

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 325 567**

21 Número de solicitud: 200703050

51 Int. Cl.:
C07H 15/26 (2006.01)
C07H 5/10 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación: **14.11.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.09.2009**

Fecha de la concesión: **25.01.2010**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **12.02.2010**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.02.2010

73 Titular/es: **Universidad de Sevilla**
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES

72 Inventor/es: **Moreno Vargas, Antonio José;**
Molina Sanz, Lidia;
Carmona Asenjo, Ana Teresa;
Lambelet, Martine;
Spertini, Olivier y
Robina Ramírez, Inmaculada

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Tiofucósidos conteniendo polihidroxiálquil-furanos, síntesis y usos de los mismos.**

57 Resumen:

Tiofucósidos conteniendo polihidroxiálquil-furanos, síntesis y usos de los mismos.

Compuesto que comprende un tiofucósido conteniendo polihidroxiálquil-furanos. La invención también se refiere al método de obtención de dicho compuesto y a su aplicación en el tratamiento de alteraciones o desórdenes en los que intervienen selectinas, como, por ejemplo, procesos inflamatorios, cáncer, artritis, trombosis, dermatitis, inflamaciones, pulmonares o afecciones cardíacas.

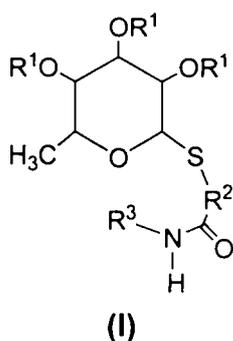
ES 2 325 567 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Tiofucósidos conteniendo polihidroxiálquil-furanos, síntesis y usos de los mismos.

La presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), además de su procedimiento de obtención y su aplicación en el tratamiento de alteraciones o desórdenes en los que intervienen selectinas, como por ejemplo, procesos inflamatorios, cáncer, artritis, trombosis, dermatitis, inflamaciones pulmonares o afecciones cardíacas.



Estado de la técnica anterior

Las selectinas son glicoproteínas dependientes del ión Ca^{2+} que se encuentran en las membranas de las superficies celulares. Constituyen una familia de tres lectinas que inician la adhesión de los leucocitos a las plaquetas o a las células endoteliales. Una de sus características es que presentan un dominio de lectina- NH_2 terminal, el cual interviene en el reconocimiento de carbohidratos. Las tres selectinas se denominan de acuerdo con el tipo de célula en la que se identificó cada una originalmente. Selectina E identificada en células endoteliales; selectina P, descubierta en plaquetas activadas; y selectina L, reconocida como marcador de la superficie celular en leucocitos. Cada una de las selectinas interviene como un factor clave en etapas relacionadas con la adhesión y el reconocimiento celular.

En particular, se ha estudiado ampliamente el papel de las selectinas como moléculas de adhesión celular en procesos inflamatorios (Sperandio, M. *FEBS J.* 2006, vol. 273, pp. 4377-4389). Cuando ha habido una invasión por un patógeno bacteriano o cuando se ha producido un daño tisular, tiene lugar el reclutamiento de leucocitos y migración hacia el sitio dañado, permitiéndoles efectuar su acción inmunológica (Springer, T. A. *Annu. Rev. Physiol* 1995, vol. 57, pp. 827-872). Este reclutamiento comienza con la captura y traslado de los leucocitos circulantes hacia el endotelio dañado y continúa con el rodamiento de los mismos sobre la superficie endotelial de las plaquetas lo que precede a la adhesión. Estos procesos están mediados por las selectinas expresadas en las vénulas del endotelio activado, las cuales se unen a determinados carbohidratos presentes en la superficie de los leucocitos, que actúan como ligandos de las selectinas. Si bien esta unión es relativamente baja, es suficiente para funcionar como un freno biológico que desacelera y facilita el rodamiento de los leucocitos sobre la célula endotelial. La interacción de selectinas con los ligandos de carbohidratos situados en los leucocitos tiene como misión principal facilitar la unión tenue de los leucocitos al endotelio durante los primeros estadios de la inflamación u otros procesos relacionados. Esta interacción adherente, leve y transitoria permite que las células rueden a lo largo de la pared vascular endotelial. Después de esta interacción, los leucocitos pueden separarse totalmente de las células endoteliales o unirse completamente mediante la acción de las integrinas, adentrándose en el tejido (Khan, A. *et al.*, *I. Microcirculation* 2003, vol. 10, pp. 351-358). El rodamiento de los leucocitos es una etapa importante en el reclutamiento de los mismos ya que permite obtener un contacto íntimo entre los leucocitos y la superficie del endotelio. Este fenómeno hace que se desencadenen las señales específicas para su infiltración en los tejidos para fagocitar los organismos invasores combatiendo la infección (Panés *et al.*, *Immunol.* 2003, vol. 22, pp. 203-214).

Sin embargo, el excesivo reclutamiento de leucocitos en lugar de beneficiar puede perjudicar ya que conduce a procesos inflamatorios que pueden originar afecciones crónicas como artritis reumatoide, inflamaciones intestinales o pulmonares, daños cardíacos, dermatitis, etc. (Satoh, T. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 2002, vol. 32, pp. 1274-1281).

Los ligandos de selectinas constituyen por tanto un factor determinante e importante en el reclutamiento efectivo de leucocitos. Dichos ligandos son oligosacáridos pequeños sialilados y fucosilados como el sialil Lewis X (sLex) ($\text{NeuAc}\alpha(2 \rightarrow 3)\text{Gal}\beta(1 \rightarrow 4)[\text{Fuc}\alpha(1 \rightarrow 3)]\text{GlcNAc}\beta 1$), el cual es un tetrasacárido terminal de ciertas glicoproteínas (Foxall, C. *et al. J. Cell Biol.* 1992, vol. 117, pp. 895-902; Foxall, C. *et al.*, *J. Cell Biol.* 1992, vol. 119, pp. 215-227; Varki, A. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1992, vol. 257, pp. 257-266; Renkonen, R *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998, vol. 435, pp. 63-73).

ES 2 325 567 B2

Los oligosacáridos que contengan el grupo SLex-R, inhiben la adhesión de los leucocitos a E- y P-selectinas (Polley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, vol. 88, pp. 6224-6228; Foxall, C. *et al.*, *J. Cell Biol.* 1992, vol. 117, pp. 895-902; Rosen, S. D, *Annu Rev Immunol.* 2004, vol. 22, pp. 129-156). Las bases estructurales que controlan el reconocimiento de estos glicoconjugados por parte de las selectinas han sido ampliamente estudiadas (Ernst, B. *et al.* 5 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, vol. 34, pp. 1841-1844; Veluraja, K. *et al.*, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005, vol. 23, pp. 101-111; Beauharnois, M., *E. Biochemistry* 2005, vol. 44, pp. 9507-9519; Wong, C.-H. *et al.*, *J. Mol. Struct.* 2002, vol. 602(60), pp. 215-222; WO 0189531 A1).

Es importante destacar que los ligandos que posean alta afinidad frente a selectinas no solamente pueden llegar a ser 10 fármacos eficaces en el tratamiento de procesos inflamatorios sino también de otros procesos mediados por selectinas como cáncer (Alessandro, R. y otros, *Int. J. Cancer* 2007, 121, 528-535), diabetes (Haubner, F. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, vol. 360, pp. 560-565), obesidad (Franco, C. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2007, vol. 92, pp. 2644-2647), hipertensión y afecciones cardíacas (Varughese, G. I. *et al.*, *J. Int. Med.* 2007, vol. 261, pp. 384-391) o trombosis (Ay, C. *et al.*, *Clin. Chem.* 2007, vol. 53, pp. 1235-1243).

15 También se ha demostrado que el reconocimiento entre L-selectinas y determinados carbohidratos desempeña un papel relevante en el proceso de gestación porque interviene en el anidamiento del embrión en el útero (Prakobphol, A. *et al.*, *Developmental Biol.* 2006, vol. 298, pp. 107-117).

20 El propio SLex como fármaco presenta los inconvenientes de una baja afinidad hacia las selectinas, una síntesis química o enzimática costosa dado el alto número de reacciones sofisticadas implicadas, y una baja biodisponibilidad ya que dada su estructura oligosacáridica es sensible a la hidrólisis ácida y enzimática (Bendas, G., *Mini-Rev. Med. Chem.* 2005, vol. 5, pp. 575-584; Kaila, N. *et al.*, *Med. Res. Rev.* 2002, vol. 22, pp. 566-601) De acuerdo con esto y para soslayar los anteriores inconvenientes se han diseñado miméticos del SLex. La mayoría de ellos implican 25 modificaciones del propio SLex en donde se ha sustituido una, dos o tres unidades de azúcar por el farmacóforo adecuado. (Kunz, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, vol. 46, pp. 2108-2111; Guindon, Y., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, vol. 127, pp. 554-558). También se han publicado aproximaciones multivalentes con algunos miméticos (Thoma, G. *et al.*, *Synthesis* 2005, pp. 1491-1495; Ali, M., *et al.* *Faseb J.* 2004, vol. 18, pp. 152-154). Debido al interés de aplicabilidad de estos productos, existen patentes relacionadas como por ejemplo, US 2006241022 A1; US6111084A.

30 Con la idea de obtener fármacos de utilidad clínica, se han preparado y estudiado estructuralmente miméticos del SLex con enlaces estables frente a la hidrólisis ácida y enzimática como son los enlaces C-C y C-S. Cabe destacar entre ellos los C-glicósidos y C-disacáridos (Jiménez-Barbero, J. *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.* 2007, pp. 645-654; Guindon, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, vol. 127, pp. 554-558). El empleo de S-glicósidos y tio-disacáridos en este tipo de miméticos es mucho más escaso y se limita a pocos ejemplos (Witzak, Z. *et al.*, *Mini Rev. Med. Chem.* 2003, vol. 3, pp. 271-280).

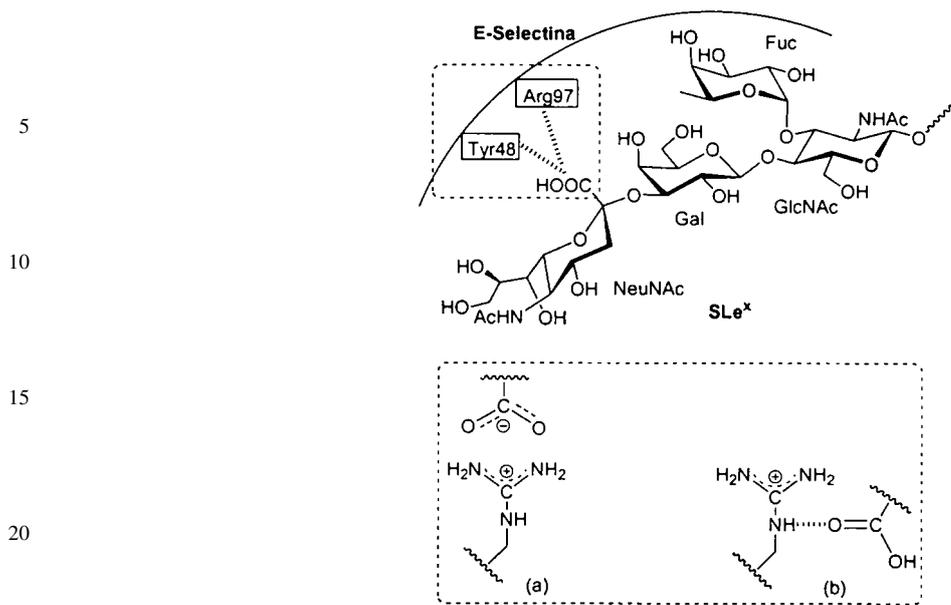
35 Todos los compuestos mencionados en los anteriores artículos o patentes contienen una función ácido carboxílico que mimetiza la unidad de ácido acetilneuramínico presente en el SLex natural. (Su acción ha sido recientemente tratada en el artículo de revisión: Tizt, A. *et al.*, *Chimia*, 2007, vol. 61, pp. 194-197). La sustitución del grupo carboxilato por otros grupos cargados como sulfatos, sulfonatos, fosfonatos o fosfatos origina moléculas con similar actividad (Brandley, B. K. *et al.*, *Glycobiology* 1993, vol. 3, pp. 633-639; Ohmoto, H. *et al.*, *J. Med. Chem.* 1996, vol. 39, pp. 1339-1343; WO9831697A1; W09809976A1).

45 Todos estos modelos se acogen a un modelo inicial de interacción ligando-selectinas en el que un grupo carboxilato cargado negativamente del ligando o inhibidor interacciona con un grupo cargado positivamente de la selectina, concretamente con el grupo guanidino del residuo Arg97 (aproximación "a" en la siguiente figura) (Wong C.-H. *et al.*, *Chem. Rev.* 1998, vol. 98, pp. 833-862). Sin embargo, la resolución de la estructura de rayos X de un complejo E-selectina/SLex (Somers, W. S. *Cell*, 2000, vol. 103, pp. 467-479) junto con cálculos mecánico-cuánticos (Pichierri, F. 50 *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, vol. 10, pp. 2751-2757), indican que la interacción del grupo carboxilato del ligando con la selectina es una interacción por puente de hidrógeno entre el grupo carbonilo de la función ácido carboxílico del SLex y los grupos NH de los residuos Arg97 y Tyr48 (aproximación "b" en la siguiente figura).

55

60

65



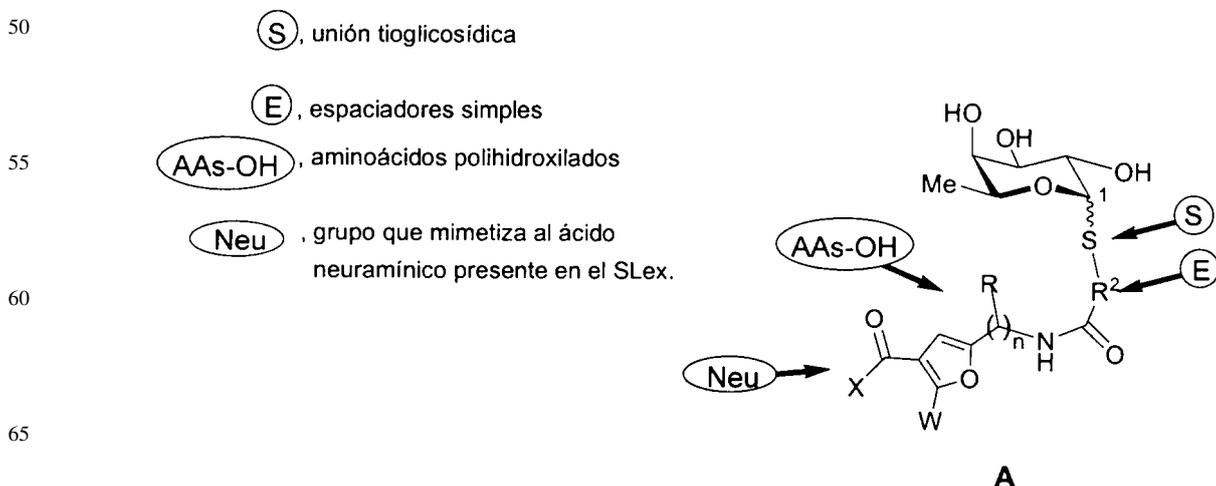
Esto abre las puertas hacia el diseño y preparación de nuevos ligandos de selectinas no cargados en los que la función ácido carboxílico está mimetizada por otras funciones neutras como ésteres o amidas.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a la preparación y evaluación biológica de tiofucósidos no cargados que muestran afinidad por E- y P-selectinas. Su actividad se consigue a concentraciones bajas en el rango mM de IC_{50} . La presencia de un átomo de azufre (S) en el enlace glicosídico (S-conjugados) es novedosa en este tipo de compuestos y también su aplicabilidad. Estos compuestos con S (o sus formas oxidadas, sulfonas o sulfóxidos), presentan una mayor estabilidad y solubilidad en medios acuosos comparados con sus análogos O-conjugados. El carácter neutro les confiere la capacidad de inhibir específicamente las interacciones ligando-selectina. Presentan también actividad anticáncer en líneas celulares.

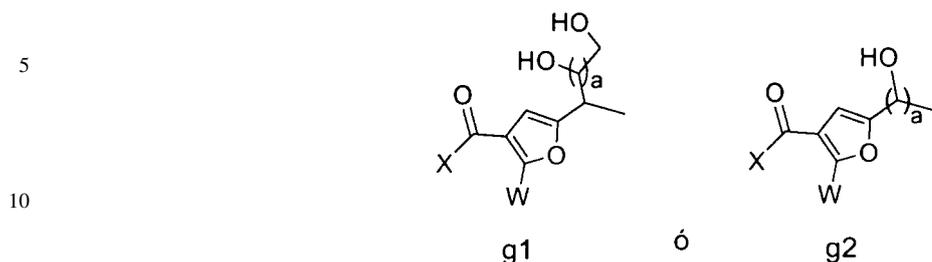
Los compuestos de la presente invención son glicósidos no cargados que incorporan una unidad de fucosa, un enlace tioglicosídico y aminoácidos no proteinogénicos en el aglicón. Dichos compuestos se acogen a un nuevo modelo (A) que reúne los requisitos estructurales adecuados para producir una nueva generación de antagonistas de selectinas, y que mejora los modelos existentes en el estado de la técnica anterior (Wong, C.-H. *et al.*, *Chem. Rev.* 1998, 98, 833-862), en cuanto a su simplicidad, viabilidad sintética y menor coste de producción.

Los primeros compuestos obtenidos que derivan de dicho modelo presentan afinidad por E y P selectinas y actividad anti-cáncer en líneas celulares, actúan por tanto como miméticos del SLe^x :



ES 2 325 567 B2

R³ puede ser cualquiera de los grupos (g1) ó (g2) siguientes:



15 donde:

X es un grupo -OR⁴ ó un grupo -NHR⁴. R⁴ se selecciona de entre la lista que comprende hidrógeno, un grupo alquilo (C₁-C₆), sustituido o no sustituido, ó un grupo arilo (C₆-C₁₂), sustituido o no sustituido. Preferiblemente R⁴ es un grupo alquilo (C₁-C₄), y más preferiblemente R⁴ es un grupo etilo;

20 W es un grupo -(CH₂)_b-CH₃ con un valor de "b" de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9, preferiblemente b es 0; y

"a" puede ser 1, 2 o 3, obteniéndose cadenas del tipo -(CHOH)_a-.

25 En estos compuestos de fórmula general (I) la configuración del carbono del enlace tioglicosídico puede ser *S* o *R*.

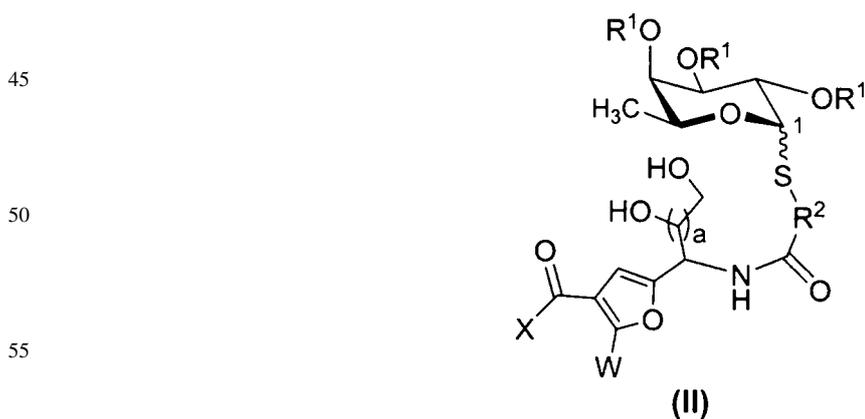
Una realización preferida de la presente invención, comprende compuestos sulfóxidos ó sulfonas obtenidos mediante la oxidación del átomo de S de cualquiera de los compuestos de fórmula general (I).

30 En la presente invención el término "alquilo" se refiere a cadenas carbonadas alifáticas, lineales o ramificadas. Cuando se hace referencia a un alquilo C₁-C₆ se entiende que dicho grupo tiene de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo (Me), etilo (Et), n-propilo (Pr), i-propilo (Prⁱ), n-butilo (Buⁿ), t-butilo (Bu^t), n-pentilo, etc.

35 En la presente invención el término "cicloalquilo" se refiere a cadenas carbonadas alifáticas cíclicas. Cuando se hace referencia a un cicloalquilo C₃-C₆, se entiende que dicho grupo tiene entre 3 y 6 átomos de carbono, por ejemplo el grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo ó ciclohexilo.

Por "arilo" se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática. Cuando se hace referencia a un grupo arilo C₆-C₁₂ se entiende que dicho grupo tiene de 6 a 12 átomos de carbonos, por ejemplo fenilo.

40 En una realización preferida, el compuesto de la invención tiene la siguiente fórmula general (II):

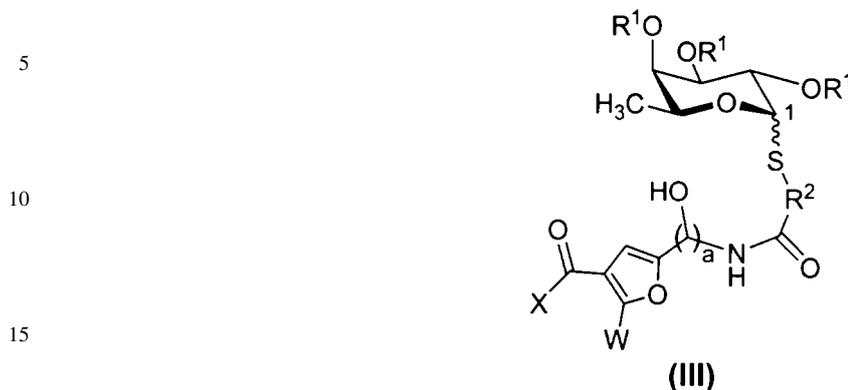


60 Es decir, R³ es el grupo g1. Cuando "a" es 1 incluye las configuraciones *R* y *S* en el carbono del grupo (-CHOH-)₁, cuando "a" es 2 incluye las configuraciones *eritro* o *treo* en los dos carbonos de los grupos (-CHOH-CHOH-), y cuando "a" es 3 que incluye en los tres carbonos de los grupos (-CHOH-CHOH-CHOH-) las configuraciones *arabino*, *lixo*, *ribo* o *xilo*.

65 Las configuraciones *eritro* y *treo* se asocian con la configuración de los dos carbonos centrales de los carbohidratos de 4C eritrosa y treosa; y las configuraciones *arabino*, *lixo*, *ribo* y *xilo* se asocian con la configuración de los tres carbonos centrales de los carbohidratos de 5C arabinosa, lixosa, ribosa y xilosa.

ES 2 325 567 B2

En otra realización preferida, el compuesto de la invención tiene la fórmula general (III):



20 Es decir, R^3 es el grupo g2. En este caso, cuando “a” es 2 incluye las configuraciones *eritro* y *treo* en los dos carbonos de los grupos (-CHOH-CHOH-), y cuando “a” es 3 que incluye en los tres carbonos de los grupos (-CHOH-CHOH-CHOH-) las configuraciones *arabino*, *lixo*, *ribo* o *xilo*.

25 La presente invención además, se refiere a la preparación de estos glicósidos no cargados que incorporan una unidad de L-fucosa, un enlace tioglicosídico, y aminoácidos no proteinogénicos en el aglicón.

Así, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención del compuesto de fórmula general (I) que comprende el acoplamiento de los compuestos de fórmula general (IV), llamados tiofucosil derivados:



45 con derivados de aminopolihidroxiálquilfuroilo. El acoplamiento se produce con el grupo amino sustituido en la cadena poliólica, bien en el carbono más próximo al furano cuando R^3 es el grupo g1 (XCO-OC₄H-[CH(NH₂)-(CHOH)_a-CH₂OH]) o bien en el más alejado cuando R^3 es el grupo g2 (XCO-OC₄H-[(CHOH)_a-CH₂NH₂]).

50 En esta fórmula general R^5 es H o un grupo protector y R^1 y R^2 como han sido definidos anteriormente.

55 El término “tiofucosil derivados” o “S-fucosil derivados” indica la existencia de sustituyentes unidos al átomo de S. Estos sustituyentes incluyen cadenas carbonadas lineales o cíclicas o aromáticas terminadas en un grupo carboxilo (COOH) que se encuentra protegido con un grupo protector, indicando “grupo protector” a los grupos que se puedan introducir en un grupo funcional (en este caso COOH) y que se pueda quitar fácilmente para volver a generar el mismo grupo COOH. Este grupo será punto de anclaje para la unión de cualquier cadena de aminoácidos, peptídica o proteínica. En este sentido, los tiofucosil derivados que lo contienen, son material de partida para la producción de glicoconjugados sintéticos en donde el péptido o la proteína se unen al azúcar por un átomo de azufre, es decir, neo-glicoconjugados.

60 El término aminopolihidroxiálquil-furoato de etilo denota compuestos que contienen furano (anillo de 5 eslabones y aromático conteniendo oxígeno), el cual lleva como uno de sus sustituyentes, un grupo COX (X = OCH₂CH₃) y una cadena amino-polihidroxiálquica CH(NH₂)-(CHOH)_a-CH₂OH] para los compuestos tipo (1-APHFE) de fórmula general: [XCO-(W)-OC₄H-[CH(NH₂)-(CHOH)_a-CH₂OH] y [(CHOH)_a-CH₂NH₂] para los compuestos tipo (4-APHFE) de fórmula general [XCO-(W)-OC₄H-[(CHOH)_a-CH₂NH₂]. En ambos tipos W es una cadena alquílica de CH₃ a C₁₀H₂₁. Estos compuestos se obtienen a partir de un monosacárido de 4, 5, 6 o 7 átomos de C por reacción con un compuesto X-CO-CH₂-CO-W y funcionalización de la cadena polihidroxiálquica en condiciones descritas (*J. Org. Chem.* 2003, 68, 4138-4150; *Synlett* 2006, 1327-1330, ya citados).

65

ES 2 325 567 B2

El método de obtención del tiofucosil derivado de la invención, el compuesto de fórmula (IV), se lleva a cabo mediante las siguientes etapas:

5 a) reacción de la L-fucosa ($\text{CH}_3\text{-(CHOH)}_4\text{-CHO}$) con un tioácido, por ejemplo CH_3COSH en presencia de HCl gas y a continuación tratamiento con un anhídrido de ácido carboxílico, como por ejemplo $\text{CH}_3\text{CO-O-CO-CH}_3$ y piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), para obtener una mezcla de epímeros de 1- tiofucosa peracetilada;

b) La separación cromatográfica de los isómeros α y β obtenidos en la etapa (a);

10 c) reacción de cualquiera de los isómeros separados en la etapa anterior (b) con un bromo derivado de fórmula $\text{Z-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Br}$ en donde Z grupo COO-prottegido, indicando protegido que tiene un grupo protector que puede ser eliminado fácilmente.

d) eliminación del grupo protector de los compuestos obtenidos en el paso anterior (c);

15 e) eliminación de los grupos protectores remanentes de la etapa anterior (d), siempre que sea necesario, y

f) desacilación de Zemplén, obteniéndose el compuesto de fórmula (IV) con $\text{R}^1 = \text{H}$; $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{-CH}_2$; $\text{R}^3 = \text{H}$ en el ejemplo indicado.

20 Particularmente, la invención se refiere a los métodos de producción de tales compuestos y sus resultados de inhibición frente E- y P-selectinas y de actividad anti-cáncer en líneas celulares.

25 Los compuestos de la presente invención que derivan de dicho modelo (A), son moléculas neutras, estables frente a la degradación por proteasas por incorporar aminoácidos no proteínogénicos, estables frente a la hidrólisis ácida o enzimática por la presencia de un enlace S-glicosídico, versátiles por la posibilidad de oxidación del S a los correspondientes sulfóxidos y sulfonas y más solubles en agua que los análogos oxigenados. Además, incorporan grupos aromáticos lo que es favorable para su interacción con proteínas.

30 Los compuestos no cargados (X=OR) de la presente invención mostraron una afinidad frente a E- y P-selectinas análoga a los cargados negativamente los cuales, en condiciones fisiológicas, provienen de los compuestos con (X=OH). Los compuestos aniónicos tienen la posibilidad de interactuar con los restos catiónicos de otras proteínas, mientras que los no cargados presentan mayor selectividad frente a determinadas proteínas.

35 Otro aspecto de la invención, comprende el uso del compuesto de fórmula general (I) como productos miméticos del tetrasacárido natural sialil Lewis X (SLe_x).

40 Los compuestos de fórmula general (I) son capaces de inhibir la interacción SLe_x/selectinas [SLe_x-BSA/E-selectina; SLe_x-PSGL-1-gamma/P-selectina], con afinidad frente a selectinas en el rango de concentración mM.

Es interesante señalar que en los ensayos de inhibición realizados el tetrasacárido natural SLe_x inhibe la interacción frente a E-selectinas en el rango mM siendo inactivo frente a las P-selectinas.

45 Otro aspecto de la presente invención, se refiere al compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento.

Aún otro aspecto más de la presente invención, se refiere a un compuesto de fórmula general (I) para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursen con afinidad frente a a E- y P-selectinas. Estas enfermedades pueden ser procesos inflamatorios, cáncer, artritis, trombosis, dermatitis, inflamaciones pulmonares o afecciones cardíacas.

50 Es decir, el compuesto de fórmula general (I) se puede utilizar para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursen con afinidad frente a E- y P-selectina.

55 En una realización preferida el compuesto de la invención, compuesto de fórmula general (I), puede actuar como agente anticancerígeno en un rango de μM .

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquier compuesto de fórmula general (I) además de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 “Los vehículos aceptables farmacéuticamente” incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos perjudiciales al individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son, típicamente, grandes macromoléculas lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos polímeros, copolímeros de aminoácidos, agregados lípidos de trehalosa (tales como gotitas de aceite o liposomas), y partículas de virus inactivos. Dichos vehículos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsificantes, sustancias tamponadoras del pH, y similares.

ES 2 325 567 B2

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

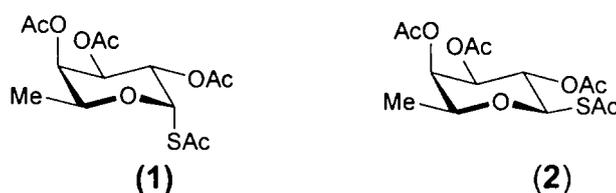
Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto los procedimientos de obtención de los compuestos de fórmula general (I) y su posterior aplicabilidad.

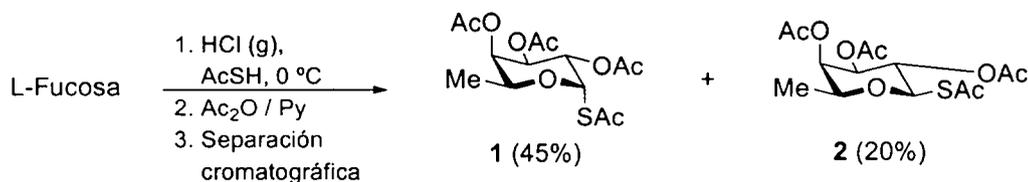
Ejemplo 1

Síntesis de los intermedios de reacción

1. Síntesis de los derivados peracetilados de 1-(α y β)-L-tiofucosa ((1) y (2))



Se pasó $\text{HCl}_{(g)}$ durante 20 minutos a través de un matraz que contenía 35 ml de ácido tioacético a 0°C . A la disolución saturada obtenida, se añadió L-fucosa (3 g, 18.2 mmoles), se agitó a 0°C durante 10 min y posteriormente durante 4 h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la mezcla se evaporó a sequedad y el crudo resultante se acetiló (15 ml Ac_2O /15 ml piridina ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$)/DMAP [4-dimetilaminopiridina (4-(CH_3) $_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}$)] durante una noche. La mezcla resultante se evaporó a sequedad, el crudo se diluyó con CH_2Cl_2 (80 ml) y se lavó con HCl (1 M, 40 ml), disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (40 ml) y agua (40 ml). La fase orgánica obtenida se secó sobre Na_2SO_4 y se concentró a sequedad. El crudo obtenido se purificó mediante columna de cromatografía de gel de sílice (AcOEt :Eter de petróleo, 1:4 \rightarrow 0:2) obteniéndose primero el α -1-tiofucósido peracetilado, compuesto (1), (2.85 g, 45%) y luego su anómero, compuesto (2), (1.27 g, 20%) ambos como aceites amarillos. Una vez separados los compuestos (1) y (2) se utilizaron independientemente.

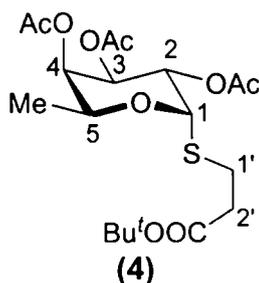


Esquema 1. - Ejemplo de preparación de los compuestos (1) y (2). [AcSH es CH_3COSH , Ac_2O es $\text{CH}_3\text{COOCOCH}_3$ y Py es piridina].

Las reacciones que a continuación se detallan a partir del compuesto (1) son aplicables al compuesto (2).

2. Obtención de los bloques de síntesis (4)-(8)

2.1. Síntesis del compuesto (4)



ES 2 325 567 B2

A una disolución del α -1-tiofucósido, compuesto (1) (544 mg, 1.56 mmoles) y 3-bromopropionato de *tert*-butilo (3) (260 μ l, 1.56 mmoles) en dimetilformamida seca (6 ml), se añadió dietilamina (0.9 ml) en un disolvente orgánico (en este ejemplo dimetilformamida o DMF). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se evaporó el disolvente y el crudo de reacción se purificó en columna de cromatografía de gel de sílice (AcOEt:Eter de petróleo, 1:5), obteniéndose el compuesto (4) (460 mg, 68%) como un sólido blanco.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, J Hz, δ ppm) δ 5.70 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.2$, H-1), 5.28 (d ancho, $J_{3,4} = 3.2$, H-4), 5.25 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.7$, H-2), 5.18 (dd, 1H, H-3), 4.46 (q, $J_{4,\text{CH}} = 7.0$, 1H, H-5), 2.68-2.86 (m, 2H, H-1'a y H-1'b), 2.54-2.49 (m, 2H, H-2'a y 2'b), 2.16 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.05 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.45 (s, 9H, $((\text{CH}_3)_3\text{C-})$), 1.16 (d, 3H, CH_3 de fucosa).

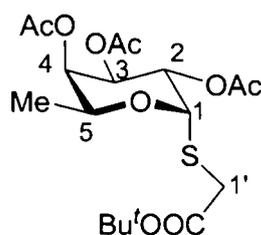
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, δ ppm) δ 170.9, 170.5, 170.2, 169.9 (4-COO-), 82.6 (C-1), 80.9 $((\text{CH}_3)\text{C-})$, 70.9 (C-4), 68.6 (C-3), 68.0 (C-2), 64.8 (C-5), 35.9 (C-2'), 28.1 $((\text{CH}_3)_3\text{C-})$, 25.6 (C-1'), 20.8, 20.7, 20.6 (3 $\text{CH}_3\text{CO-}$), 15.9 (CH_3 de fucosa).

FABMS m/z 273 (100%, $[\text{M-SCH}_2\text{CH}_2\text{OOBu}^1]^+$).

ESIMS m/z 457 (60%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$), m/z 273 (75%, $[\text{M-SCH}_2\text{CH}_2\text{OOBu}^1]^+$).

EIMS m/z 435 (10%, $[\text{M}+\text{H}]^+$). **HRCIMS** calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_9\text{S}$: 435.1689. Encontrado: 435.1693.

2.3. Síntesis del compuesto (7)



(7)

A una disolución del α -1-tiofucósido, compuesto (1) (1.06 g, 3.05 mmoles) en MeOH seco (20 ml), se añadió gota a gota una disolución de MeONa/MeOH (1 M) hasta pH básico. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Pasado este tiempo, la mezcla se neutralizó con resina ácida IR-120 H^+ , se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El crudo resultante se disolvió en MeOH seco (20 ml), se enfrió a 0°C , se añadió trietilamina (0.94 ml, 6.71 mmoles) y bromoacetato de *tert*-butilo (1.26 ml, 8.23 mmoles), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Al cabo de este tiempo, la mezcla se evaporó a sequedad y el crudo obtenido se acetiló (15 ml $\text{Ac}_2\text{O}/15$ ml piridina) durante una noche. A continuación, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el crudo obtenido se purificó en columna de cromatografía de gel de sílice (AcOEt:Eter de petróleo, 1:5), obteniéndose el compuesto (7) (781 mg, 61%) como un sólido blanco.

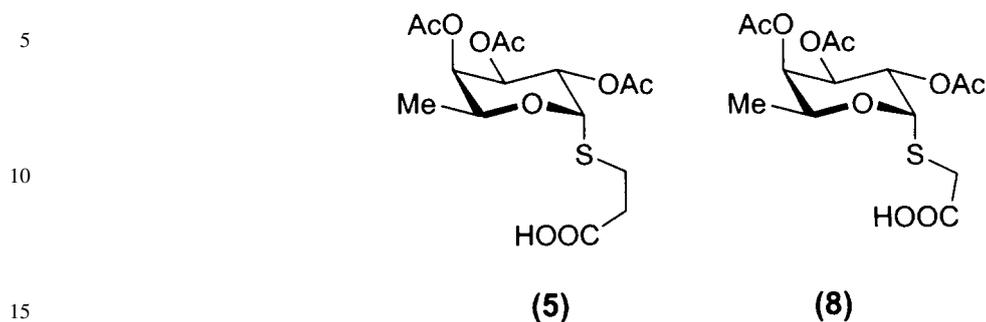
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, J Hz, δ ppm) δ 5.79 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.4$, H-1), 5.29 (m, 2H, H-2 y H-4), 5.22 (dd, 1H, $J_{3,4} = 3.0$, $J_{2,3} = 10.9$, H-3), 4.47 (br. q, $J_{4,\text{CH}} = 6.5$, 1 H, H-5), 3.27 (d, 1H, $J_{1'a,1'b} = 15.0$, H-1'a), 3.07 (d, 1H, H-1'b), 2.16 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 2.07 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.99 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.46 (s, 9H, $((\text{CH}_3)_3\text{C-})$), 1.15 (d, 3H, CH_3 de fucosa).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3 , 298 K, δ ppm) δ 170.6, 170.2, 170.0, 169.0 (4-COO-), 82.4 (C-1), 82.0 $((\text{CH}_3)\text{C-})$, 71.1 (C-4), 68.7 (C-3), 68.0 (C-2), 65.4 (C-5), 32.5 (C-1'), 28.1 $((\text{CH}_3)_3\text{C-})$, 20.9, 20.8, 20.7 (3 $\text{CH}_3\text{CO-}$), 16.1 (CH_3 de fucosa).

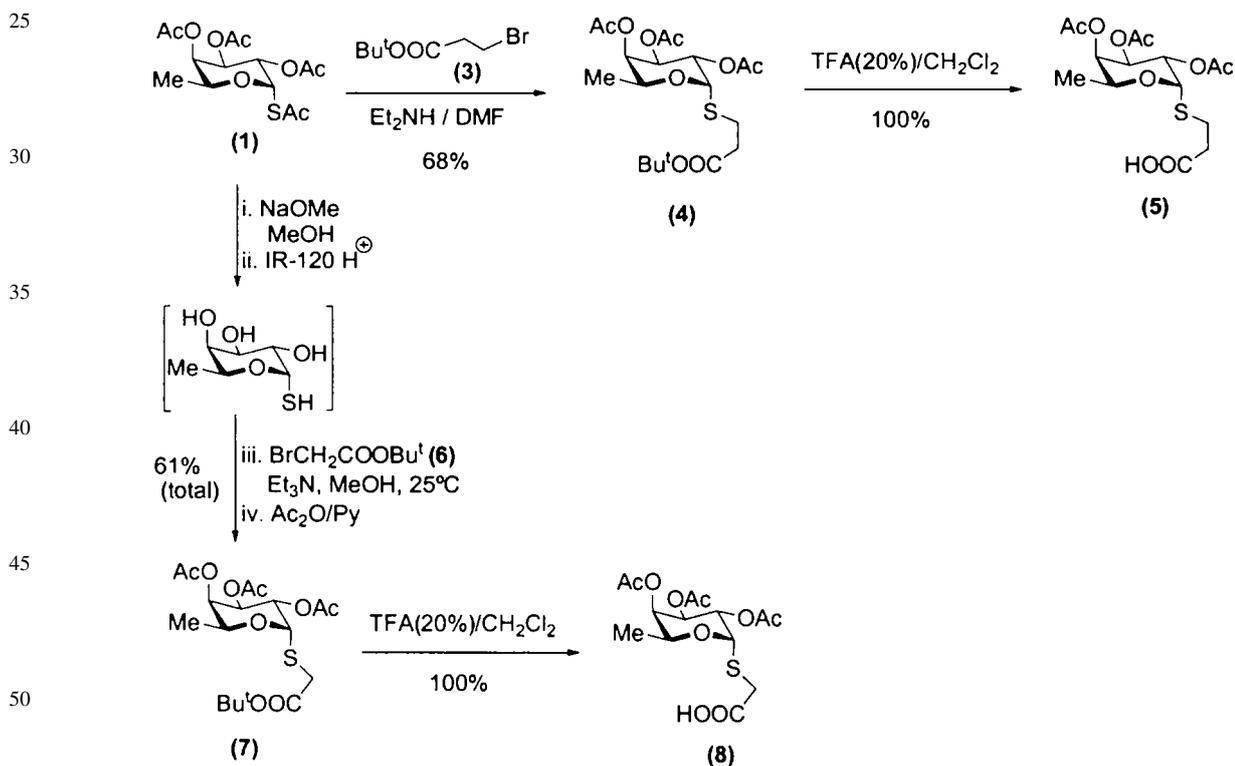
HRCIMS calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_9\text{S}$ 421.1532, encontrado 421.1521.

IR ν 2980, 1748, 1370, 1221, 1137, 1083, 1061, 967, 916 cm^{-1} .

2.3. Procedimiento general para la obtención de los bloques de síntesis (5) y (8)



20 A una disolución de los derivados (4) ó (7) (200 mg) en diclorometano (8 ml) se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Al cabo de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad originando los compuestos (5) u (8), respectivamente, de manera cuantitativa. Estos compuestos se emplearon directamente en el siguiente paso sin previa purificación.

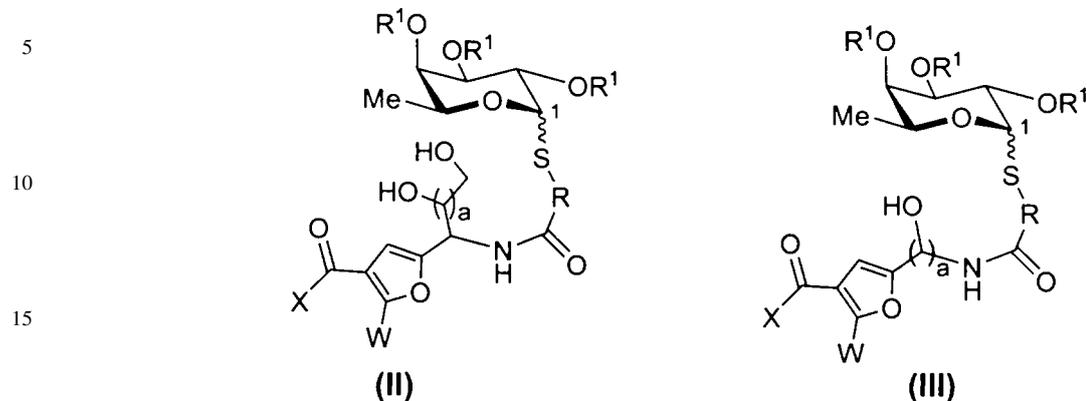


55 Esquema 2. -Preparación de los compuestos (5) y (8).

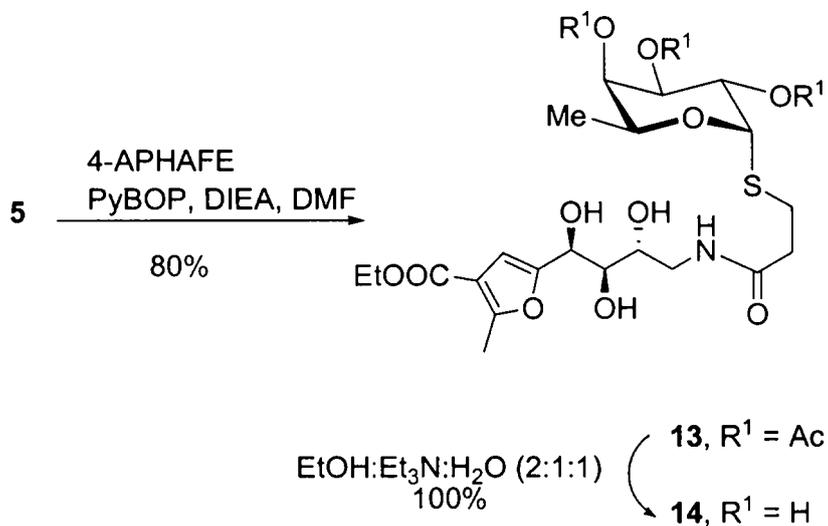
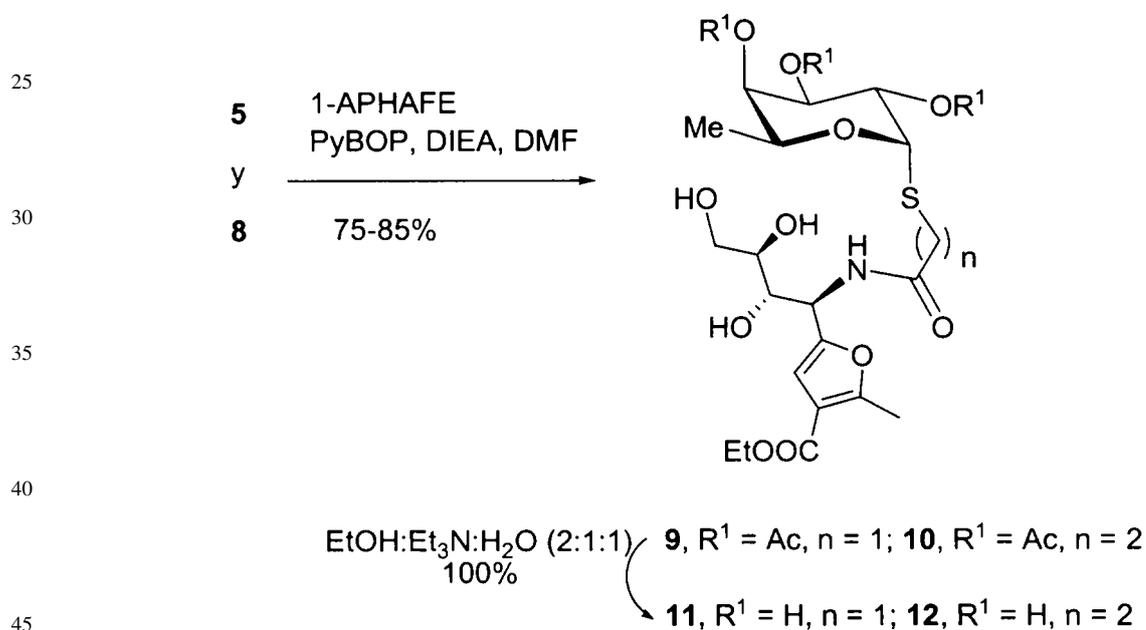
60

65

3. Procedimiento general para la obtención de los derivados de estructura general (II) y (III) ($X = OEt$, $W = Me$) a partir de los bloques de síntesis (5) y (8)



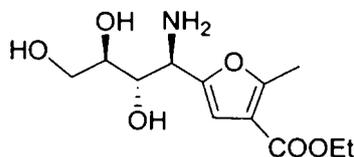
20 Cuya síntesis se describe mediante el siguiente esquema 3:



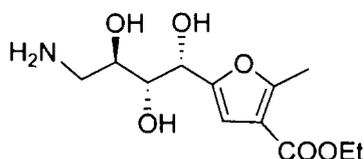
Esquema 3

Ejemplo de preparación de compuestos de fórmula general (II) (9, 10, 11 y 12) y los compuestos de fórmula general (III) (13 y 14). Los compuestos que se citan en este esquema son

1-APHAFE (L. Molina, A. J. Moreno-Vargas, A. T. Carmona, I. Robina, *Synlett*, 2006, pp. 1327), tiene la fórmula:

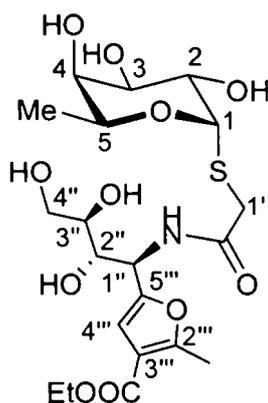


4-APHAFE (A. J. Moreno-Vargas, J. Jiménez-Barbero, I. Robina, *J. Org. Chem.* 2003, vol. 68, pp. 4138), tiene la fórmula:



Para la obtención de los compuestos de fórmula general (II) y (III) se disolvió el bloque de síntesis (5) u (8) (0.71 mmol) en DMF (5 ml) y se añadió sucesivamente el correspondiente aminopolihidroxi-alkil-furoato de etilo (0.785 mmol), (1-APHFE/4-APHFE), diisopropiletilamina (DIEA) (488 μ L, 2.856 mmoles) y PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfonio hexafluorofosfato) (404 mg, 0.785 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación se evaporó a sequedad y el residuo se diluyó con CH_2Cl_2 (50 ml) y se lavó con HCl 1 M (30 ml), con disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (30 ml) y con disolución acuosa saturada de NaCl (30 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (diclorometano:metanol, 60:1 \rightarrow 25:1) obteniéndose el derivado de estructura general (II) ($\text{R}^1=\text{COCH}_3$)/(III) ($\text{R}^1=\text{COCH}_3$) (75-90%). El derivado anterior puro (0.6 mmol) se disolvió en EtOH:Et₃N:H₂O (2:1:1, 4 ml) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad obteniéndose el correspondiente derivado de estructura general (II) ($\text{R}^1=\text{H}$)/(III) ($\text{R}^1=\text{H}$) de manera cuantitativa.

3.1. Datos del compuesto (11)



(11)

¹H-NMR (300 MHz, D₂O, 298 K, J Hz, δ ppm) δ 6.68 (s, 1H, H-4'''), 5.44 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.4$, H-1), 5.26 (d, 1H, $J_{1',2'} = 4.2$, H-1'), 4.30 (q, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$, -CH₂CH₃), 4.13 (q, 1H, $J_{5,\text{CH}} = 6.6$, H-5), 4.07 (dd, 1H, $J_{2,3} = 9.3$, H-2), 3.88 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 8.4$, H-2''), 3.79-3.69 (m, 3H, H-4''a, H-3 y H-4), 3.62 (dd, 1H, $J_{4',a,4',b} = 11.9$, $J_{4',b,3''} = 6.6$, H-4''b), 3.50 (m, 1H, H-3''), 3.48 (d, 1H, $J_{1',a,1',b} = 15.3$, H-1'a), 3.28 (d, 1H, H-1'b), 2.55 (s, 3H, CH₃-furano), 1.34 (t, 3H, -CH₂CH₃), 1.07 (d, 3H, -CH₃ de fucosa).

ES 2 325 567 B2

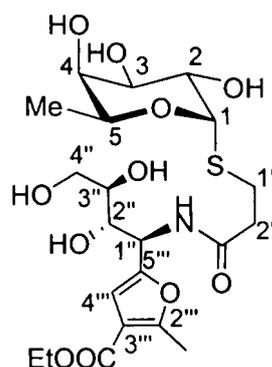
¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, 298 K, δ ppm) δ 171.9 (-COOEt), 166.3 (-CONH-), 160.3, 148.6 (C-2''', C-5'''), 113.5 (C-3'''), 109.0 (C-4'''), 86.8 (C-1), 71.9 (C-2''), 71.6 (C-4), 71.5 (C-3''), 70.1 (C-3), 67.6 (C-2 y C-5), 61.5 (-CH₂CH₃), 49.2 (C-1''), 33.7 (C-1'), 15.1 (CH₃ de fucosa), 13.4, 13.2 (-CH₂CH₃, CH₃-furano).

5 **FABMS** *m/z* 516 (60%, [M+Na]⁺).

HRFABMS calculado para C₂₀H₃₁NO₁₁SNa 516.1516, encontrado 516.1541.

3.2. Datos del compuesto (12)

10



(12)

30 $[\alpha]_D = -64$ (0.13, MeOH).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 298 K, *J* Hz, δ ppm) δ 6.61 (s, 1H, H-4'''), 5.36 (d, 1H, *J*_{1'',2''} = 4.2, H-1''), 5.34 (d, 1H, *J*_{1,2} = 5.7, H-1), 4.27 (q, 2H, ³*J*_{H,H} = 7.2, -CH₂CH₃), 4.21 (m, 1H, H-5), 4.03 (dd, 1H, *J*_{2,3} = 10.0, H-2), 3.80 (dd, 1H, *J*_{2'',3''} = 8.1, H-2''), 3.74 (dd, 1H, *J*_{4'',a,4'',b} = 11.4, *J*_{4'',a,3''} = 3.3, H-4''a), 3.63-3.54 (m, 3H, H-4''b, H-3 y H-4), 3.45 (m, 1H, H-3''), 2.82 (m, 2H, H-1'a y H-1'b), 2.57 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.54 (s, 3H, CH₃-furano), 1.33 (t, 3H, -CH₂CH₃), 1.21 (d, 3H, -CH₃ de fucosa).

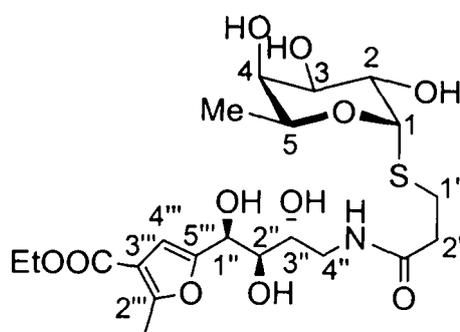
¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 298 K, δ ppm) δ 173.4 (-COOEt), 165.7 (-CONH-), 159.8, 151.6 (C-2''', C-5'''), 115.1 (C-3'''), 109.9 (C-4'''), 87.7 (C-1), 74.3 (C-2''), 73.4 (C-4), 73.3 (C-3''), 72.4 (C-3), 69.5 (C-2), 68.2 (C-5), 64.6 (C-4''), 61.3 (-CH₂CH₃), 50.4 (C-1''), 37.3 (C-2'), 26.9 (C-1'), 16.6 (CH₃ de fucosa), 14.7 (-CH₂CH₃), 13.9 (CH₃-furan).

FABMS *m/z* 530 (70%, [M+Na]⁺).

45 **HRCIMS** calculado para C₂₁H₃₄NO₁₁S 508.1853, encontrado 508.1871.

3.3. Datos del compuesto (14)

50



(14)

65 $[\alpha]_D = -89$ (c 0.8, MeOH).

ES 2 325 567 B2

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 298 K, J Hz, δ ppm) δ 6.60 (s, 1H, H-4'''), 5.37 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.6$, H-1), 4.87 (d bajo H₂O, 1H, H-1''), 4.28 (q, 2H, $J = 7.1$, -CH₂CH₃), 4.25 (m, 1H, H-5), 4.05 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.1$, H-2), 3.78 (m, 1H, H-3''), 3.68 (m, 2H, H-2'' y H-4), 3.58 (m, 2H, H-4''a y H-3), 3.35 (dd bajo CD₃OD, 1H, $J_{4''b,3''} = 6.6$, H-4''b), 2.82 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.58 (t, $J_{3'a,2'a} = J_{3'a,2'b} = J_{3'b,2'a} = J_{3'b,2'b} = 7.1$, H-3'a y H-3'b), 2.55 (s, 3H, CH₃ de furano), 1.35 (t, 2H, -CH₂CH₃), 1.24 (d, 3H, $J_{5,CH} = 6.7$, CH₃ de fucosa).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 298 K, δ ppm) δ 173.7 (COOEt), 164.3 (C-1'), 158.2, 154.0 (C-2''', C-5'''), 113.7 (C-3'''), 107.1 (C-4'''), 86.2 (C-1), 73.4, 72.0 (C-2'', C-4), 71.0 (C-2), 69.8 (C-3''), 68.1 (C-2), 66.8 (C-5), 66.3 (C-1''), 59.9 (C-1''), 42.6 (C-4''), 35.9 (C-3'), 25.6 (C-2'), 15.2 (CH₃ de fucosa), 13.2 (-CH₂CH₃), 12.4 (CH₃ de furano).

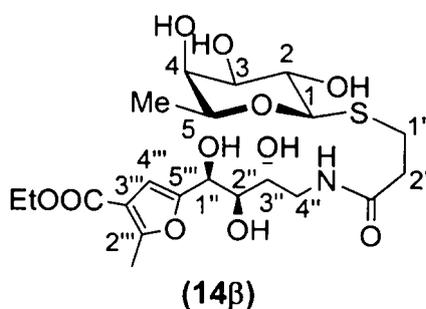
FABMS m/z 530 (45%, [M+Na]⁺).

HRCIMS calculado para C₂₁H₃₄NO₁₁S 508.1853, encontrado 508.1840.

4. Preparación de los compuestos epímeros en C1 (anómeros β)

Los compuestos (4 β), (5 β), (7 β), (8 β), (9 β), (10 β), (11 β), (12 β), (13 β) y (14 β), se obtuvieron siguiendo los mismos procedimientos descritos en las anteriores síntesis, pero partiendo del compuesto (2) en vez del compuesto (1).

Como ejemplo, el compuesto (14β):



El procedimiento seguido para la síntesis este compuesto (14β) es análogo al seguido en la síntesis de su epímero (14), excepto que se empleó el compuesto (2) como producto de partida para la síntesis.

$[\alpha]_D = +15$ (c 0.4, MeOH).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 298 K, J Hz, δ ppm) δ 6.49 (s, 1H, H-4'''), 4.77 (d, 1H, $J_{1'',2''} = 2.4$, H-1''), 4.22 (d, 1H, $J_{1,2} = 9$, H-1), 4.16 (q, 2H, $J = 6.9$, -CH₂CH₃), 3.66 (m, 1H, H-3''), 3.56 (dd, 1H, $J_{2'',3''} = 6.9$, H-2''), 3.54 (m, 2H, H-3 y H-5), 3.47 (dd, 1H, $J_{4''a,4''b} = 14.1$, $J_{4''a,3''} = 3.3$, H-4''a), 3.39 (d, 1H, H-2), 3.35 (dd, 1H, J , H-4), 4.05 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.1$, H-2), 3.78 (m, 1H, H-3''), 3.68 (m, 2H, H-2'' y H-4), 3.23 (dd bajo CD₃OD, 1H, H-4''b), 2.84 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.49 (t, $J_{3'a,2'a} = J_{3'a,2'b} = J_{3'b,2'a} = J_{3'b,2'b} = 7.2$, H-3'a y H-3'b), 2.44 (s, 3H, CH₃ de furano), 1.23 (t, 3H, -CH₂CH₃), 1.16 (d, 3H, $J_{CH,H-5} = 6.6$, CH₃ de fucosa).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 298 K, δ ppm) δ 175.7 (COOEt), 166.2 (C-1'), 160.0, 155.9 (C-2''', C-5'''), 115.6 (C-3'''), 109.0 (C-4'''), 87.9 (C-1), 76.9, 76.6 (C-3, C-4), 75.3 (C-2''), 73.7 (C-5), 71.6, 71.5 (C-3'', C-2), 68.2 (C-1''), 61.8 (-CH₂CH₃), 44.5 (C-4''), 38.5 (C-3'), 27.5 (C-2'), 17.6 (CH₃ de fucosa), 15.1 (-CH₂CH₃), 14.3 (CH₃ de furano).

HRFABMS calculado para C₂₁H₃₃NO₁₁SNa 530.1672, encontrado 530.1679.

Ejemplo 2

Medidas biológicas

2.A. -Afinidad frente a selectinas

Método

SLex-BSA 2.3 μg/ml ó PSGL1/IgG quimera 5 μg/ml se incubaron en 96-celdillas a 4°C, se lavaron con PBS 0.1%BSA 0.05%Tween-20 y entonces se inmovilizaron con PBS-BSA 2% durante 2 h a 37°C. Después del lavado, las celdas se incuban durante 4h a temperatura ambiente con E-selectina/μ (1 U_g/ml) ó P-selectina/μ(5 μg/ml) precomplejada con inmunoglobulina biotinilada de macho cabrío anti-humana IgM (0.5 μg/ml) y estreptavidina-HRPO (0.6 μg/ml) en presencia del compuesto que se analiza. Después de repetidos lavados, la unión o anclaje a la selectina se revela con hidrócloruro de *o*-fenilendiamina (0.67 mg/ml, Sigma) en presencia de 0.16% H₂O₂. La reacción se paró con H₂SO₄ 3 M. OD se leyó a 490 nm.

ES 2 325 567 B2

Los valores de IC_{50} (Rango de afinidad frente a selectinas) se calcularon usando el programa Prism de GraphPad®.

Con este protocolo el SLex natural presentó IC_{50} de 0.7 mM frente a E-selectinas, siendo inactivo frente a P-selectinas.

5

2.B.- Cáncer

Protocolo de los ensayos de citotoxicidad

10

1.- Líneas celulares

Las líneas celulares humanas se obtuvieron de ATCC (American Type Culture Collection):

A-549, cáncer de pulmón - ATCC # CCL-185

15

HT-29, adenocarcinoma de colon - ATCC # HTB-38

MDA-MB 231, adenocarcinoma de mama- ATCC # HTB-26

20

2.- Cultivo celular

25

Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) en un medio de cultivo suplementado con 10% FBS (serum de feto de buey), 2 mM L-glutamina y 100 Unidad/mL penicilina y estreptomina a 37°C y 5% CO₂. Los cultivos por triplicado se incubaron durante 72 horas en presencia y en ausencia de los compuestos a analizar (a 10 concentraciones típicamente comprendidas entre 10 a 0.0026 µg/mL).

30

3.- Medidas de citotoxicidad (SRB)

Siguiendo un método descrito previamente (Skehan, P. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, vol. 82, pp. 1107-1112), se utilizó un ensayo colorimétrico basado en el uso de sulforodamina B, el cual fue adaptado para medidas cuantitativas de crecimiento celular y viabilidad.

35

GI_{50} es la concentración que origina la inhibición del 50% de crecimiento.

2.C.- Evaluación biológica

40

Los valores de inhibición frente a E- y P-selectinas y frente al cáncer en líneas celulares, de algunos de los derivados se muestran a continuación

TABLA 1

Valores de IC_{50} (mM) medidos para la afinidad de los miméticos de SLe^x, compuestos (11) - (14β) hacia E- y P-Selectinas. Para las medidas se utilizó el Test ELISA

45

	11	12	14	14β
E-Selectina	2.8	3.0	2.4	5.7
P-Selectina	2.5	2.6	2.2	5.1

55

TABLA 2

Valores de GI_{50} (µM) para la actividad anticáncer del compuesto (11)

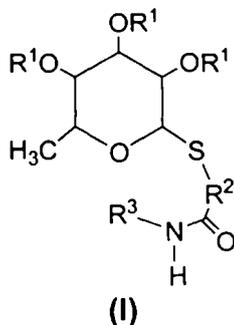
60

	Cáncer de mama	NSCLC (pulmón)	Cáncer de colon
11	18.5 µM	-	-

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales:

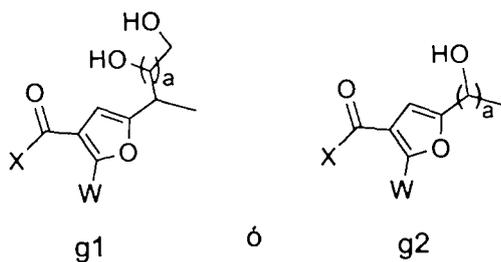


donde:

R¹ se selecciona de entre hidrógeno o un grupo -COCH₃;

R² se selecciona del grupo que comprende alquilo C₁-C₆, sustituido o no sustituido, cicloalquilo C₃-C₆, sustituido o no sustituido, ó arilo C₆-C₁₂, sustituido o no sustituido;

R³ se selecciona de entre cualquiera de los grupos (g1) ó (g2) siguientes:



donde:

X es un grupo -OR⁴ ó un grupo -NHR⁴; y R⁴ se selecciona de entre hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo;

W es un grupo -(CH₂)_b-CH₃, donde "b" tiene los valores de entre 0 y 9; y

"a" tiene los valores 1, 2 ó 3.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R³ es el grupo g1.

3. Compuesto según la reivindicación 1, donde R³ es el grupo g2.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R¹ es hidrógeno.

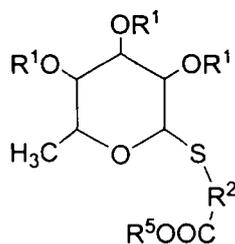
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R² es grupo metilo o etilo.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde "b" tiene el valor de 0.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R⁴ es un grupo etilo.

ES 2 325 567 B2

8. Método de obtención del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende el acoplamiento de los compuestos de fórmula general (IV)



(IV)

con derivados de aminopolihidroxialquilfuroilo. Donde R⁵ es H o un grupo protector y R¹ y R² son los descritos anteriormente.

9. Método según la reivindicación 8, donde el acoplamiento se produce entre el grupo amino sustituido en la cadena poliólica y el carbono más próximo al grupo furano cuando R³ es el grupo g1 o el carbono más alejado al grupo furano cuando R³ es el grupo g2.

10. Compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso como medicamento.

11. Compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursen con afinidad frente a a E- y P-selectinas.

12. Compuesto según la reivindicación anterior donde las enfermedades son seleccionadas entre en grupo que comprende procesos inflamatorios, cáncer, artritis, trombosis, dermatitis, inflamaciones pulmonares o afecciones cardíacas.

13. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, como agente anticancerígeno en un rango de concentración μ M.

14. Uso del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursen con afinidad frente a a E- y P-selectina.

15. Uso del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, como productos miméticos del sialil Lewis X (S_{Lex}).

16. Composición farmacéutica que comprende cualquier compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, además de un vehículo farmacéuticamente aceptable.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 325 567

② Nº de solicitud: 200703050

③ Fecha de presentación de la solicitud: 14.11.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5614615 A (WONG) 25.03.1997, reivindicaciones.	1-16
A	US 6111084 A (WONG et al.) 29.08.2000, reivindicaciones.	1-16
A	WO 9629339 A1 (SANDOZ y THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 26.09.1996, resumen; reivindicación 1.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.08.2009

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 15/26 (2006.01)

C07H 5/10 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC,WPI,CAS

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200703050

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.08.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 5614615 A	25.03.1997
D02	US 6111084 A	29.08.2000

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a los tiofucósidos de fórmula general I (reivindicación 1), al procedimiento de obtención de dichos compuestos y a la composición farmacéutica que los comprende.

Los documentos D1 y D2 divulgan fucopéptidos miméticos de Sialil Lewis X, los compuestos descritos en la solicitud difieren formalmente de los divulgados en D1 y D2, por lo que se considera que la invención es nueva y tiene actividad inventiva, de acuerdo con los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.