 mmol) del compuesto **8** se disuelven en 15 ml de CH₂Cl₂ en presencia de 7 g de tamiz molecular 4Å previamente activado. El medio de reacción se agita durante 30 min a temperatura ambiente y luego se enfría a -30 °C. 167 μ l (1,2 eq; 0,924 mmol) de TMSOTf se añaden gota a gota. La mezcla de reacción se agita a -30 °C durante 1h15. El medio de reacción se neutraliza a continuación con 3,5 ml de piridina. Después de filtración sobre Celite, el filtrado se concentra y luego se coevapora con tolueno. El residuo (sólido amarillo pálido) obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida automatizada sobre gel de sílice (ciclohexano/Et₂O: 30 % durante 110 min) para conducir al producto **9** como un aceite incoloro con un rendimiento del 64 % (441 mg; 0,497 mmol).

40

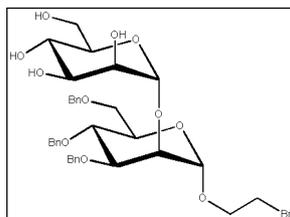
Fórmula química **9**: $C_{43}H_{51}BrO_{15}$

Masa exacta: 886,24 g.mol⁻¹

R_f: 0,56 [Ciclo/Et₂O (2:8)]

SM, ESI⁺ m/z: 909 [M+Na]⁺

Preparación de α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-bencil-α-D-manopiranosido de bromoetilo 10:

**10**

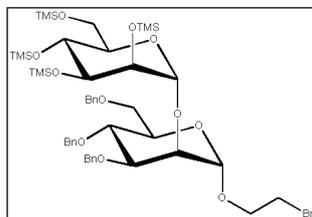
5,84 g (1 eq, 6,58 mmol) del compuesto **9** se disuelven en 16 ml de THF. Se añaden 33 ml (5 eq, 32,9 mmol) de una solución de sosa 1 M. La solución se vuelve turbia. Se añaden 1,5 ml de metanol. La solución se agita a temperatura ambiente durante 18h y luego se neutraliza con una solución de HCl 1 M y se concentra. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/MeOH: 0 % (500 ml); 5 % (500 ml); 7 % (500 ml); 10 % (1 l)) para conducir al compuesto **10** en forma de espuma blanca con un rendimiento del 74 % (3,5 g, 4,86 mmol).

Fórmula química **10**: $C_{35}H_{43}BrO_{11}$

Masa molar: 718,2 g.mol⁻¹

R_f: 0,41 [DCM/MeOH (9:1)]

Preparación de 2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-bencil-α-D-manopiranosido de bromoetilo 11:

**11**

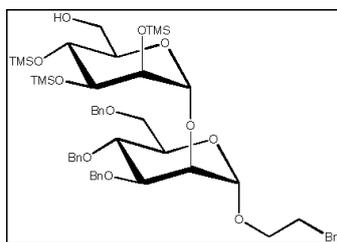
3,4 g (1 eq, 4,72 mmol) del compuesto **10** se disuelven en 24 ml de DCM recién destilado y 19 ml (30 eq; 141,6 mmol) de trietilamina. La solución se enfría a 0 °C y 4,8 ml (8 eq; 37,8 mmol) de cloruro de trimetilsililo se añaden gota a gota. Después de agitar durante 18 h a temperatura ambiente, aún queda un poco de producto de partida. Se añaden 1,2 ml (2 eq; 9,44 mmol) de cloruro de trimetilsililo se añaden gota a gota. Después de 1h30 de agitación a temperatura ambiente, no hay evolución. La solución se concentra. El residuo rosa se disuelve en ciclohexano y se filtra sobre Celite. El filtrado se concentra para obtener el compuesto **11** en forma de un aceite marrón claro usado directamente para la siguiente etapa.

Fórmula química **11**: $C_{47}H_{75}BrO_{11}Si_4$

Masa molar: 1008,34 g.mol⁻¹

R_f: 0,78 [Ciclo/Et₂O (7:3)]

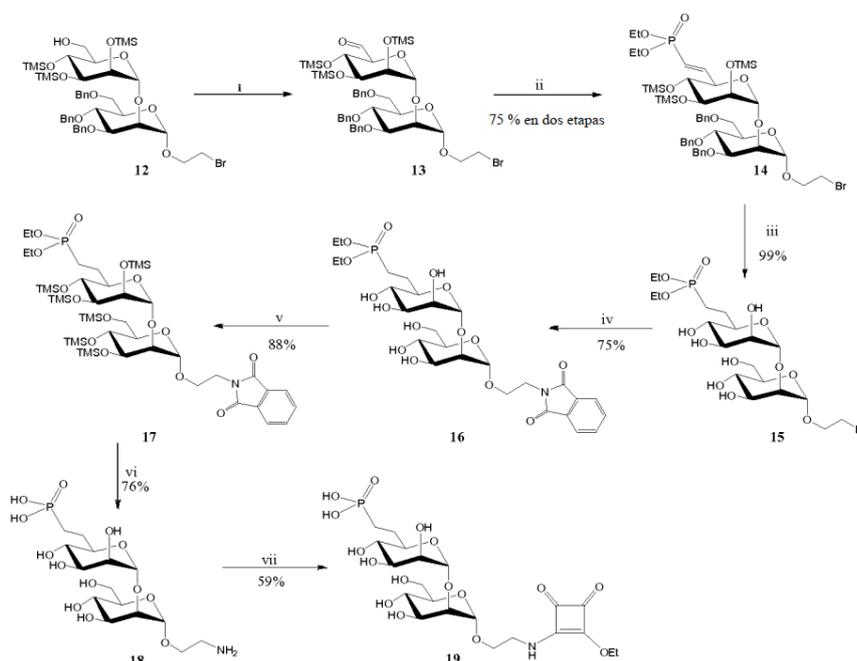
Preparación de 2,3,4-tri-O-trimetilsilil-α-D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-bencil-α-D-manopiranosido de bromoetilo 12:

**12**

4,58 g (4,72 mmol; 1 eq) del compuesto **11** se disuelven en 65 ml de metanol recién destilado. Una solución de 6,5 mg (0,01 eq; 0,0472 mmol) de K_2CO_3 (concentración final = 0,63 mM) en 10 ml de metanol se añade gota a gota. La mezcla de reacción se agita durante 1 h45 a temperatura ambiente y luego se diluye con 200 ml de CH_2Cl_2 y se lava con 125 ml de salmuera. La fase acuosa se extrae con 260 ml de CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre $MgSO_4$ y se concentran. El residuo obtenido (aceite marrón claro) se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (ciclohexano/ Et_2O : 30 % (700 ml); 40 % (500 ml); 50 % (500 ml); 70 % (500 ml)) para producir el compuesto **12** (3,58 g, 3,82 mmol) como un líquido incoloro con un rendimiento del 81 % en 2 etapas. Fórmula química **12**: $C_{44}H_{67}BrO_{11}Si_3$ Masa molar: 936,16 $g \cdot mol^{-1}$ R_f : 0,45 [Ciclo/ Et_2O (1: 1)] SM, ESI⁺ m/z: 959 [M+Na]⁺

2) Preparación de disacáridos **14, **15**, **16**, **17**, **18** y **19** que responden a la fórmula (I) en donde X representa el grupo fosfonato**

El método para preparar disacáridos **14**, **15**, **16**, **17**, **18** y **19** que responden a la fórmula (I) en donde X representa el grupo fosfonato se ilustra a continuación:

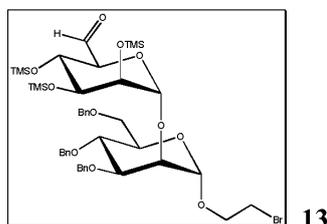


El alcohol **12** obtenido como se describió anteriormente se oxida a aldehído usando peryodinano Dess-Martin para formar el compuesto **13**. Este intermedio clave permitirá el acceso a diferentes disacáridos de fórmula (I).

Para sintetizar los disacáridos "fosfonato" de fórmula (I), el aldehído **13** se hace reaccionar con metilendifosfonato de tetraetilo, previamente desprotonado con hidruro sódico, para formar el compuesto **14** con un rendimiento del 75 % en dos etapas. Durante una etapa de hidrogenación catalítica, en presencia de paladio sobre carbono y para la cual el hidrógeno se genera *in situ* mediante la adición progresiva de trietilsilano, se reducen tanto el doble enlace como los tres bencilos y los grupos trimetilsililo se hidrolizan. Así se obtiene el compuesto **15**, sin purificación, con un rendimiento cuantitativo. El átomo de bromo se sustituye luego con ftalimida potásica para formar el intermedio **16** con un rendimiento del 75 %. Las funciones alcohol se protegen con cloruro de trimetilsililo para dar el compuesto **17** con un rendimiento del 88 %. El intermediario **17** obtenido así, sin purificación se hace reaccionar con cloruro de trimetilsililo y yoduro sódico para formar fosfonato bis(trimetilsililado) mediante una reacción de tipo Rabinowitz. Este intermedio se convierte luego en ácido fosfónico por la acción de la hidrazina monohidratada en metanol que también desplazará los grupos trimetilsililo presentes en los alcoholes secundarios del azúcar y reaccionará con ftalimida para desproteger la función amina. Así se obtiene, en una sola etapa, el compuesto **18** desprotegido en la parte fosfonato, en los alcoholes de los dos azúcares y que portan la función amina en la posición anomérica con un rendimiento del 76 % en dos etapas. El compuesto **18** luego se hace reaccionar con escuarato de dietilo para formar el producto **19** con un rendimiento del 59 %.

Condiciones y reactivos: (i) peryodinano de Dess-Martin, DCM, TA, 4h (ii) metilendifosfonato de tetraetilo, NaH, THF, TA, 45min; (iii) Pd/C, Et_3SiH , MeOH; (iv) ftalimida potásica, DMF, 60 °C, 40h; (v) TMSCl, NEt_3 , DCM, DMF, TA, 24h; (vi)-a TMSCl, NaI, ACN, 35 °C, 1h; (vi)-b $N_2H_4 \cdot H_2O$, MeOH, TA, 1h30; (vii) escuarato de dietilo, $EtOH/H_2O$, NEt_3 .

Parte experimental

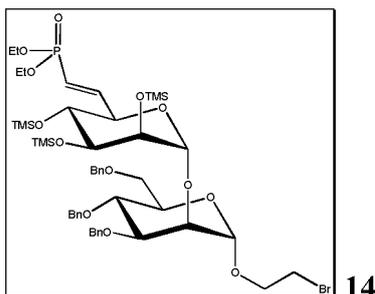
Preparación de 2,3,4-O-trimetilsilil- α -D-mano-hexodialdopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosido de bromoetilo 13:

5 1 g (1 eq; 1,07 mmol) del compuesto **12** se disuelve en 24 ml de DCM en tamiz molecular. Se añaden 5,4 ml (1,5 eq; 1,6 mmol) gota a gota de una solución de peryodinano Dess-Martin 0,3 M en diclorometano. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 4 h y luego se diluye con 120 ml de Et₂O. Se añaden 25 ml de solución saturada de NaHCO₃ y 3,9 g de Na₂S₂O₃. La solución se agita a temperatura ambiente durante 5 min. La fase acuosa se extrae con 3x125 ml de Et₂O. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre MgSO₄ y se concentran para conducir al compuesto **13** usado directamente para la siguiente etapa.

Fórmula química **13**: C₄₄H₆₅BrO₁₁Si₃

15 Masa molar: 934,14 g.mol⁻¹

Rf: 0,77 [DCM/Et₂O (95:5)]

Preparación de 2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6,7-didesoxi-7-dietoxifosfinil- α -D-mano-hept-6-enopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-bencil- α -D-manopiranosido de bromoetilo 14:

25 90 mg (2,5 eq; 2,67 mmol) de dispersión de NaH al 60 % en aceite se disuelven en 16 ml de THF. Se añaden 530 μ l (2 eq; 2,14 mmoles) gota a gota de metilendifosfonato de tetraetilo. La mezcla de reacción se agita durante 45 min a temperatura ambiente y luego se añade a 998 mg (1 eq; 1,07 mmol) del compuesto **13** disuelto en 8 ml de THF. La solución se vuelve amarilla y luego se vuelve marrón. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 45 min y luego se diluye con 200 ml de CH₂Cl₂ y se lava con 2x40 ml de salmuera. La fase acuosa se extrae con 3x130 ml de CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre MgSO₄ y se concentran. El residuo obtenido (aceite marrón) se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (DCM/Et₂O: 0 % a 5 % en 15 min; 5 % durante 10 min; de 5 % a 10 % en 15 min; 10 % durante 10 min; 10 a 13 % en 15 min) para conducir al compuesto **14** como un aceite amarillo claro con un rendimiento del 76 % (864 mg; 0,81 mmol) en dos etapas.

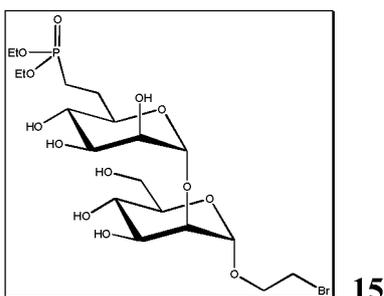
35 Fórmula química **14**: C₄₉H₇₆BrO₁₃S₁₃

Masa molar: 1068,25 g.mol⁻¹

Rf: 0,26 [DCM/Et₂O (95:5)]

Preparación de 6-desoxi-6-dietoxifosfinilmetil- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de bromoetilo 15:

40

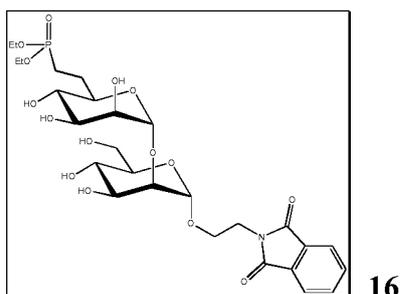


864 mg (0,81 mmol) del compuesto **14** se disuelven en 8,2 ml de metanol. Se añaden 130 mg (15 % másico) de paladio sobre carbono. 1,3 ml (8,1 mmol; 10 eq) de trietilsilano se añaden gota a gota durante 1h20. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 30 min y luego se filtra sobre Celite. El filtrado se evapora para producir el compuesto **15** con un rendimiento del 99 % (468 mg; 8,0 mmol).

Fórmula química **15**: $C_{19}H_{36}BrO_{13}P$

Masa exacta: $582,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Rf: 0,23 [DCM/MeOH (85:15)]
 SM, ESI⁺ m/z: 583,1 [M+H]⁺

Preparación de 6-desoxi-6-dietoxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de ftalimidoetilo **16**:

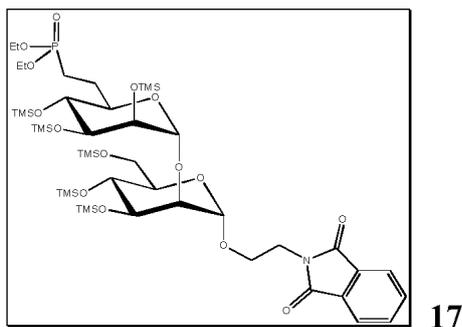


220 mg (0,38 mmol) del compuesto **15** se disuelven en 1,8 ml de DMF en tamiz molecular. Se añaden 119 mg (0,64 mmol; 1,7 eq) de ftalimida potásica. La suspensión se agita durante 40 h a 60 °C y luego se enfría a temperatura ambiente y se concentra. El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (AcOEt/MeOH: 75/25) para conducir al compuesto **16** como un sólido incoloro con un rendimiento del 75 % (184 mg; 0,28 mmol).

Fórmula química **16**: $C_{27}H_{40}NO_{15}P$

Masa molar: $649,58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 Rf: 0,31 [AcOEt/MeOH (75:25)]
 SM, ESI⁺ m/z: 650,3 [M+H]⁺

Preparación de 2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6-desoxi-6-dietoxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3,4,6-tri-O-trimetilsilil- α -D-manopiranosido de ftalimidoetilo **17**:



184 mg (0,28 mmol) del compuesto **16** se disuelven en 817 μ l de DCM recién destilada y 1,15 ml (8,5 mmol; 30 eq) de trietilamina. El material de partida no es completamente soluble. 431 μ l (3,4 mmol; 12 eq) de cloruro de trimetilsililo se añaden gota a gota. La solución se agita a temperatura ambiente durante 15 h. El producto de partida

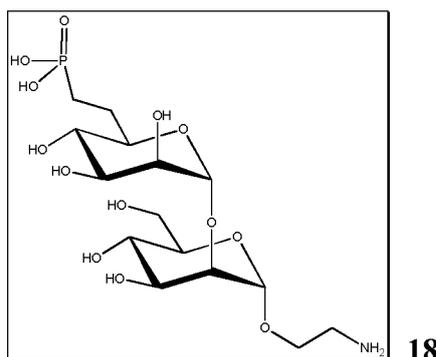
5 todavía no está completamente solubilizado y la solución es blanca. Se añaden 0,5 ml de DMF en tamiz molecular, el producto de partida entonces es soluble. La solución se agita a temperatura ambiente durante 24 h y luego se evapora. Durante la reacción, la solución se vuelve marrón. El residuo marrón se disuelve en ciclohexano y luego se filtra sobre Celite. El filtrado se concentra para conducir al compuesto **17** con un rendimiento del 88 % (268 mg; 0,25 mmol) usado directamente para la siguiente etapa.

Fórmula química **17**: $C_{45}H_{88}NO_{15}PSi_6$

Masa molar: 1082,66 g.mol⁻¹

Rf: 0,49 [DCM/Et₂O (9:1)]

Preparación de 6-desoxi-6-dihidroxfosfinilmetileno- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-manopiranosido de aminoetilo (M6Pn- α (1,2)-Man-Etil-NH₂) **18**:



15 269 mg (0,25 mmol) del compuesto **17** y 260 mg (1,73 mmol; 7 eq) de yoduro sódico se disuelven en 7,3 ml de acetonitrilo recién destilado. 219 μ l (1,73 mmol; 7 eq) de cloruro de trimetilsililo se añaden gota a gota. La solución se agita a 35 °C durante 1h15. Durante la reacción se forma un precipitado. El sobrenadante se canula en un globo y se evapora a sequedad. 132 μ l (2,72 mmol; 11 eq) de monohidrato de hidrazina se diluyen en 3,4 ml de metanol en tamiz molecular y se añaden al residuo obtenido previamente. Se forma un precipitado blanco. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 1h30. El precipitado se disuelve en agua y se evapora. El residuo obtenido se purifica por cromatografía sobre gel de sílice (isopropanol/amoniaco acuoso: 5/3/2) para conducir al compuesto **18** como un sólido blanco con un rendimiento del 76 % (67 mg; 0,14 mmol).

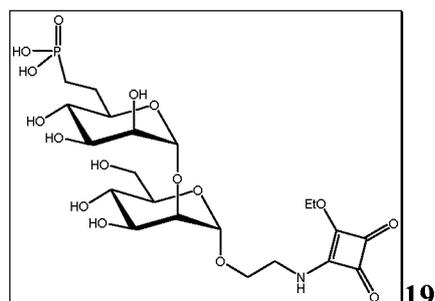
Fórmula química **18**: $C_{15}H_{30}NO_{13}P$

Masa molar: 463,37 g.mol⁻¹

Rf: 0,49 [DCM/Et₂O (9:1)]

SMHR: masa calculada: 464,1533; masa encontrados. 464,1530

Preparación de 6,7-didesoxi-7-dihidroxfosfinil- α -D-mano-heptopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de (4-etoxi-2,3-dioxociclobut-1-enil) aminoetilo (M6Pn- α (1,2)-Man-EtilSq) **19**:



35 El compuesto **18** (32 mg; 1 eq; 0,07 mmol) se disuelve en etanol/agua (1:1) (620 μ l). El escuarato de dietilo (10,3 μ l; 1 eq; 0,07 mmol) y trietilamina (9,7 μ l; 1 eq; 0,07 mmol) se añaden. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 20h y luego se evapora el disolvente. El residuo se precipita en una mezcla de AcOEt/MeOH (7:3). Tras la centrifugación, el precipitado se enjuaga 5 veces con acetato de etilo para dar el compuesto **19** con un rendimiento del 59 % (24 mg; 0,041 mmol).

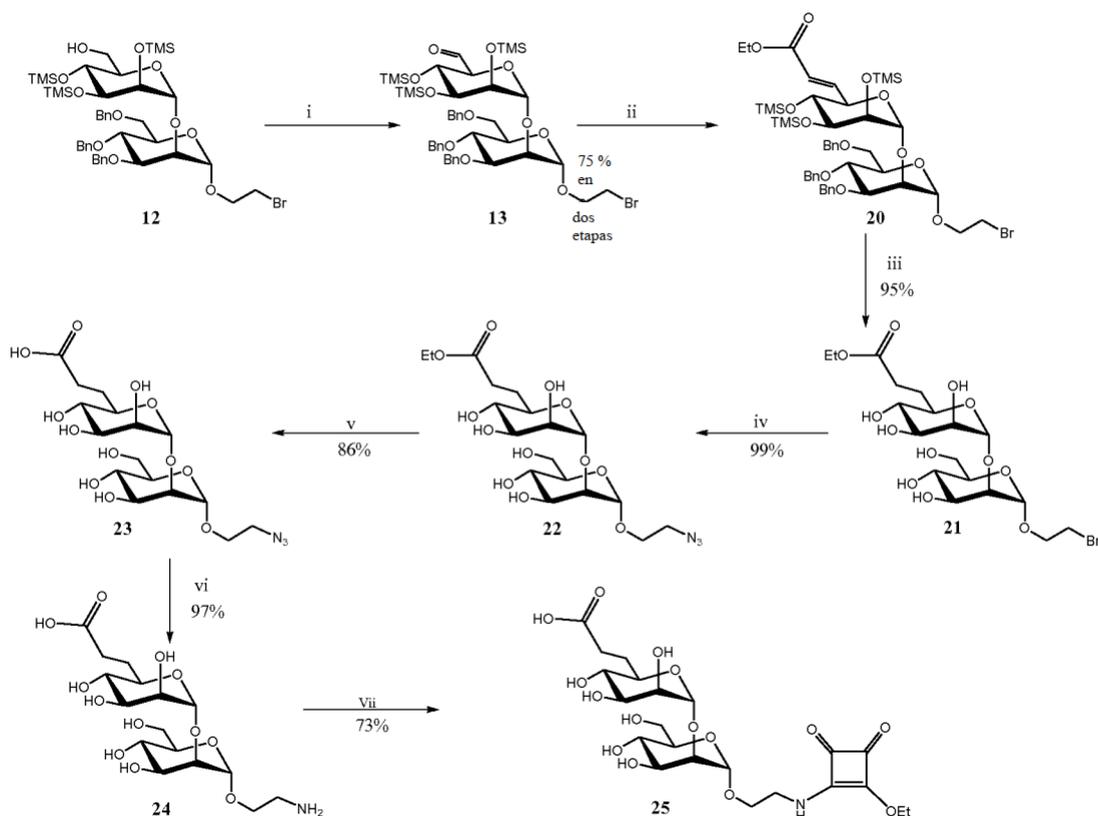
Fórmula química **19**: $C_{21}H_{34}NO_{16}P$

Masa molar: 587,47 g.mol⁻¹
 Rf: 0,67 [MeOH/H₂O (9:1)]
 SM, ESI⁻ m/z: 586 [MH]⁻

5 **3) Preparación de disacáridos 20, 21, 22, 23, 24, y 25 que responden a la fórmula (I) en donde X representa el grupo carboxilato**

El método para preparar disacáridos 20, 21, 22, 23, 24 y 25 que corresponden a la fórmula (I) en donde X representa el grupo carboxilato se ilustra a continuación:

10



El comienzo de la síntesis de disacáridos "carboxilato" de fórmula (I) es idéntico al de disacáridos "fosfonato", es decir, el aldehído **13** se obtiene a partir del alcohol **12** de la misma manera que se describió anteriormente.

15

El aldehído **13** luego se hace reaccionar con fosonoacetato de trietilo previamente desprotonado con hidruro sódico para formar el compuesto **20** con un rendimiento del 75 % en dos etapas. En una sola etapa de hidrogenación, se reducen tanto el doble enlace como los 3 grupos bencilo. Durante esta reacción, los grupos trimetilsililo también se hidrolizan. Esta reacción se realiza utilizando paladio sobre carbono al 10 % y el hidrógeno se genera *in situ* mediante la adición gradual de trietilsilano para formar el compuesto **21** con un rendimiento del 95 %. Esta etapa de hidrogenación está completada y no requiere purificación para obtener el compuesto **21** puro. El átomo de bromo se sustituye luego con azida sódica para producir el compuesto **22** con un rendimiento del 99 %. La función éster se saponifica para formar el compuesto **23** con un rendimiento del 86 %. Finalmente la función azida se reduce durante una reacción de hidrogenación catalítica usando paladio sobre carbono y trietilsilano para formar el compuesto **24** con un rendimiento del 97 %. Finalmente, el compuesto **24** reacciona con escuarato de dietilo para conducir al compuesto **25** con un rendimiento del 73 %.

25

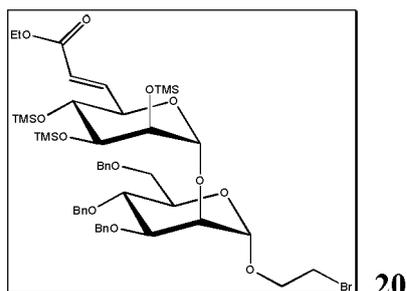
Condiciones y reactivos: (i) peryodinato de Dess-Martin, DCM, TA, 4h; (ii) fosonoacetato de trietilo, NaH, THF, TA, 14h; (iii) Pd/C, Et₃SiH, MeOH, TA; (iv) NaN₃, DMF, TA, 5j; (v) NaOH 1 N, TA, 20h; (vi) Pd/C, Et₃SiH, MeOH/H₂O (vii) escuarato de dietilo, EtOH/H₂O, NEt₃, TA, 2h30.

30

Parte experimental

Preparación de 2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6,7-didesoxi-7-etoxicarbonil-α-D-manohept-6-enopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-bencil-α-D-manopiranosido de bromoetilo **20**:

35

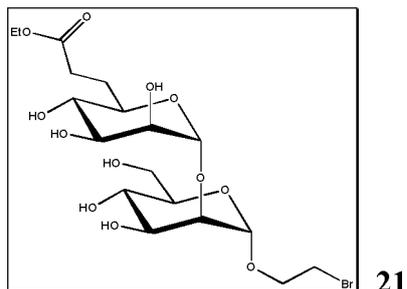


144 mg (4 eq; 4,28 mmol) de dispersión de NaH al 60 % en aceite se disuelven en 10 ml de THF. Se añaden gota a gota 637 μ l (3 eq; 3,21 mmol) de fosfonoacetato de trietilo. La mezcla de reacción se agita durante 45 minutos a temperatura ambiente y luego se añade a 1,065 g (1 eq; 1,07 mmol) del compuesto **13** disuelto en 20 ml de THF. La solución es de color naranja. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 14h30 y luego se diluye con 175 ml de CH_2Cl_2 y se lava con 4x50 ml de salmuera. La fase acuosa se extrae con 125 ml de CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se combinan, se secan sobre MgSO_4 y se concentran. El residuo obtenido (aceite naranja) se purifica por cromatografía ultrarrápida automatizada sobre gel de sílice (ciclohexano/ Et_2O : 20 % (900 ml)) para producir el compuesto **20** en forma de un aceite incoloro con un rendimiento del 75 % (802 mg; 0,80 mmol) en dos etapas.

Fórmula química **20**: $\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{BrO}_{12}\text{Si}_3$

Masa molar: 1004,23 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Rf: 0,39 [Ciclo/ Et_2O (8:2)]

Preparación de 6,7-dideoxi-7-etoxicarbonil- α -D-mano-heptopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de bromoetilo **21**:

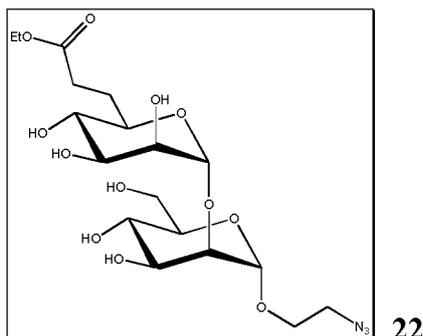


795 mg (1 eq; 0,79 mmol) del compuesto **20** se disuelven en 8 ml de metanol. Se añaden 160 mg (20 % en peso) de paladio sobre carbono al 10 %. Se añaden 1,3 ml (10 eq; 7,9 mmol) de trietilsilano gota a gota durante 1 h. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se filtra a través de Celite (enjuagado con metanol caliente). El filtrado se concentra para conducir al compuesto **21** como un aceite incoloro con un rendimiento del 95 % (390 mg; 0,75 mmol).

Fórmula química **21**: $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{BrO}_{12}$

Masa molar: 519,34 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Rf: 0,40 [DCM/MeOH (85:15)]

Preparación de 6,7-dideoxi-7-etoxicarbonil- α -D-mano-heptopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de azidoetilo **22**:



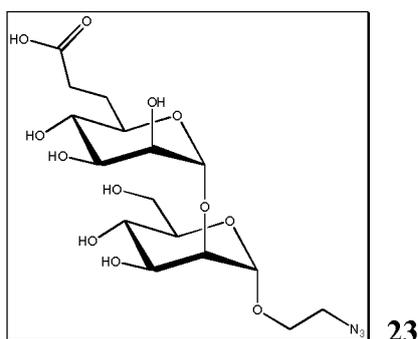
35

440 mg (1 eq; 0,85 mmol) del compuesto **21** se disuelven en 3,5 ml de DMF recién destilada. 66 mg (1,2 eq; 1,02 mmol) de azida sódica se añaden. La solución se agita a temperatura ambiente durante 5 días y luego se evapora. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (AcOEt/MeOH: 10 % (210 ml); 20 %) para conducir al compuesto **22** como un sólido blanco con un rendimiento del 99 % (407 mg; 0,85 mmol).

Fórmula química **22**: $C_{18}H_{31}N_3O_{12}$

Masa molar: 481,45 g.mol⁻¹
Rf: 0,43 [AcOEt/MeOH (8:2)]
SM, ESI⁺ m/z: 482 [M+H]⁺

Preparación de 6,7-didesoxi-7-hidroxicarbonil- α -D-*mano*-heptopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de azidoetilo **23**:

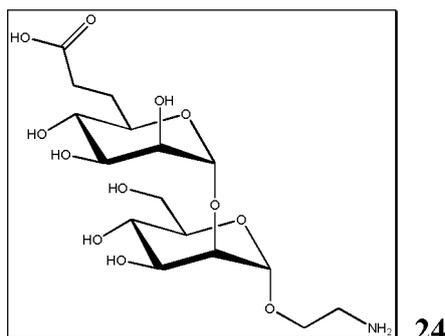


377 mg (1 eq; 0,78 mmol) del compuesto **22** se disuelven en 932 μ l (1,2 eq; 0,932 mmol) de una solución de hidróxido sódico 1 N. La solución se agita a temperatura ambiente durante 20 h y luego se concentra. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (isopropanol/amoniaco al 35 %/agua: 6/3/1) para conducir al compuesto **23** como un sólido blanco con un rendimiento del 86 % (316 mg; 0,67 mmol).

Fórmula química **23**: $C_{16}H_{27}N_3O_{12}$

Masa molar: 453,40 g.mol⁻¹
Rf: 0,38 [isopropanol/NH₄OH/agua (6:3:1)]
SM, ESI⁺ m/z: 454 [M+H]⁺

Preparación de 6,7-dideoxi-7-hidroxicarbonil- α -D-*mano*-heptopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de aminoetilo (M6C- α (1,2)-Man-Etil-NH₂) **24**:



316 mg (1 eq; 0,67 mmol) del compuesto **23** se disuelven en 15 ml de una mezcla de metanol/agua a 2:1,32 mg (10 % en peso) de paladio sobre carbono al 10 % se añaden. Se añaden gota a gota 536 μ l (5 eq; 3,36 mmol) de trietilsilano durante 40 min. Después de agitar durante 45 minutos a temperatura ambiente, queda producto de partida. Se añaden gota a gota 536 μ l (5 eq; 3,36 mmol) de trietilsilano durante 30 minutos. El medio de reacción se agita a temperatura ambiente durante 10 min (sin evolución) y luego se filtra sobre Celite (enjuagado con metanol caliente). El filtrado se concentra y luego se disuelve en 3 ml de una mezcla de metanol/agua a 2:1,60 mg (20 % en peso) de paladio sobre carbono al 10 % se añaden. Se añaden 1,07 ml (10 eq; 6,72 mmol) de trietilsilano gota a gota durante 20 min. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se filtra sobre Celite (enjuagado con metanol caliente). El filtrado se concentra para conducir al compuesto **24** como un aceite incoloro con un rendimiento del 97 % (280 mg; 0,66 mmol).

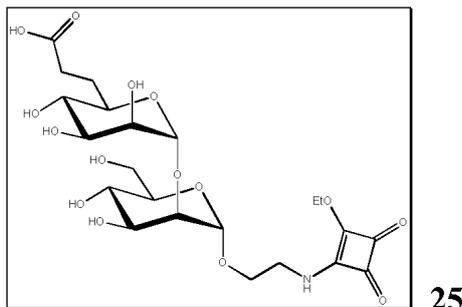
Fórmula química **24**: $C_{16}H_{29}NO_{12}$

Masa molar: 427,40 g.mol⁻¹

R_f: 0,51 [isopropanol/NH₄OH/agua (5:4:1)]

SM, ESI⁺ m/z: 428 [M+H]⁺

Preparación de 6,7-didesoxi-7-hidroxicarbonil- α -D-*mano*-heptopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido de (4-etoxi-2,3-dioxociclobut-1-enil)aminoetilo (M6C- α (1,2)-Man-EtilSq) **25**:



45 μ l (1 eq; 0,307 mmol) de escuarato de dietilo se diluyen en 300 μ l de una mezcla de etanol/agua a 2:1. El pH de la solución es 5,20 μ l (0,5 eq; 0,154 mmol) de trietilamina se añaden para alcanzar un pH de 8-9. 131 mg (1 eq; 0,307 mmol) del compuesto **24** disuelto en 1,7 ml de una mezcla de etanol/agua a 2:1 se añaden gota a gota. La solución se agita a temperatura ambiente durante 2h30, manteniendo el pH a 8-9 añadiendo trietilamina, luego concentrado. El residuo obtenido se purifica por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (AcOEt/MeOH: deposición a 3:7; elución: 30 % (20 ml); 40 % (10 ml); 50 % (20 ml); 70 % (30 ml) para conducir al compuesto **25** como un sólido incoloro con un rendimiento del 73 % (123 mg; 0,223 mmol).

Fórmula química **25**: $C_{22}H_{33}NO_{15}$

Masa molar: 551,50 g.mol⁻¹

R_f: 0,36 [AcOEt/MeOH (1:1)]

SM, ESI⁺ m/z: 552 [M+H]⁺

Ejemplo 2:

Estudio de los análogos disacáridos **18**, **19**, **24** y **25** de la invención, que responden a la fórmula general (I)

1) Unión de los análogos M6P de la invención con RM6P-CI

Las placas de 96 pocillos (Maxisorp Nunc) se incuban durante la noche a 4 °C con 200 μ l de PMP (penta manosa 6-fosfato) a la concentración de 200 μ g.ml⁻¹, en tampón carbonato (NaHCO₃/Na₂CO₃ a 0,1 M, pH 9,6). Al día siguiente, la solución que contiene el PMP residual se descarta y los pocillos se saturan, durante 1 h a temperatura ambiente, con 360 μ l de gelatina al 1 % (*Tipo A de piel porcina*) diluido en PBS (NaH₂PO₄ 1,9 mM, Na₂PO₄ 8,1 mM y NaCl 154 mM, pH 7,4). Los pocillos se enjuagan 5 veces con PBS suplementado con gelatina al 0,2 %. Todos los lavados, así como las diluciones, se realizan en la solución de PBS suplementada con 0,2 % de gelatina. Los análogos de M6P que se probarán a diferentes concentraciones (de 10⁻² a 10⁻⁷ M) se preincuban en presencia del RM6P-CI previamente biotinilado (RM6Pb) (2,5 μ g.ml⁻¹) durante 20 minutos, luego se incuban 200 μ l de la mezcla en los pocillos durante 2 h, a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, los pocillos se incuban durante 1 h con una solución de estreptavidina-peroxidasa (250 μ l por pocillo; 3.10⁻⁸ M). Después de otros 3 lavados, 200 μ l de una solución de OPD (o-fenilendiamina 1 mg.ml⁻¹ en tampón citrato pH 5,0 y 1 μ l de 30 % de H₂O₂.ml⁻¹; Sigma Aldrich) se añade. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, las densidades ópticas se miden a la longitud de onda de 450 nm.

Las afinidades de los disacáridos de fosfonato **18** y carboxilato **24** de fórmula (I) de la invención se midieron y compararon con las de sus equivalentes de monosacáridos respectivos.

La afinidad se refiere a la capacidad de unión (en este caso a través de un enlace covalente) de los análogos de M6P para RM6P-CI.

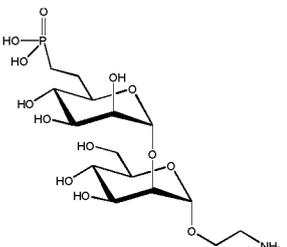
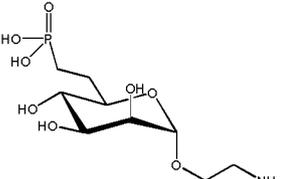
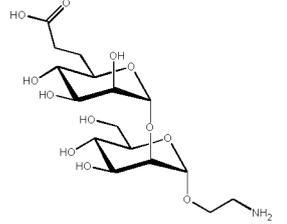
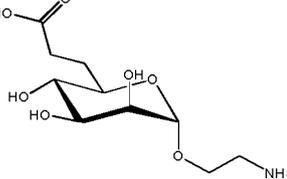
La afinidad relativa permite comparar la afinidad de las moléculas con M6C-Etil-NH₂ tomado como referencia y para el cual se le atribuye un valor igual a 1.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 1 a continuación.

La afinidad del disacárido fosfonato **18** (línea 1 de la tabla. 1), 6-desoxi-6-dihidroxifosfinilmetileno- α -D-manopiranos- α -(1,2)-D-manopiranos- α de aminoetilo, representada por M6Pn- α (1,2)-Man-Etil-NH₂, por lo tanto, se compara con la del monosacárido fosfonato (línea 2), representado M6Pn-Etil-NH₂.

- 5 La afinidad del disacárido carboxilato **24** (línea 3), 6,7-didesoxi-7-hidroxicarbonil- α -D-*mano*-hept-6-anopiranos- α -(1,2)- α -D-manopiranos- α de aminoetilo, representada por M6C- α (1,2)-Man-Etil-NH₂, por lo tanto, se compara con la del monosacárido carboxilato (línea 4), representado M6C-Etil-NH₂.

Tabla 1

Análogos de M6P	Estructura química	Cl ₅₀ en M	Afinidad relativa
Compuesto 18 de la invención M6Pn- α (1,2)-Man-Etil-NH ₂		0,5 x 10 ⁻⁵ M	19,8
M6Pn-Etil-NH ₂		2,9 x 10 ⁻⁵ M	3,4
Compuesto 24 de la invención M6C- α (1,2)-Man-Etil-NH ₂		1,7 x 10 ⁻⁵ M	5,8
M6C-Etil-NH ₂		9,9 x 10 ⁻⁵ M	1

10

Conclusión:

Una mejor afinidad de los análogos disacáridos **18** y **24** de la invención se observa para RM6P-CI que la de los mismos análogos monosacáridos. Además, un aumento de afinidad del análogo de fosfonato **18** se observa con respecto al análogo de carboxilato **24**, tanto en la serie de disacáridos como la de monosacáridos.

15

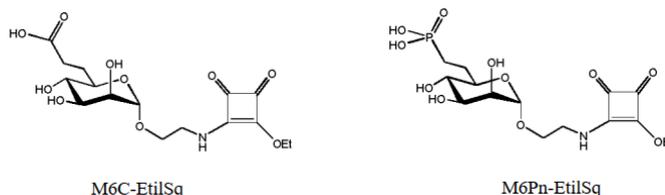
2) Evaluación de la citotoxicidad de los análogos de M6P de la invención con RM6P-CI

La citotoxicidad de análogos disacáridos fosfonatos **18**, **19** y carboxilatos **24**, **25** de la invención se evaluó en células de cáncer de próstata LNCaP, y se comparó con la de sus equivalentes de monosacáridos respectivos.

20

Los análogos disacáridos **18**, **19**, **24** y **25** de fórmula (I) de la invención, así como los análogos monosacáridos de los análogos disacáridos 19, 24 y 25, se prueban:

- 25 M6Pn- α (1,2)-Man-Etil-NH₂ (compuesto **18**);
 M6Pn- α (1,2)-Man-EtilSq (compuesto **19**);
 M6Pn-EtilSq (descrito a continuación);
 M6C- α (1,2)-Man-Etil-NH₂ (compuesto **24**);
 M6C-Etil-NH₂ (descrito en la tabla 1);
 30 M6C- α (1,2)-Man-EtilSq (compuesto **25**);
 M6C-EtilSq (descrito a continuación).



Protocolo experimental

5 Las células de cáncer de próstata humano LNCaP se incuban con soluciones de los análogos como se describió anteriormente con concentraciones que varían de 10^{-3} M a 10^{-7} M.

10 La supervivencia celular se mide después de 4 días de incubación usando un ensayo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). Este último se reduce por una enzima mitocondrial y formará un compuesto amarillo-naranja que es soluble en medio acuoso. La medición de las densidades ópticas indica la cantidad de células vivas. Los resultados del crecimiento celular se determinaron con respecto a un control tratado solo con el vehículo (solución en donde se diluyen los análogos).

15 Los resultados obtenidos se representan en la **figura 1**.

Conclusión:

20 Ninguno de los compuestos probados mostró una citotoxicidad significativa en las células humanas LNCaP, incluso a concentraciones muy altas (hasta 10^{-3} M).

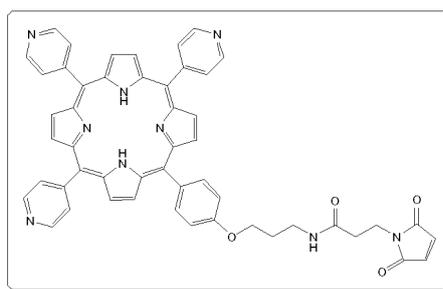
Por lo tanto, los análogos de M6P probados no exhiben toxicidad intrínseca para las células que expresan el RM6P-Cl, como las células LNCaP.

25 3) Funcionalización de nanopartículas para terapia fotodinámica de monofotónica

Un compuesto de interés ☺, es decir, nanopartículas de sílice mesoporosa que incorporan un fotosensibilizador de tipo porfirina neutra, luego se funcionaliza en la superficie con los análogos:

- 30 - disacáridos fosfonatos M6Pn- α (1,2)-Man-EtilSq (**19**) y carboxilatos M6C- α (1,2)-Man-EtilSq (**25**);
 - monosacáridos fosfonato M6Pn-EtilSq y carboxilato M6C-EtilSq.

La estructura de la porfirina neutra utilizada para la terapia fotodinámica se muestra a continuación:



35 Preparación de nanopartículas de sílice que incorporan porfirina

40 La porfirina debe llevar un grupo trialcóxilisilano que permita su incorporación a la red de silicio durante el método sol-gel descrito a continuación. Para ello, la porfirina se hace reaccionar con 3-mercaptopropiltrimetoxisilano en metanol a temperatura ambiente durante 12 h.

45 El CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) se disuelve en una solución de hidróxido sódico 0,2 M. Por lo tanto, se forman micelas en la solución. Se añaden la porfirina sililada y luego el TEOS (ortosilicato de tetraetilo). Rápidamente, el medio de reacción se diluye con un gran volumen de agua para bajar el pH a 8-8,5 e iniciar la condensación. Después de 6 min, el medio de reacción se neutraliza con una solución de HCl 0,2 M. Las nanopartículas se obtienen después de las etapas de lavado con nitrato de amonio para eliminar el CTAB contenido en los poros.

50 Durante la síntesis de nanopartículas, los tiempos de reacción y el pH deben controlarse cuidadosamente para

controlar el tamaño de las nanopartículas formadas. Las nanopartículas obtenidas así tienen un diámetro hidrodinámico de aproximadamente 200 nm y contienen 11 µg de porfirina por gramo de nanopartícula.

Funcionalización de la superficie de las nanopartículas

5 Estas nanopartículas se funcionalizan en la superficie con los análogos de monosacárido de carboxilato de carboxilato M6CEtilSq y M6PnEtilSq y los análogos de disacáridos carboxilato M6C-α(1,2)-Man-EtilSq (**25**) y fosfonato M6Pn-α(1,2)-Man-EtilSq (**19**).

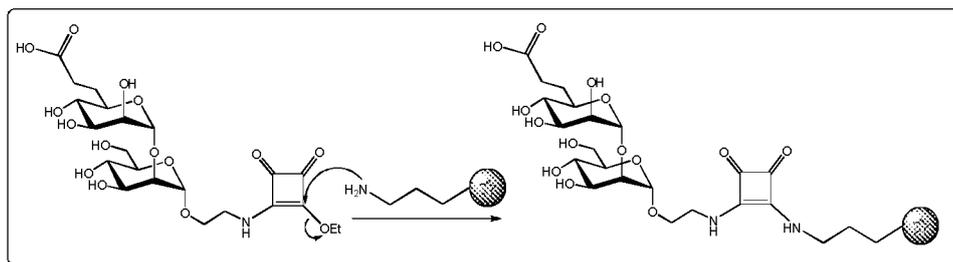
10 La funcionalización se realiza en dos etapas: la primera etapa es introducir funciones de amina en la superficie de las nanopartículas que, en la segunda etapa, sustituirán al grupo etoxi presente en el escuarato del brazo del análogo. Las nanopartículas se hacen reaccionar con aminopropiltriectoxisilano (APTS) en una mezcla de agua/etanol (2:1). El pH del medio de reacción se ajusta a 6 añadiendo una solución de HCl 0,2 M y luego se agita a temperatura ambiente durante 20 h. Las nanopartículas se obtienen después de varias etapas de lavado con etanol seguido de centrifugaciones.

15 Para el acoplamiento de los análogos de carboxilato (M6CEtilSq y M6C-α(1,2)-Man-EtilSq (**25**)), el análogo se disolvió en una mezcla de etanol/agua (1:1) en presencia de nanopartículas y la suspensión se calentó a 50 °C durante 12 h.

20 Cabe señalar que se puede añadir trietilamina para mantener el pH a 8-9 y promover el acoplamiento de análogos a nanopartículas.

25 Después de lavar los pasos con agua y etanol, se obtienen las nanopartículas funcionalizadas con los análogos de carboxilato.

El acoplamiento (injerto) del análogo disacárido carboxilato M6C-α(1,2)-Man-EtilSq (**25**) con nanopartículas de sílice que incorporan porfirina (representada por una estrella) se muestra a continuación:



30 Se obtiene así un conjugado de fórmula (III).

35 El grupo escuarato es observable en UV, la dosificación de la cantidad de monosacáridos y disacáridos se determinó por espectroscopía UV/visible.

La tabla 2 a continuación representa la cantidad de porfirina incorporada (en µg/g) y la cantidad de monosacárido o disacárido (en µmol/g) injertado en las nanopartículas.

40 La abreviatura "MSN" representa las nanopartículas de sílice mesoporosas solas, sin injerto con el monosacárido o el disacárido.

45 Los análogos de M6CEtilSq, M6C-α(1,2)-Man-EtilSq (**25**) y M6Pn-α(1,2)-Man-EtilSq (**19**) injertados con las nanopartículas de sílice mesoporosa están representados por MSN-M6C-EtilSq; MSN-M6C-α(1,2)-Man-EtilSq y MSN-M6Pn-α(1,2)-Man-EtilSq. Estos compuestos son conjugados correspondientes a la fórmula general (III).

Tabla 2

Nanopartículas	Cantidad de porfirina (µmol/g)	Cantidad de mono- o di-sacárido (µmol/g)
MSN	11 µmol/g	-
MSN-M6C-EtilSq	11 µmol/g	351 µmol/g
MSN-M6C-α (1,2)-Man-EtilSq	11 µmol/g	329 µmol/g
MSN-M6Pn-α (1,2)-Man-EtilSq.	11 µmol/g	167 µmol/g

Valoración *in vitro* en terapia fotodinámica

50 Los conjugados de carboxilato de fórmula (III) MSN-M6C-EtilSq y MSN-M6C-α(1,2)-Man-EtilSq se usaron en

experimentos PDT *in vitro* en células de cáncer de próstata LNCaP que sobreexpresan RM6P-CI.

Las células LNCaP se incubaron con 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de nanopartículas solas (MSN) o con 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nanopartículas funcionalizadas con mono- o disacárido (es decir, con 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de conjugados **MSN-M6C-EtilSq** y **MSN-M6C- α (1,2)-Man-EtilSq**) durante 3, 6, 9 o 18 h y luego se irradiaron durante 20 min con un láser a 650 nm (3 mW, 11,25 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$).

El ensayo de supervivencia celular MTS se realizó 48 h después de la irradiación.

10 Después de 3 horas de incubación, se observa un ligero aumento del efecto fototóxico de las nanopartículas funcionalizadas con mono- o disacáridos.

15 Cuando el tiempo de incubación se incrementa a 6 h, se observa que la funcionalización con un disacárido carboxilato proporciona una fuerte mejora del efecto fototóxico, con 73 % de muerte celular contra 35 % para el monosacárido carboxilato. Esto está relacionado con la mejora del reconocimiento de RM6P-CI que conduce a una internalización más rápida de las nanopartículas (funcionalizadas con un disacárido) en las células.

20 Estos resultados destacan la ventaja de la funcionalización de nanopartículas con análogos disacáridos, tanto para reducir el tiempo de incubación como para aumentar significativamente el efecto fototóxico de las nanopartículas.

Al aumentar el tiempo de incubación a 9 h, la muerte celular obtenida para las células tratadas con las nanopartículas funcionalizadas con el disacárido alcanza el 81 % frente al 55 % con las nanopartículas funcionalizadas con el monosacárido.

25 En el caso de una incubación durante 18h, se observa una mejora del efecto fototóxico para las nanopartículas funcionalizadas con los análogos de monosacárido carboxilato con respecto al efecto de estas mismas nanopartículas después de una incubación de 9 h.

30 Por otro lado, el efecto de las nanopartículas de disacárido no aumenta a 18h porque este efecto ya es máximo después de 9h de incubación.

Los efectos fototóxicos de las nanopartículas solas (MSN) y funcionalizadas con el monosacárido carboxilato (MSN-M6C-EtilSq) y disacárido carboxilato (MSN-M6C- α (1,2)-Man-EtilSq) en los diferentes tiempos de incubación se resumen en la **figura 2**.

35 Conclusión

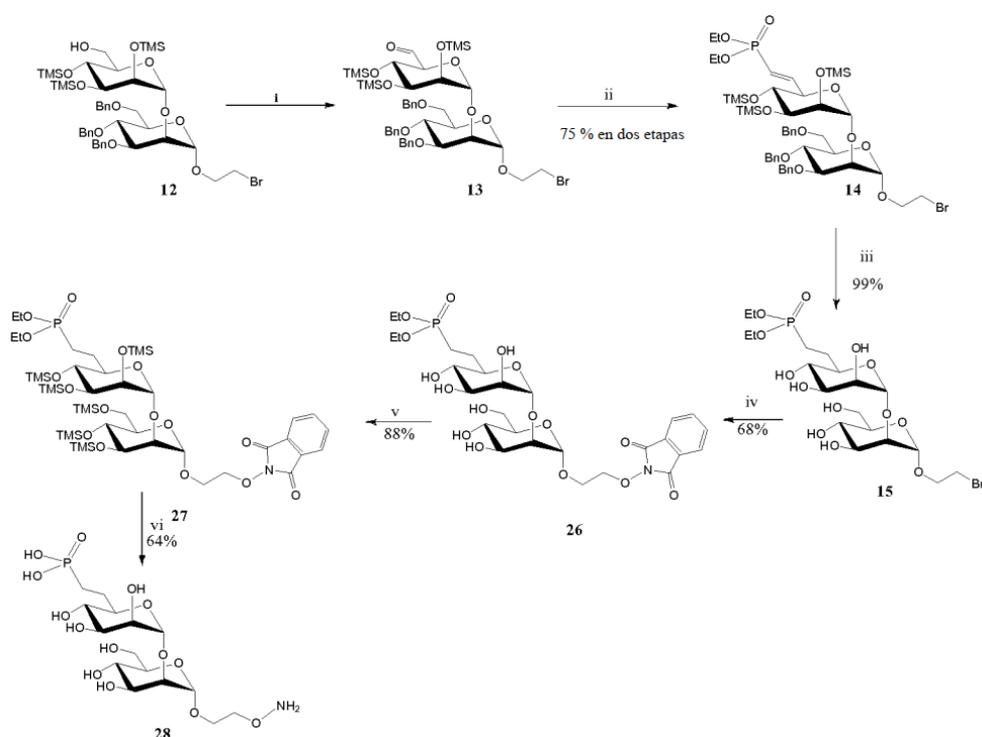
40 La funcionalización de nanopartículas con dimanósidos análogos de M6P permite aumentar de manera muy significativa la eficiencia fototóxica con respecto a las nanopartículas injertadas con los análogos de monosacáridos al tiempo que reduce el tiempo de incubación. Este aumento de la eficacia asociada a la afinidad para RM6P-CI puede ser decisivo para la aplicación diagnóstica o terapéutica de los compuestos de interés \odot (nanopartículas, glicoproteínas, moléculas pequeñas, ...) cuya eliminación metabólica en seres humanos puede ser rápida.

45 **Ejemplo 3:**

Síntesis de compuestos de fórmula (I)

Preparación de disacáridos 26, 27 y 28 que responden a la fórmula (I) en donde X representa el grupo fosfonato

50 El método para preparar disacáridos 26, 27 y 28 que responden a la fórmula (I) en donde X representa el grupo fosfonato se ilustra a continuación:



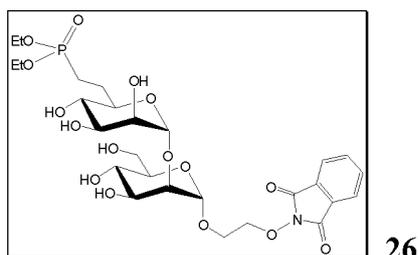
El comienzo de la síntesis del disacárido fosfonato **28** de fórmula (I) es idéntico al del disacárido fosfonato **19**, es decir, el fosfonato **15** se obtiene a partir del alcohol **12** de la misma manera como se describió anteriormente.

5 Para sintetizar el disacárido fosfonato **28** de fórmula (I), el aldehído **13** se hace reaccionar con metilendifosfonato de tetraetilo, previamente desprotonado con hidruro sódico, para formar el compuesto **14** con un rendimiento del 75 % en dos etapas. Durante una etapa de hidrogenación catalítica, en presencia de paladio sobre carbono y para la cual el hidrógeno se genera *in situ* mediante la adición progresiva de trietilsilano, se reducen tanto el doble enlace como los tres bencilos y los grupos trimetilsililo se hidrolizan. Así se obtiene el compuesto **15**, sin purificación, con un rendimiento cuantitativo. El átomo de bromo se sustituye entonces con *N*-hidroxifalimida para formar el intermedio **26** con un rendimiento del 68 %. Las funciones alcohol se protegen con cloruro de trimetilsililo para dar el compuesto **27** con un rendimiento del 88 %. el intermedio **27** obtenido así, sin purificación se hace reaccionar con cloruro de trimetilsililo y yoduro sódico para formar fosfonato bis(trimetilsililado) mediante una reacción de tipo Rabinowitz. Este intermedio se convierte luego en ácido fosfónico por la acción del monohidrato de hidrazina en metanol que también desplazará los grupos trimetilsililo presentes en los alcoholes secundarios del azúcar y reaccionará con la hidroxifalimida para desproteger la función de oxiamina. Así se obtiene, en una sola etapa, el compuesto **28** desprotegido en la parte de fosfonato, en los alcoholes de los dos azúcares y que porta en posición anomérica la función oxiamina, necesario para el acoplamiento con la enzima, con un rendimiento del 64 % en dos etapas.

20 Condiciones y reactivos: (i) peryodinano de Dess-Martin, DCM, TA, 4h (ii) metilendifosfonato de tetraetilo, NaH, THF, TA, 45 min; (iii) Pd/C, Et₃SiH, MeOH; (IV) *N*-hidroxifalimida, NaH, DMF, 65 °C, 20 h; (v) TMSCl, NEt₃, DCM, DMF, TA, 24h; (vi)-a TMSCl, NaI, Et₃N, ACN, 35 °C, 4 h; (vi)-b N₂H₄.H₂O, MeOH, TA, una noche.

25 Parte experimental

Preparación de 6-desoxi-6-dietoxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -D-manopiranosido 2-*N*-oxifalimidoetilo **26**:



30 177 mg (2,2 eq, 5,3 mmol) de NaH se suspenden en 80 ml de DMF. 783 mg (2 eq, 4,8 mmol) de *N*-hidroxifalimida

se añaden (solución roja). Después de agitar durante una hora a 65 °C (solución roja oscura), 1,4 g (1 eq, 2,4 mmol) del compuesto 15 disuelto en 20 ml de DMF se añaden. Después de 20 horas a 65 °C, la solución se enfría y la DMF se evapora a presión reducida. El producto en bruto resultante se purifica en una columna de gel de sílice con un gradiente de AcOEt/MeOH (95:5 →80:20) para dar el compuesto 26 con un rendimiento del 68 % (1,08, 1,62 mmol).

5

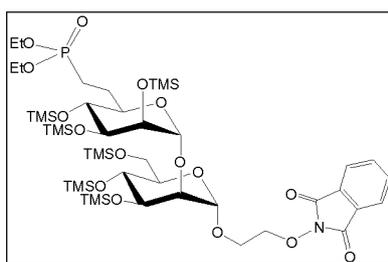
Fórmula química **26**: $C_{27}H_{40}NO_{16}P$

Masa molar: 665,58 g.mol⁻¹

Rf: 0,6 [AcOEt/MeOH (70:30)]

10

Preparación de 2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6-desoxi-6-dietoxifosfinilmetileno- α -D-manopiranosil-(1→2)-3,4,6-tri-O-trimetilsilil- α -D-manopiranosido de 2-N-oxyphtalimidoetilol**27**:

**27**

15

1,05 g (1 eq, 1,6 mmol) del compuesto **26** se disuelven en 10 ml de DCM recién destilada y 6,6 ml (47,3 mmol, 30 eq) de trietilamina. El material de partida no es completamente soluble. 2,4 ml (18,9 mmol, 12 eq) de cloruro de trimetilsililo se añaden gota a gota. La solución se agita a temperatura ambiente durante 25 h y luego se evapora. Durante la reacción, la solución se vuelve marrón. El residuo marrón se disuelve en ciclohexano y luego se filtra sobre Celite. El filtrado se concentra para producir el compuesto 27 con un rendimiento del 88 % (1,52 g, 1,38 mmol) utilizado directamente para la siguiente etapa.

20

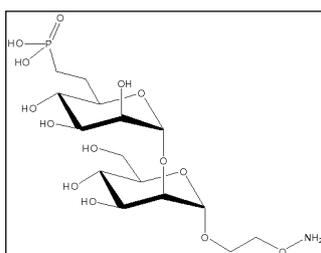
Fórmula química **27**: $C_{45}H_{88}NO_{16}Si_6$

25

Masa molar: 1098,67 g.mol⁻¹

Rf: 0,57 [DCM/Et₂O (90:10)]

Preparación de 6-desoxi-6-dihidroxifosfinilmetileno- α -D-manopiranosil-(1→2)-D-manopiranosido de aminooxietilo **28**:

**28**

30

A una solución del compuesto **27** (1 eq, 367 mg, 0,33 mmol) en 11 ml de CH₃CN anhidro se añaden Et₃N (7,2 eq, 0,34 ml, 2,4 mmol), TMSCl (7 eq, 0,296 ml, 2,34 mmol) y NaI (7 eq, 350 mg, 2,34 mmol) en atmósfera de nitrógeno. Después de 4 h a temperatura ambiente, se detiene la agitación. El sobrenadante se canula y la sal residual se enjuaga con CH₃CN anhidro (2x3 ml) luego el disolvente se canula. El disolvente se evapora y el residuo obtenido se recoge en 7,5 ml de metanol anhidro que contiene hidrazina (12 eq, 4,01 mmol, 0,194 ml). La reacción se deja durante una noche con agitación. Se forma un precipitado blanco. El residuo obtenido después de la evaporación se purifica por cromatografía en una columna de gel de sílice (eluyente: isopropanol/NH₄OH/H₂O a 5:4:1) para conducir al compuesto **28** con un rendimiento del 64 % (103 mg, 0,22 mmol).

35

40

Fórmula química **28**: $C_{15}H_{30}NO_{14}P$

Masa exacta: 479,37 g.mol⁻¹

Rf: 0,33 [isopropanol/NH₄OH/H₂O (5:4:1)]

45

SM, ESI⁺ m/z: 480,3 [M+H]⁺

Ejemplo 4:

Estudio del análogo disacárido **28** de la invención, que responde a la fórmula general (I)

1) Funcionalización de una enzima lisosómica, alfa glucosidasa ácida (GAA) por el análogo disacárido (28)

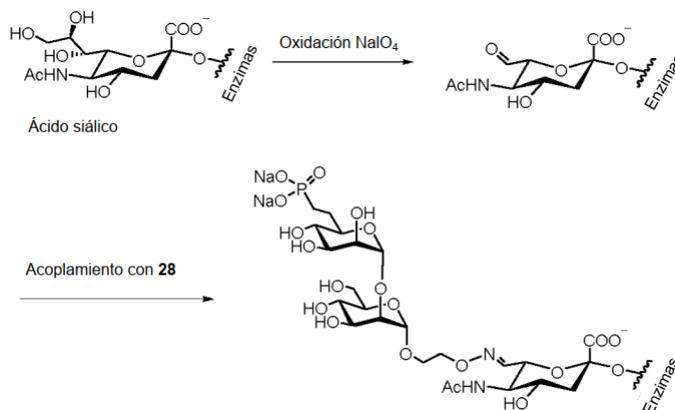
Un compuesto de interés ☺, es decir, una enzima lisosómica, alfa glucosidasa ácida (GAA) que se puede usar para el tratamiento de la enfermedad de Pompe o glucogenosis de tipo II⁷⁻⁸ se funcionaliza en las cadenas de oligosacáridos con el análogo disacárido fosfonato M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (**28**). La enfermedad de Pompe es representativa de la mayoría de las 53 enfermedades lisosómicas diferentes cuya eficacia de tratamiento por enzimoterapia de sustitución depende de RM6P-CI⁷⁻⁹. En efecto, este receptor desempeña un papel clave en la internalización celular de las enzimas recombinantes inyectadas por vía intravenosa y para su direccionamiento intracelular a los lisosomas.

Protocolo experimental:

La GAA humana recombinante (rhGAA) se produce en el sistema de células eucariotas CHO capaces de producir M6P al final de las cadenas glicosiladas y se purifica a partir del medio de cultivo. El peso molecular de la enzima es de aproximadamente 110 000 Da y es reconocida por un anticuerpo específico anti-GAA humano (anti-LYAG, Genetex). La GAA humana recombinante también se puede producir en el sistema celular de baculovirus/insecto Sf9 que no produce restos M6P y que produce cadenas de oligosacáridos manosilados.

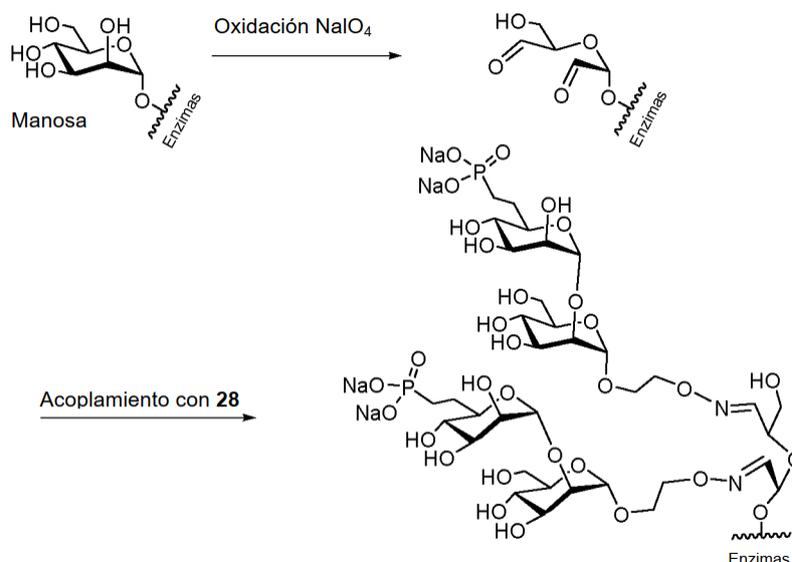
La rhGAA luego se funcionaliza en las cadenas de oligosacáridos con los análogos disacáridos fosfonato M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (**28**). La funcionalización se desarrolla en dos etapas: la primera etapa consiste en generar funciones aldehído mediante la oxidación de las manosas que, en la segunda etapa, reaccionarán con las funciones oxiamina presentes en el brazo de etiloxiamino del análogo (**28**). Las enzimas se oxidan con NaIO₄ 1 mM durante 30 min a 4 °C y luego reaccionan con los análogos disacáridos (100 equivalentes para 1 enzima) durante 2 h a 25 °C. Las enzimas funcionalizadas se obtienen después de diálisis para eliminar los análogos sin reaccionar.

El acoplamiento (injerto) del análogo disacárido fosfonato M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (**28**) con las enzimas se muestra a continuación:



30

La oxidación del ácido siálico se realiza con peryodato sódico.



La oxidación de la manosa se realiza con peryodato sódico.

5 **2) Afinidad para RM6P-CI de rhGAA funcionalizada con M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28)**

El conjugado de fórmula (III), es decir, la rhGAA funcionalizada con el análogo disacárido fosfonato M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) se denomina en lo sucesivo rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28).

- 10 El conjugado de fórmula (III) se evalúa por su afinidad con RM6P-CI. La afinidad de unión de rhGAA y del conjugado rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) se evaluó mediante una técnica de competición de unión competitiva con el RM6P-CI descrita en el ejemplo 2 y se comparó con la afinidad de M6P.

- 15 Los datos indican una alta afinidad por rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) (conjugado de fórmula (III)) correspondiente a una concentración inhibitoria del 50 % (CI₅₀) de $0,55 \cdot 10^{-7}$ M mientras que la afinidad de rhGAA era $3 \cdot 10^{-7}$ M es decir 5,5 veces menor. En comparación la afinidad de M6P es de $3 \cdot 10^{-5}$ M en estos mismos experimentos. Este resultado indica el acoplamiento eficaz de varios dimanósidos análogos de M6P a las cadenas glicosiladas de la enzima.

- 20 **3) Internalización del conjugado rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) (conjugado de fórmula (III)) en los mioblastos de pacientes con la forma adulta de la enfermedad de Pompe (figura 3)**

Protocolo experimental:

- 25 Las células similares a mioblastos de un paciente adulto con enfermedad de Pompe se mantienen en cultivo primario.

- 30 La actividad catalítica de GAA se mide en extractos celulares mediante el sustrato sintético 4-metilumbelliferil- α -D-glucopiranosido (4-MUG). Este sustrato y los patrones de peso molecular se obtienen en Sigma. La actividad de GAA en los extractos celulares (20 μ l) se mide en un volumen de reacción de 75 μ l que contiene ácido cítrico 50 mM, K₂HPO₄ 115 mM, KCl 110 mM, NaCl 10 mM, pH 5,0, con 4-MUG 6 mM durante 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detiene con 75 μ l de Tris HCl 0,1 M pH 8. La fluorescencia se lee con filtros de excitación a 355 nm y emisión a 460 nm en placas de 96 pocillos y se compara con una curva patrón obtenida con 4-metilumbeliferona. La actividad catalítica se expresa por mg de proteína. Media \pm desviación estándar.

- 35 A partir de la figura 3 parece que el injerto de los disacáridos aumenta significativamente la penetración celular de GAA, cuya concentración se mide por su actividad catalítica en el sustrato 4-MUG.

Conclusión:

- 40 El producto de interés rhGAA funcionalizado mediante la adición de disacáridos (28) es más eficaz en el tratamiento de un déficit enzimático relacionado con la enfermedad de Pompe.

- 45 **4) Estudio del método de maduración celular en los mioblastos de un paciente adulto con enfermedad de Pompe del conjugado rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) (conjugado de fórmula (III)) (figura 4)**

La maduración celular de GAA¹⁰ se realizan en endosomas y lisosomas mediante varias divisiones enzimáticas

específicas que transforman sucesivamente el precursor inactivo de 110 kDa en formas intermedias de 95 kDa y 76 kDa y luego en una forma madura y activa de 60-70 kDa en lisosomas¹⁰.

5 Los mioblastos se incuban durante 48 h en presencia de 50 nM rhGAA o conjugado rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) (conjugado de fórmula (III)), luego se lisan y se extraen las proteínas. La maduración celular de la enzima GAA internalizada en los mioblastos de pacientes con enfermedad de Pompe se estudia mediante la técnica de separación en gel de poliacrilamida SDS seguida de inmunodetección de GAA mediante transferencia de Western con un anticuerpo anti-GAA humano (anti-LYAG, Genetex) o anti-actina humana (Invitrogen). La actina se
10 revela como una proteína de control que indica que se depositan cantidades equivalentes de proteína en el gel. Este experimento es representativo de 2 experimentos. La flecha gruesa de la **figura 4** indica la forma intermedia de la GAA. La flecha negra indica la forma madura de GAA (60-70 kDa).

La cuantificación de la forma madura de 60 kDa se realiza considerando como 100 % la banda presente en los mioblastos de sujetos sanos. La expresión de GAA 60 kDa en mioblastos de pacientes corresponde al 1 % de GAA de sujetos sanos y no aumenta en mioblastos tratados con rhGAA. A la inversa, el tratamiento con el conjugado
15 rhGAA-M6Pn- α (1,2)-Man-Etiloxiamino (28) aumenta la banda 60-70 kDa al 47 % del GAA de un sujeto sano. Estos resultados indican que el injerto de los análogos de disacárido favorece fuertemente el método de maduración intracelular de rhGAA que conduce a su forma activa de 60-70 kDa. Esta actividad es importante para una aplicación en el tratamiento por enzimoterapia de la enfermedad de Pompe, pero también se puede aplicar a todas las
20 enfermedades lisosómicas.

Conclusión

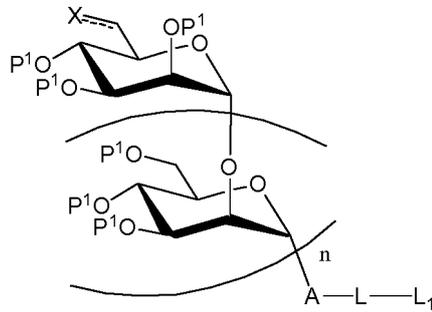
La funcionalización de una enzima lisosómica con dimanósidos modificados permite aumentar de manera muy
25 significativa la entrada celular de esta enzima en relación con la enzima no injertada en células de pacientes que padecen la enfermedad de Pompe. La funcionalización con dimanósidos análogos a M6P facilita la maduración de la enzima dentro de los endosomas y lisosomas en comparación con la enzima no funcionalizada. Este aumento de la eficacia asociado a la afinidad por RM6P-CI puede ser decisivo para la aplicación diagnóstica o terapéutica de las glucoproteínas, particularmente para la terapia de enzimática de sustitución utilizada para los trastornos de
30 almacenamiento lisosómico⁷⁻⁹.

Referencias bibliográficas

1. Solicitud de Patente FR N.º 14 50588 presentada el 23/01/14;
- 35 2. Vidal S *et al.*, Bioorg Med Chem. 10, 4051, (2002);
3. Jeanjean A *et al.*, Bioorg Med Chem. 14, 2575, (2006);
4. Jeanjean A *et al.*, Bioorg Med Chem Lett. 18, 6240, (2008);
5. Solicitud internacional PCT/EP2010/059507;
6. Distler JJ *et al.*, J. Biol Chem, 32, 21687, (1991);
- 40 7. Desnick, RJ, Schuchman EH, Nat Rev Genet 3, 954, (2002);
8. Van der Ploeg AT, Reuser AJ, Lancet, 372, 1342, (2008);
9. Hollak, CE, Wijburg FA, J Inherit Metab Dis, 37, 587, (2014);
10. Moreland RJ *et al.*, Gene, 491, 25, (2012).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto **caracterizado por que** presenta la fórmula general (I):



(I)

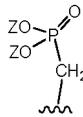
5

en donde:

- n es un número entero que varía de 1 a 3,
- ----- representa un enlace sencillo o un enlace doble,
- cada uno de P¹ representa independientemente entre si H, un grupo protector elegido particularmente entre (CH₃)₃Si-; tBuMe₂Si-; C₆H₅CH₂-; 4-CH₃OC₆H₅CH₂-; o-NO₂C₆H₅CH₂-; CH₃CO-; C₆H₅CO- o CF₃CO-;
- X representa:

15 ◦◦ cuando ----- es un enlace sencillo:

◦◦◦ grupo fosfonato:



20

◦◦◦ grupo fluoro fosfonato



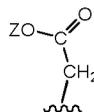
25

◦◦◦ grupo bifluoro fosfonato

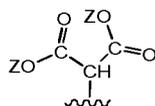


30

◦◦◦ grupo carboxilato



◦◦◦ grupo malonato

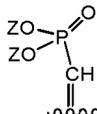


35

°° cuando ----- es un doble enlace:

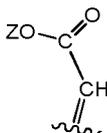
5

°°° el grupo fosfonato:



°°° el grupo carboxilato:

10



con Z representando independientemente entre sí H; un alquilo C₁-C₅; CF₃CH₂-; C₆H₅CH₂- C₆H₅-; (CH₃)₃Si-; un metal alcalino elegido entre Na, Li o K; un amonio NH₄,

15

° A representa un radical divalente elegido entre -O-, -S-, -NH-, -CH₂-

° L representa:

20

°° -H; -NH₂; -(CH₂)_{n1}-CH=CH₂ o -(CH₂)_{n1}-C≡CH con n₁ representando un número entero de 0 a 4, entonces en cada uno de estos casos L₁ está ausente,

°° un radical hidrocarburo divalente saturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 30 átomos de carbono, un radical hidrocarburo divalente insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 2 a 30 átomos de carbono,

25

°° un radical hidrocarburo divalente saturado o insaturado como se definió anteriormente de los cuales uno o más grupos -CH₂-, -CH=CH- y/o -C=C- del radical hidrocarburo saturado o insaturado se reemplaza(n) independientemente entre sí por un grupo -O-; -NH-; -NR₁- con R₁ representando un alquilo C₁-C₅; -S-; -CO-NH-; -NH-CO-O-; -O-N=CH-; -CO-NH-N=CH-; un sistema cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, sustituido o no;

30

° L₁ representa:

-(CH₂)_{n1}-CH=CH₂; -(CH₂)_{n1}-C≡CH; -(CH₂)_{n1}-N₃; -(CH₂)_{n1}-SH; -(CH₂)_{n1}-NH₂; -(CH₂)_{n1}-N=C=O; -(CH₂)_{n1}-N=C=S; -(CH₂)_{n1}-NHR₁; -(CH₂)_{n1}-NR₁R₂; -(CH₂)_{n1}-A₁-NH₂; -(CH₂)_{n1}-A₁-NHR₁; -(CH₂)_{n1}-A₁-NR₁R₂; -(CH₂)_{n1}-NHCO-CH₂Hal; -(CH₂)_{n1}-COZ₁; -(CH₂)_{n1}-A₁COZ₁; -(CH₂)_{n1}-O-N=CH₂; -(CH₂)_{n1}-CO-NH-N=CH₂; -(CH₂)_{n1}-H; un sistema cíclico o heterocíclico, saturado o insaturado, sustituido o no; un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I;

35

con

n₁ como se definió anteriormente,

R₁ y R₂ representando independientemente entre sí un alquilo C₁-C₅,

A₁ representando -O-, -NH-,

Hal representando Cl, Br o I;

40

Z₁ representando -OH, -OR₁, -NHR₁, -NH-NH₂, -NH-NHR₁, -NH-NR₁R₂ con R₁ y R₂ como se definió anteriormente, un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I.

2. Compuesto según la reivindicación 1 **caracterizado por que:**

45

L representa:

° -NH₂, -(CH₂)_{n1}-CH=CH₂ o -(CH₂)_{n1}-C=CH, con n₁ como se define en la reivindicación 1, entonces en cada uno de estos casos L₁ está ausente,

50

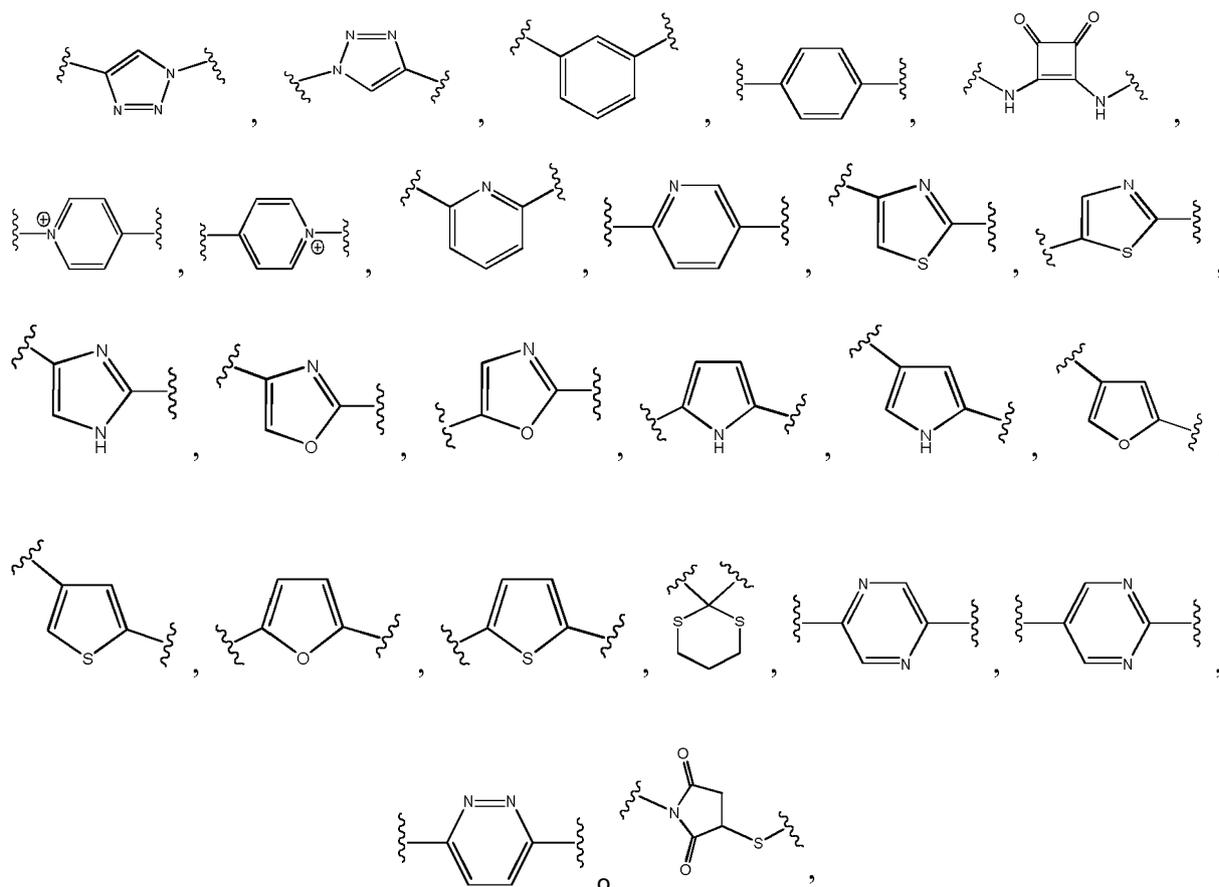
° un radical hidrocarburo divalente saturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, un radical hidrocarburo divalente insaturado, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que tiene de 2 a 10 átomos de carbono,

° un radical hidrocarburo divalente saturado o insaturado como se definió anteriormente, en que uno o más grupos -CH₂-, -CH=CH- y/o -C=C- del radical hidrocarburo saturado o insaturado es(son) reemplazado(s) independientemente entre sí por:

55

°° un grupo -O-; -NH-; -S-; -CO-NH-; -NH-CO-O-; y/o

°° un sistema cíclico o heterocíclico elegido entre:



5

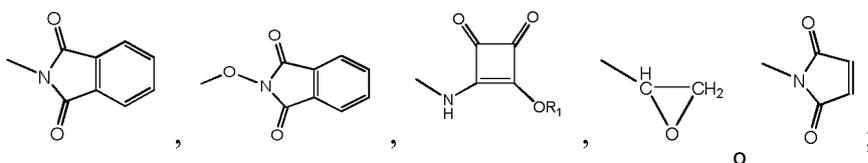
10

L₁ representa:

-(CH₂)_{n1}-CH=CH₂; -(CH₂)_{n1}-C≡CH; -(CH₂)_{n1}-N₃; -(CH₂)_{n1}-SH; -(CH₂)_{n1}-NH₂; -(CH₂)_{n1}-N=C=O; -(CH₂)_{n1}-N=C=S; -(CH₂)_{n1}-O-NH₂; -(CH₂)_{n1}-NHCO-CH₂Hal; -(CH₂)_{n1}-COOH; -(CH₂)_{n1}-COOR₁; -(CH₂)_{n1}-CO-NH-NH₂; -(CH₂)_{n1}-H; un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I;

15

o un sistema cíclico o heterocíclico elegido entre:



20

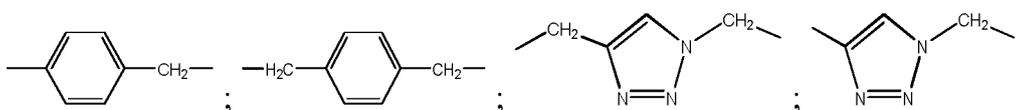
con n₁, R₁ y Hal como se definen en la reivindicación 1.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que:**

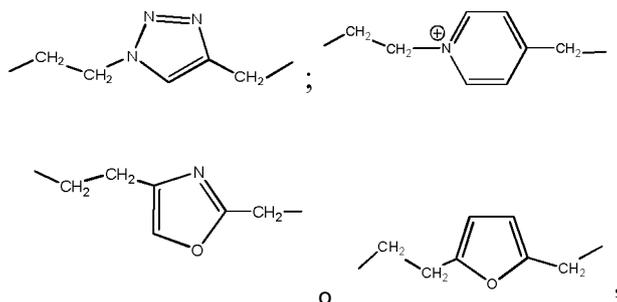
o el sustituyente L se elige entre:

25

∞ -CH=CH₂, -C=CH o -NH₂ entonces en cada uno de estos casos L₁ está ausente,
 ∞ -CH₂-; -CH₂-CH₂-; -(CH₂)₃-; -(CH₂)₄-; -(CH₂)₅-; -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-; -(CH₂-CH₂-O)₂-CH₂-CH₂-; -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-; -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-;



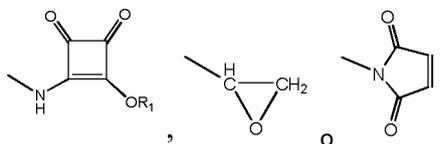
30



5 y

◦ el sustituyente L₁ se elige entre:

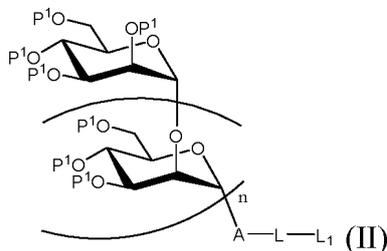
- 10 ∞ -CH=CH₂; -C=CH; -N₃; -SH; -NH₂; -N=C=O; -N=C=S; -O-NH₂; -NHCO-CH₂Cl; -COOH; -COOR₁; -CO-NH-NH₂, un halógeno seleccionado entre F, Cl, Br o I,
 ∞ un sistema cíclico o heterocíclico elegido entre:



15 con R₁ como se define en la reivindicación 1 o 2.

4. Método de preparación de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por que** el compuesto de partida utilizado es un compuesto correspondiente a la fórmula (II):

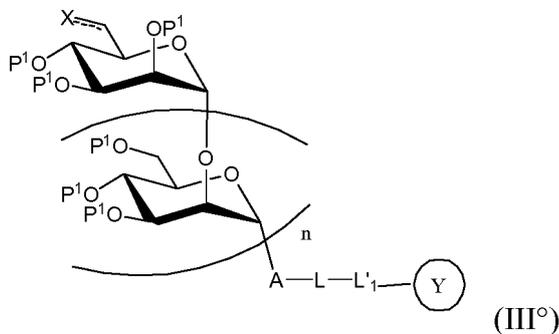
20



en donde P¹, A, L, L₁ y n son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25

5. Conjugado **caracterizado por que** corresponde a la fórmula general (III):



30

en donde P¹, X, n, A y L son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, L₁' representa el sustituyente L₁ como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 implicado en un enlace covalente con un grupo funcional portado por un compuesto de interés ⊙, dicho compuesto de interés ⊙ siendo seleccionado entre enzimas, nanopartículas, proteínas, anticuerpos o agentes citotóxicos.

6. Conjugado según la reivindicación 5, **caracterizado por que** dicho conjugado tiene una afinidad Cl₅₀ para el

receptor catiónico de manosa 6-fosfato independiente de catión (RM6P-CI) de al menos 10^{-5} M, y preferentemente que varía de 10^{-6} a 10^{-9} M.

7. Conjugado según la reivindicación 5 o 6, **caracterizado por que** el compuesto de interés \textcircled{Y} es una enzima lisosómica o una nanopartícula.

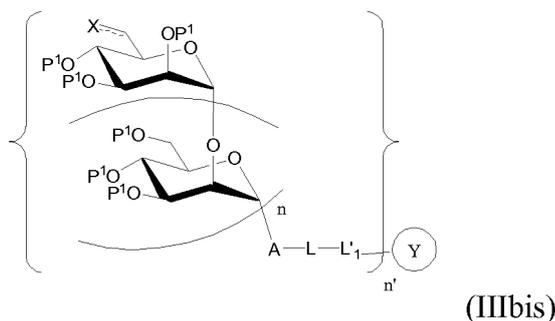
8. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su uso en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, particularmente elegido entre enzimoterapia sustitutiva, terapia fotodinámica o tratamiento del cáncer.

9. Conjugado según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su uso en un método de diagnóstico, particularmente de enfermedades o afecciones asociadas con un aumento o disminución de la expresión de RM6P-CI.

10. Uso de al menos un compuesto de fórmula (I) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, para formar al menos un enlace covalente con al menos un grupo funcional portado por un compuesto de interés \textcircled{Y} , dicho compuesto de interés \textcircled{Y} siendo seleccionado entre enzimas, nanopartículas, proteínas, anticuerpos o agentes citotóxicos.

11. Uso según la reivindicación 10 de n' compuestos de fórmula (I) para formar un n' enlace(s) covalente(s) con n' grupo(s) funcionale(s) del compuesto de interés \textcircled{Y} , siendo n' un número entero que varía de 1 a 1000, y preferentemente de 1 a 100.

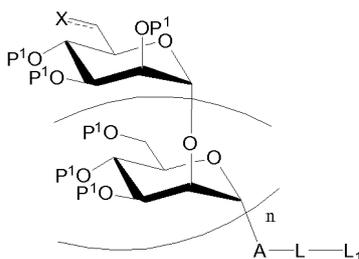
12. Uso según la reivindicación 10 u 11 para formar el conjugado de fórmula general (IIIbis):



en donde P^1 , X, n, A, L, L^1 y \textcircled{Y} son como se definen en la reivindicación 5, n' es como se define en la reivindicación 11.

13. Método de preparación de un conjugado de fórmula (III) como se define en la reivindicación 5 o un conjugado de fórmula (IIIbis) como se define en la reivindicación 12, **caracterizado por que** se hace reaccionar:

- al menos un grupo funcional portado por un compuesto de interés \textcircled{Y} , dicho compuesto de interés siendo seleccionado entre enzimas, nanopartículas, proteínas, anticuerpos o agentes citotóxicos, con
- al menos un compuesto correspondiente a la fórmula (I):



en donde

P¹, X, A y n son como se definen en la reivindicación 1,
L y L₁ son como se definen en la reivindicación 2 o 3.

Figura 1

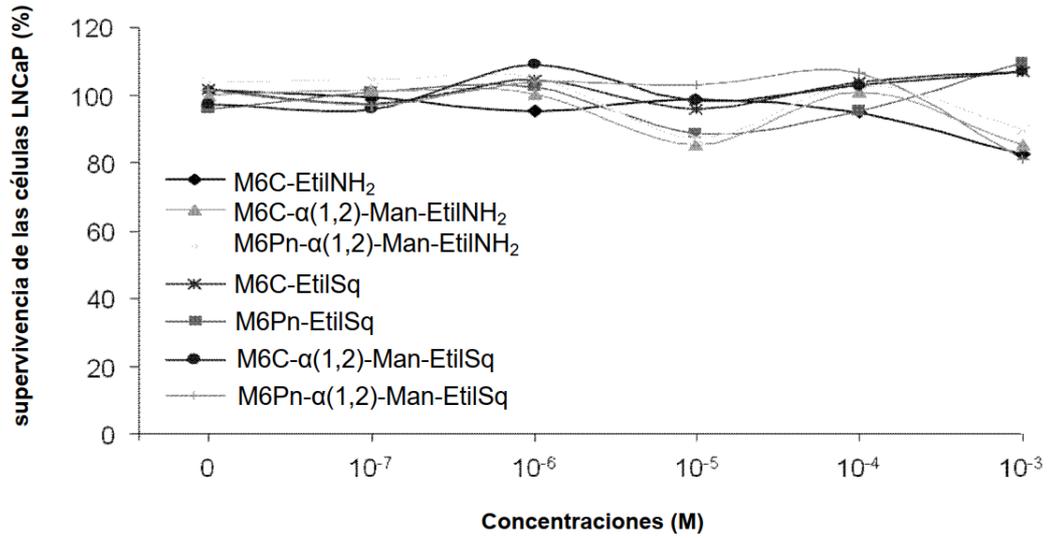


Figura 2

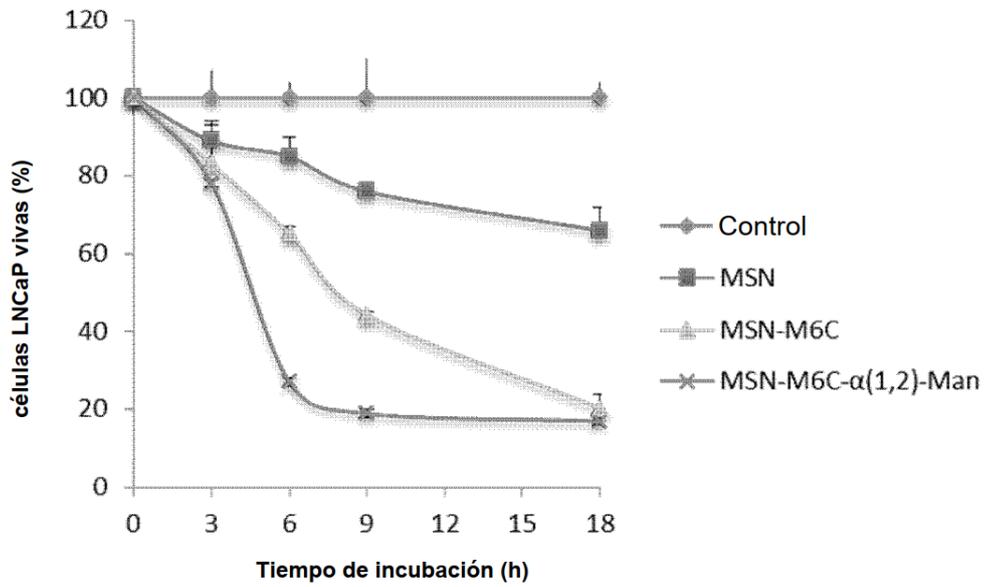


Figura 3

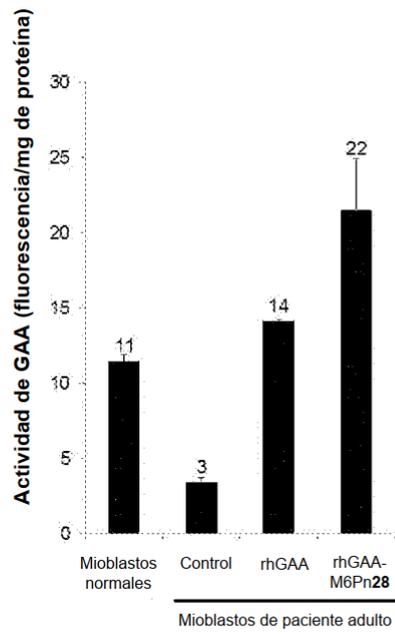


Figura 4

