

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

ES

11

21

23

NUMERO
480.211
FECHA DE PRESENTACION
10 ABRIL 1979

A1

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

**PATENTE DE INVENCION**

50 PRIORIDADES: 51 NUMERO	52 FECHA	53 PAIS
78 10558	10 Abril 1978	Francia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	61 CLASIFICACION INTERNACIONAL G07H; G01N	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA ---
------------------------	--	---

64 TITULO DE LA INVENCION
"Procedimiento de preparación de derivados de óxidos"

71 SOLICITANTE (S)
AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
13, rue Madeleine Michelis, 92522 Neuilly-sur-Seine, Francia

72 INVENTOR (ES)
Pierre Sinay, Jean-Claude Jacquinet y Jean-René Pougny

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
M. Curell Suñol

FZ/SH-0102-79-05-"D.14672"  
EX-FR-II

P A T E N T E   D E   I N V E N C I O N

por VEINTE años

5. solicitada en España a favor de AGENCE NATIONALE DE VALORISATION DE LA RECHERCHE (ANVAR), de nacionalidad francesa, domiciliada en 13, rue Madeleine Michelis, 92522 Neuilly-sur-Seine, Francia, por "Procedimiento de preparación de derivados de óxidos", con prioridad de la solicitud francesa 78 10558 de fecha 10 Abril 1978. - - - - -

MEMORIA DESCRIPTIVA

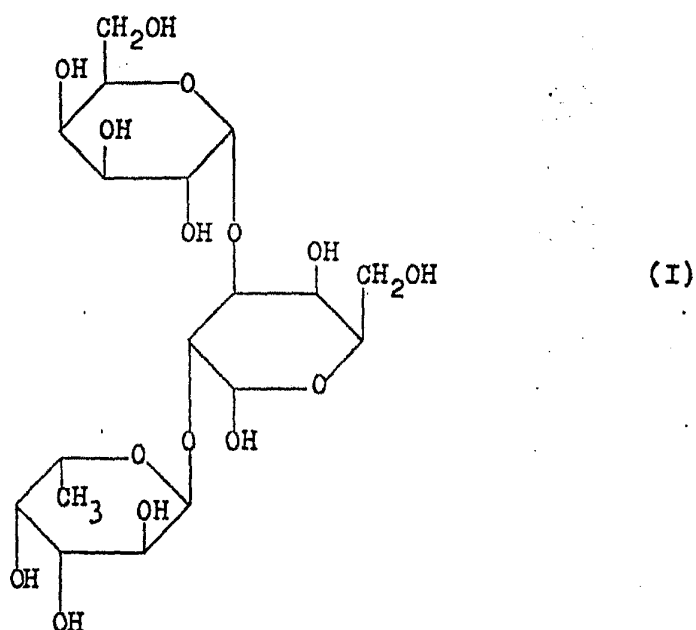
10. La presente invención tiene por objeto un nuevo procedimiento de preparación de derivados de óxidos. - - - -

15. El estudio de los derivados de óxidos, es decir de derivados que comprenden varias funciones osas o monosacáridos, suscita un gran interés: un cierto número de entre ellos se han revelado, en efecto, biológicamente y químicamente activos o capaces de conducir a tales sustancias activas. - - - - -

Entre otros, se ha comprobado que algunos tri y te

trasacáridos poseen una especificidad de grupo sanguíneo. -

Así, el trisacárido 2-O-(alfa-L-fucopiranosil)-3-O-(alfa-D-galactopiranosil)-D-galactopiranososa de fórmula I:



5. constituye el determinante antigénico B de grupo sanguíneo humano. En razón de esta especificidad antigénica, este trisacárido (denominado a continuación trisacárido B) encuentra aplicaciones de gran importancia en diversos sectores biológicos, en particular en inmunohematología y más especialmente en la determinación de los grupos sanguíneos. - - - - -

10. Pero estas diversas aplicaciones solamente pueden ser utilizadas en gran escala si se puede disponer fácilmente y con rendimientos elevados del trisacárido B o de deriva

dos osídicos que posean su estructura. - - - - -

- Además del problema de la síntesis de estos productos se plantea el de la forma bajo la cual se obtienen. Se destacará a este efecto que, según el tipo de aplicación prevista, el derivado de óxido con especificidad antigénica podrá ser utilizado tal cual, por ejemplo como reactivo antigénico o para elaborar un suero-test o deberá comprender una cadena de sustitución, más particularmente, un brazo de acoplamiento a fin de ser fijado sobre un soporte, y ello para constituir más especialmente un antígeno artificial o un in-munoabsorbente. - - - - -
- 5.
- 10.

El problema es, por tanto, disponer de un derivado osídico a partir del cual las diversas aplicaciones deseadas podrán ser fácilmente realizadas. - - - - -

- 15.
- Ahora bien, los métodos propuestos hasta el presente para la síntesis de derivados osídicos constituyen unos determinantes antigénicos de grupo sanguíneo y los rendimientos a los cuales conducen no resultan completamente satisfactorios. - - - - -

- 20.
- Además, los productos obtenidos no pueden ser fácilmente modificados con el fin de su utilización en una aplicación dada. - - - - -

El estudio de estos problemas por los inventores

les ha conducido a la elaboración de una nueva vía de síntesis estereoespecífica que permita obtener fácilmente, con una excelente pureza y rendimientos elevados, unos derivados de ósidos que abren la vía a numerosas aplicaciones biológicas. De una manera particularmente ventajosa, esta vía de síntesis permite obtener unos ósidos ramificados, es decir con cadenas osídicas laterales, tal como el trisacárido B.

5. El interés de esta nueva vía de síntesis es tanto más apreciado dado que conduce a la obtención de nuevos derivados de ósidos, en particular de derivados de sustitución del trisacárido B, utilizables particularmente en las aplicaciones biológicas evocadas más arriba.

10. De manera ventajosa, se revela que estos nuevos derivados, gracias a sus características químicas propias, facilitan la realización de estas aplicaciones, en particular pueden ser fácilmente modificados según la aplicación deseada o incluso directamente utilizables.

15. La invención tiene por tanto por objeto proporcionar un nuevo procedimiento de síntesis de derivados de ósidos que permitan disponer fácilmente de grandes cantidades de ósidos y particularmente de ósidos ramificados tales como el trisacárido B o unos derivados de sustitución de este último.

20. Según otro aspecto, la invención tiene por objeto

proporcionar nuevos ósidos, en particular nuevos derivados de di y trisacáridos, y más especialmente de los derivados de ósidos que posean la estructura del trisacárido B. - - -

El procedimiento de síntesis de derivados de ósi-

5. dos según la invención está caracterizado porque se hace reaccionar un derivado de ósido a) constituido por una o varias funciones osas, eventualmente fijada(s) a un resto orgánico, siendo substituida esta función osa, o una por lo menos de estas funciones osas, en el carbono anómero en posición 1, por un grupo -O-imidilo de fórmula  $-O-C(-R_2)=N-R_1$  en la cual los substituyentes  $R_1$  y  $R_2$ , idénticos o diferentes el uno del otro, representan un radical alcofio o arilo, preferentemente un radical alcofio que comprende de 1 a 4 átomos de carbono, estando los grupos -OH del derivado de ósido protegidos por unos grupos apropiados, con un derivado de ósido b) constituido por una o varias funciones osas, eventualmente fijada(s) a un resto orgánico, estando libre un solo grupo -OH de esta o estas funciones osas y ocupando una cualquiera de las posiciones hidroxilo secundario 1 a 4, comprendiendo los derivados de ósidos a) y/o b) una función con por lo menos dos osas. - - - - -
- 10.
- 15.
- 20.

Un procedimiento de este tipo es ventajosamente utilizado para la síntesis de derivados que comprenden ósidos ramificados. - - - - -

25. A este efecto, se procede a la reacción del deriva

do a), definido más arriba, con un derivado de ósido constituido por una o varias funciones osas, eventualmente fijada(s) a un resto orgánico, estando libre un solo grupo -OH de esta o estas funciones y ocupando una posición hidroxilo 1 a 4 ó 6 que permita la formación de una cadena osídica ramificada. - - - - -

5. Esta reacción es ventajosamente utilizable para la síntesis de un derivado de ósido constituido por un trisacárido ramificado o que comprende, fijado por ejemplo a un resto orgánico, dicho trisacárido ramificado. - - - - -

10. Según un modo preferido de realización de la invención, que abre la vía particularmente para la obtención de substancias con propiedades antigénicas, se utiliza, en las diversas formas de ejecución del procedimiento anterior, un derivado de ósido a) constituido por una función galactopiranososa, o una función fucopiranososa, substituida en posición 1 por un grupo O-imidilo tal como el definido anteriormente. -

15. Según una disposición complementaria, el derivado de ósido b) comprende una función osa que presenta en posición 1 una substitución -OA constituida por un grupo funcional, no reactivo en las condiciones de la síntesis osídica, o hecho no reactivo, o por un grupo funcionalizable, es decir que permita en el curso o al final de la síntesis la introducción de grupos funcionales. - - - - -

20.

Se trata por ello esencialmente de disponer en posición 1 de un grupo que permita aprovechar fácilmente las propiedades de los óxidos obtenidos y ello en las diversas aplicaciones biológicas de las que se habla más adelante. -

5. Grupos A particularmente apropiados están constituidos por unos radicales que comprenden uno o varios enlaces insaturados, tales como los radicales etilénicamente insaturados. Preferentemente, A representa entonces un radical alcenilo que comprende de 2 a 10 átomos de carbono. - - - -

10. A representa también unos radicales a los cuales puede dar lugar, según las técnicas clásicas de síntesis orgánica, la funcionalización del o de los enlaces insaturados en cuestión. Unos radicales de este último tipo están por ejemplo constituidos por unos radicales alcofio, que comprenden en particular de 2 a 10 átomos de carbono, y substituidos por lo menos por un grupo -OH que, en caso necesario, está protegido por un grupo de bloqueo o introducido en un radical funcional. - - - - -

20. Estará también constituido por un grupo funcional que contenga por lo menos un radical éter y/o amina. - - - -

Más especialmente, es ventajoso utilizar en el procedimiento de la invención unos derivados de óxidos b) en los cuales el grupo hidroxilo en posición 1 está substituido por un radical O-alilo, dado que este grupo abre la vía a la

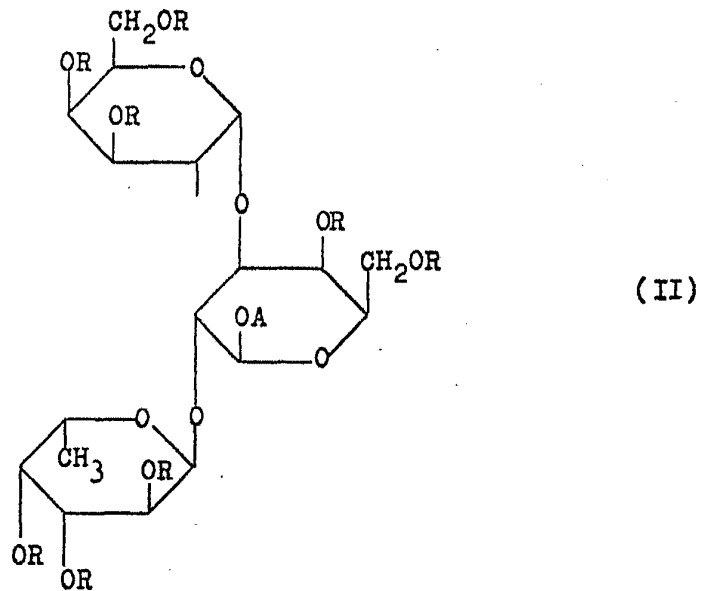
introducción de un gran número de grupos químicos. - - - - -

Unos derivados b) que responden a las características anteriores y comprenden una función galactopiranososa y/o fucopiranososa se prefieren particularmente para la realización de los productos de la invención. - - - - -

5.

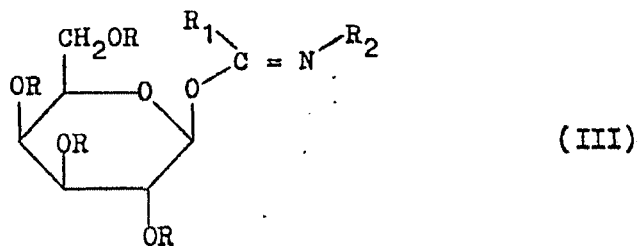
Para preparar, de acuerdo con el modo de realización preferido anterior, un derivado de trisacárido ramificado que comprende un encadenamiento galactopiranososa-galactopiranososa-fucopiranososa y que responda más especialmente a la estructura II: - - - - -

10.

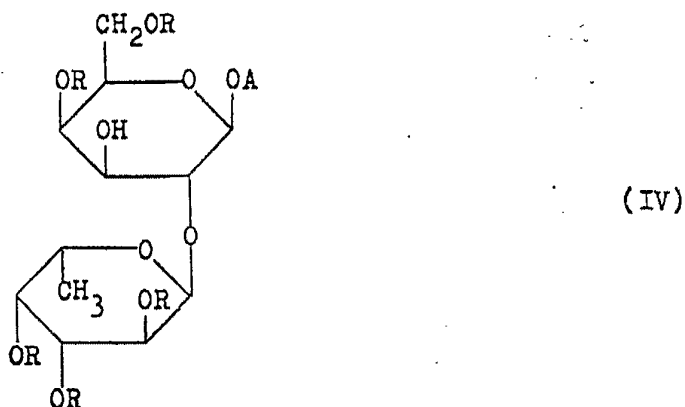


se hace reaccionar - - - - -

- una 1-O-imidil-beta-D-galactopiranososa de fórmula III: - -



con un disacárido constituido por una fuco-galactopiranososa que comprende un grupo -OH libre en posición 3 de la función galactopiranososa, respondiendo este disacárido a la fórmula IV: - - - - -



5. En estas fórmulas, - - - - -

- los substituyentes R, idénticos o diferentes los unos de los otros, representan unos grupos de protección de radicales hidroxilo, en caso necesario con un substituyente vecino, y se eligen entre unos grupos estables, no reactivos, en las condiciones habituales de síntesis osídica y fácilmente eliminables en condiciones suaves compatibles con el mantenimiento de la estructura osídica, en particular por unos gru-

10.

pos que constituyen con el átomo de oxígeno del hidroxilo unos éteres bencílicos o unos acetales bencilidénicos, - - - - -

- A representa un resto orgánico tal como el definido anteriormente, y - - - - -

5. - R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan las significaciones dadas más arriba.

Preferentemente, el sustituyente A del disacárido de fórmula IV está constituido por un radical etilénicamente insaturado elegido entre los radicales alcenilo, que comprenden preferentemente 2 a 10 átomos de carbono. - - - - -

10. A puede estar también constituido por un radical alcoflo, substituido por lo menos por un grupo -OH que, en caso necesario, es protegido por un grupo de bloqueo o introducido en un radical funcional. - - - - -

- De manera particularmente preferida, se recurre a unos grupos R que representan un radical bencilo y, para las posiciones 4 y 6, un radical bencilideno, y se elige como sustituyente A un radical alilo. - - - - -
- 15.

- La elección de estas significaciones para R y A ofrece la posibilidad de eliminar A independientemente de R o de tratarlo, sin que R sea tocado y modificarlo en un grupo que permita la utilización del derivado en una aplicación biológica dada. Así, se puede transformar el grupo alilo representado por A, en particular, en un grupo beta-hidroxieti
- 20.

lo por ejemplo bajo la acción de tetróxido de osmio y de peryodato de sodio, cuyo interés en las aplicaciones biológicas de los productos formados será subrayado a continuación. Se dispone en consecuencia de amplio margen para eliminar los grupos R cuando se desea. - - - - -

5.

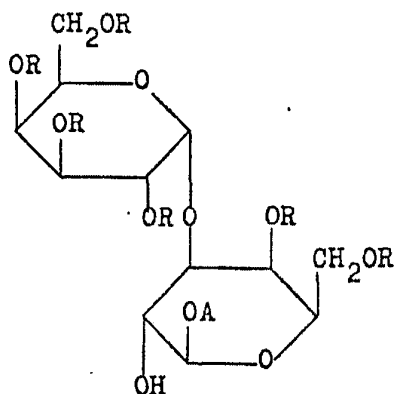
Entre las amplias posibilidades de tratamiento del grupo alilo, se mencionarán aún, a título de ejemplo, su transformación por hidroboração en un grupo gamma-hidroxi-propilo. - - - - -

10.

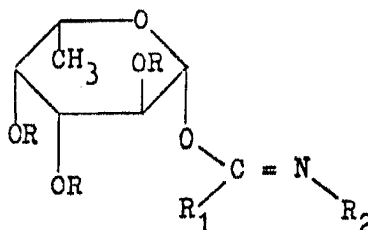
Además, dichas cadenas pueden ser tratadas para la introducción de un grupo alilo que permita por tanto la articulación de un gran número de reacciones y la creación de cadenas de sustitución con carácter hidrófilo, preciosas para las aplicaciones buscadas. - - - - -

15.

Según una variante, para preparar el derivado de trisacárido de fórmula II, se utiliza, como disacárido, una digalactopiranososa, que comprende un grupo -OH libre en posición 2 de una de las funciones galactopiranososa, y que responde a la fórmula: - - - - -



y se efectúa su condensación con el grupo -O-imidilo de una 1-O-imidil-beta-L-fucopiranososa de fórmula VI: - - - - -



En estas fórmulas V y VI,  $\underline{R}$ ,  $\underline{R}_1$ ,  $\underline{R}_2$  y  $\underline{A}$  presentan las significaciones dadas más arriba. - - - - -

5. La utilización de este procedimiento de síntesis conduce a la obtención, con un rendimiento elevado, de funciones trisacáridos que posean la estereoespecificidad deseada. - - - - -

10. Las condensaciones del procedimiento de la invención se realizan ventajosamente en condiciones anhidras y a temperatura ambiente. - - - - -

Se operará en presencia de un ácido fuerte, poco nucleófilo y en un solvente débilmente nucleófilo e inerte frente a los productos de reacción. - - - - -

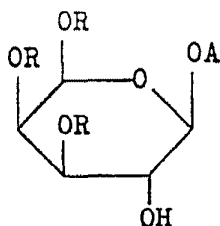
15. De manera ventajosa se recurre, como ácido, al ácido p-toluensulfónico anhidro. - - - - -

En cuanto al solvente, está ventajosamente consti-

tuido por benceno, éter y más especialmente por nitrometano.

5. Los disacáridos utilizados en las reacciones de condensaciones anteriores son unos productos nuevos que constituyen, en el marco de la invención, unos intermedios de síntesis. Estos disacáridos se preparan ventajosamente según un procedimiento que surge del mismo principio que estas condensaciones. - - - - -

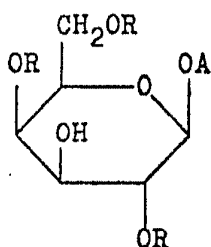
10. Así, para obtener la fuco-galactopiranososa de fórmula IV, se hace reaccionar ventajosamente una galactopiranososa que comprende un grupo -OH libre en posición 2 y que responde a la fórmula VII: - - - - -



(VII)

15. con una fucopiranososa de fórmula VI dada anteriormente, y después se procede a la eliminación del grupo R en posición 3, en la función osa que proviene de la galactopiranososa VI, según las técnicas clásicas para el grupo de bloqueo representado por R. - - - - -

Asimismo, la digalactopiranososa de fórmula V se obtiene ventajosamente por reacción de la galactopiranososa de fórmula VIII, que comprende un grupo -OH libre en posición 3, - -



(VIII)

con una 1-O-imidil-galactopiranososa de fórmula III anterior. El disacárido así obtenido es a continuación tratado, según los métodos clásicos, de manera que se elimine el grupo R en posición 2 en la función osa que proviene de la galactopiranososa VIII. -----

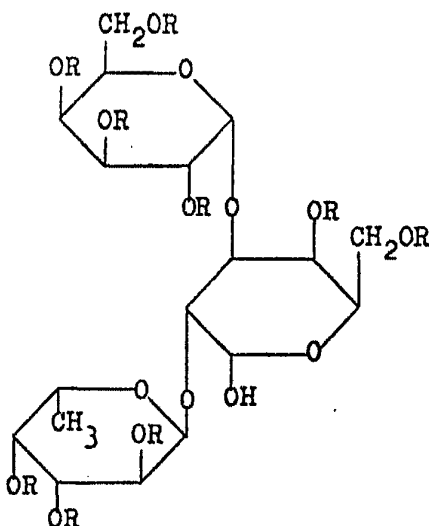
5.

Según un aspecto de la invención que reviste un gran interés, el procedimiento anterior permite la síntesis total del trisacárido B. -----

10.

A este fin, después de haber efectuado las condensaciones entre el disacárido de fórmula IV ó V y, respectivamente, el monosacárido de fórmula III ó VI, se procede a la eliminación secuencial, en condiciones suaves según las técnicas clásicas, del sustituyente A del producto de estructura II obtenido, lo que conduce a un producto de estructura IX: -----

15.



(IX)

cuya hidrogenólisis permite obtener el trisacárido B. - - -

Cada una de las etapas del procedimiento de síntesis de la invención se caracteriza por un rendimiento elevado. Su utilización permite así obtener cantidades importantes de trisacárido B o de trisacáridos substituidos. - - - -

5.

La puesta a punto del procedimiento evocado anteriormente conduce, según otro aspecto de la invención de gran interés, a la elaboración de nuevos derivados de ósidos.

10.

El estudio de estos nuevos derivados ha demostrado que constituyen, gracias a sus características químicas, unas substancias de síntesis análogas a los antígenos B de grupo sanguíneo; de manera ventajosa, estos derivados abren también la vía a la obtención de productos antigénicos. - - - -

15.

Los nuevos ósidos de la invención comprenden por lo menos una función galactopiranososa en la cual el átomo de hidrógeno del grupo -OH en posición 1 está substituido por un radical A que representa un grupo alcoilo substituido por lo menos por un grupo hidroxilo, en caso necesario protegido por un grupo de bloqueo o introducido en un radical funcional, o incluso un grupo que comprende uno o varios enlaces

20.

insaturados, en particular un radical etilénicamente insaturado elegido entre los radicales alcenilo, y más especialmente los radicales alcenilo con 2 a 10 átomos de carbono, pudiendo comprender A además, uno o varios grupos éter y/o ami

na. - - - - -

5. En un grupo preferido de derivados de óxidos según la invención, A representa un radical alcoflo que comprende de 2 a 10 átomos de carbono substituido por lo menos por un grupo hidroxilo, y ventajosamente elegido entre los radicales alcoilenglicol o hidroxialcoflo. - - - - -

10. Los grupos en los cuales A representa un grupo alfa-betadihidroxipropilo, betahidroxietilo o gamma-hidroxipropilo constituyen reactivos biológicos y son especialmente interesantes en las aplicaciones biológicas que hacen intervenir su fijación sobre una proteína o un soporte insoluble, por ejemplo para la constitución de un inmunoabsorbente. - -

15. En otro grupo preferido de derivados de óxidos según la invención, A representa un radical alcenilo que comprende de 2 a 10 átomos de carbono, en particular un radical alilo. La reactividad de este radical se revela muy especialmente ventajosa en la conducción de la síntesis osídica propiamente dicha, en la medida en que A puede ser tratado independientemente de los grupos de bloqueo utilizados para los grupos hidroxilo de las funciones osas. El interés de la significación alilo de A reside también en el juego de posibilidades ofrecido para la introducción de un grupo funcional dado según las aplicaciones previstas. Además, se notará que el derivado alílico puede ser utilizado tal cual como reactivo biológico, por ejemplo para neutralizar las hemolisinas.

20.

25.

Otros compuestos preferidos de la invención comprenden un grupo A que presenta por lo menos una función éter y por lo menos un grupo etilénicamente insaturado, ventajosamente un grupo alilo. En este grupo de productos, A puede representar, por ejemplo, una cadena alcoxi-alcenilo y en particular alcoxi-alilo, comprendiendo el grupo alcoxi un número variable de átomos de carbono, generalmente inferior a 10 y más especialmente del orden de 3. - - - - -

5.

En otro grupo de compuestos, A es una cadena de substitución del tipo alcoxi-alcohol, alcoxi-éster o amida, alcoxi-alcoilamina o alcoxi-ácido carboxílico, pudiendo comprender estos diferentes grupos químicos, además, una función amina intermedia. - - - - -

10.

Las funciones galactopiranosas definidas anteriormente están ventajosamente implicadas en una cadena trisacárida lineal o ramificada que comprende una función fucopiranososa u otra función galactopiranososa. - - - - -

15.

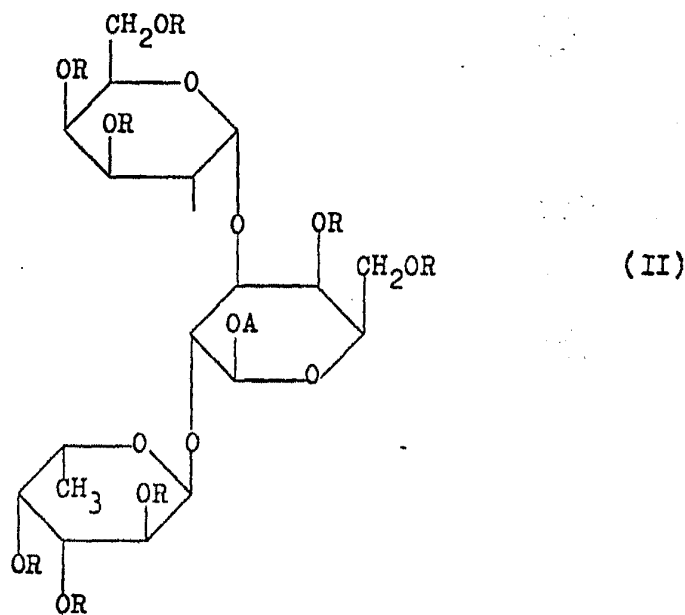
En estas cadenas trisacáridas, los grupos hidroxilo de las diferentes funciones osas están libres o protegidos por unos grupos de bloqueo elegidos entre unos grupos estables, no reactivos en las condiciones habituales de síntesis osídica y fácilmente eliminables en condiciones suaves compatibles con el mantenimiento de la estructura osídica. -

20.

Se prefieren los trisacáridos que responden a las

características definidas anteriormente, y más especialmente los trisacáridos ramificados constituidos por una función galactopiranososa, que comprende un sustituyente A tal como el evocado anteriormente, simultáneamente substituido por otra función galactopiranososa y por una función fucopiranososa. - -

En particular, la invención prevé los trisacáridos ramificados de fórmula II - - - - -



en la cual - - - - -

10. - los sustituyentes R, idénticos o diferentes los unos de los otros, representan, en caso necesario con un sustituyente vecino, unos grupos de protección de radicales hidroxilo y se eligen entre unos grupos estables, no reactivos en las condiciones habituales de síntesis osídica y fácilmente eli-

minables, en condiciones suaves compatibles con el mantenimiento de la estructura osídica, en particular por unos grupos bencilo o bencilidenilo, o representan un átomo de hidrógeno. - - - - -

- 5. - A representa un resto orgánico que comprende por lo menos un grupo funcionalizable y constituido por un radical etilénicamente insaturado elegido entre los radicales alcenilo, preferentemente de 2 a 10 átomos de carbono, y más particularmente constituido por el radical alilo, o incluso por un radical hidroxialcofílo, más especialmente beta o gamma-hidroxialcofílo en el cual el grupo -OH está eventualmente protegido, o un radical alcoxi-alcenilo, alcoxi-alcohol, alcoxi-éster, alcoxi-alcoilamina o amida, o alcoxi-ácido carboxílico, pudiendo comprender estos diferentes grupos químicos, además, una función amina intermedia. - - - - -
- 10.
- 15.

Como se ha indicado anteriormente, estos nuevos ósidos son ellos mismos o constituyen unos intermedios de gran interés para la obtención de productos con propiedades de grupos sanguíneos, en particular el trisacárido B o de compuestos que presentan su estructura. - - - - -

- 20.
- 25. La invención proporciona por tanto los medios que permiten obtener unos homólogos de síntesis de antígeno B. La invención proporciona también unos productos que constituyen dichos homólogos. Los trisacáridos de fórmula II, en la cual R es un átomo de hidrógeno, se revelan en efecto par

ticularmente preciosos a este fin. - - - - -

5. La posibilidad de disponer, gracias al procedimiento de la invención, de los óxidos en cuestión bajo una forma extremadamente pura confiere aún mayor interés a sus propiedades, en particular en sus aplicaciones biológicas, particularmente en inmunohematología y más especialmente para la determinación de los grupos sanguíneos. - - - - -

10. Se comprenderá el interés de disponer, por ejemplo a nivel de la práctica de transfusión, de dichos productos de síntesis considerando el proceso utilizado actualmente para la determinación de grupos sanguíneos. - - - - -

Según las técnicas más corrientes, estas determinaciones se efectúan con la ayuda de sueros-test de origen humano o producidos por inmunización de animales. - - - - -

15. Para efectuar la determinación sistemática del grupo Rhésus standard (antígeno D), varios miles de litros de antisuero anti-D se utilizan cada año en Francia. Para que la especificidad de este reactivo de origen humano sea dirigida únicamente contra el antígeno D, es necesario absorber los anticuerpos naturales anti-A y anti-B, inicialmente presentes en estos sueros, sobre unos glóbulos rojos A ó B del grupo Rhésus negativo. Varios miles de litros de sangre del grupo B Rhésus negativo se utilizan a este efecto. Esto representa no solamente manipulaciones de grandes volúmenes, si
- 20.

no sobre todo provoca la utilización de una sangre relativamente rara. - - - - -

5. Así, en Francia, el 1,2% de la población solamente pertenece al grupo B Rhésus negativo. Esto tiene como consecuencia provocar una "penuria", creada artificialmente, de frascos de sangre de este grupo destinados a la transfusión sanguínea. - - - - -

10. Los nuevos trisacáridos de fórmula II de la invención, en los cuales R representa un átomo de hidrógeno, constituyen precisamente una solución de este problema de "penuria" de frascos de sangre que pertenecen a grupos preciosos para la transfusión sanguínea. - - - - -

15. En efecto, por fijación sobre un soporte sólido de estos nuevos trisacáridos, la invención proporciona un modelo artificial, que puede ser regenerado, de los glóbulos B Rhésus negativo. - - - - -

20. El mismo tipo de compuesto puede ser utilizado para resolver otros problemas donde interviene una frecuencia aún más rara de combinaciones de sistemas de grupos sanguíneos. - - - - -

Por ejemplo, algunos sujetos pertenecen al grupo excepcional negativo para el antígeno Cellano (sistema Kell) y son susceptibles de desarrollar un anticuerpo anticellano

que puede ser utilizado como suero-test para el antígeno cellano. Según el proceso de determinación clásica de grupos sanguíneos, los anticuerpos naturales anti-B de estos sujetos son absorbidos con ayuda de glóbulos rojos de un sujeto del grupo B, cellano negativo. Si se considera que dicha combinación no se encuentra más que 1,7 veces cada 10.000, se comprenderá el interés innegable de la utilización. - - - -

10. Queda claro que la utilización en lugar de estos glóbulos rojos, para desempeñar la misma función, del inmuno absorbente de la invención definido anteriormente presenta un interés muy particular. - - - - -

15. Además, es posible disponer de sueros-test específicos, gracias a los inmunoabsorbentes de la invención dotados de una capacidad de absorción de anticuerpos elevada, inversamente, después de elución en medio ácido de los anti-B fijados sobre los inmunoabsorbentes y concentración, se recuperan con títulos elevados los anticuerpos anti-B, lo que aumenta el interés económico de los compuestos de la invención. - - - - -

20. En estas aplicaciones, se podrá recurrir ventajosamente a los soportes utilizados habitualmente en este tipo de técnica y más especialmente a unos polímeros insolubles tales como la celulosa, la agarosa o derivados de estos compuestos. - - - - -

25. De manera general, los óxidos de la invención, más

especialmente los trisacáridos de fórmula II definida anteriormente, son utilizables in vitro e in vivo gracias a su inocuidad y a su no inmunogeneidad, y ello en las diversas reacciones inmunológicas que utilizan las propiedades del de  
5. terminante antigénico B. - - - - -

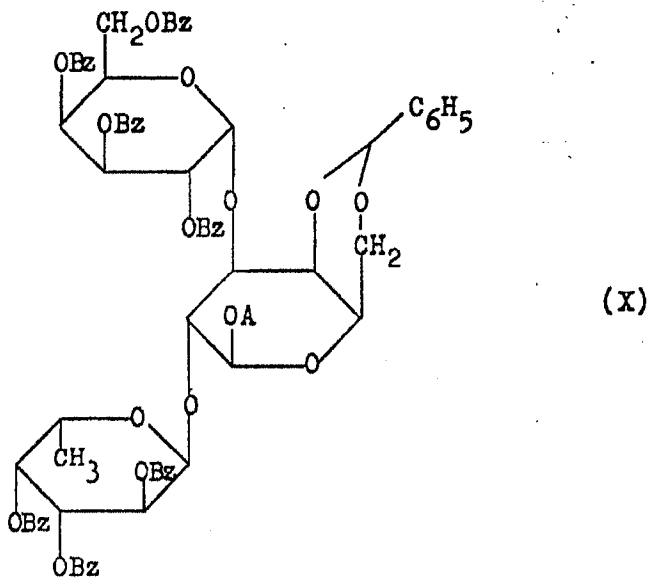
La invención proporciona así preciosos reactivos biológicos utilizables en forma inmovilizada, pero también tal cual. El estudio de estos derivados bajo su forma libre ha mostrado en particular su capacidad elevada de neutraliza  
10. ción de las hemolisinas anti-B. Estos derivados son por tanto ventajosamente utilizables para la detección y la neutralización de las hemolisinas anti-B reemplazando a las sustancias de grupos sanguíneos aislados a partir de mucina de estómago de cerdo o de caballo. - - - - -

15. Otras características y ventajas de la invención aparecerán a continuación en la descripción dada en los Ejemplos. - - - - -

Los puntos de fusión dados en estos Ejemplos están medidos en un tubo capilar por medio de un aparato Büchi y  
20. no están corregidos. Los poderes rotatorios están determinados con, como polarímetro, el modelo 141 comercializado por Perkin-Elmer. Los espectros infrarrojos (IR) están registrados con la ayuda de un espectrofotómetro IRA-1 de Jouan-Jasco y los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) con la  
25. ayuda de un espectrómetro Perkin-Elmer R-32 (90 MHz). En lo

que concierne a los resultados relativos a la RMN se indican los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) con respecto al tetrametilsilano interno; los protones de la unidad L-fucopiranososa están afectados de un índice prima, los de la unidad D-galactopiranososa no reductora con un índice segunda. Las cromatografías sobre columna se efectúan por medio de gel de sílice Merck (granulometría 0,063-0,200 mm). - - - - -

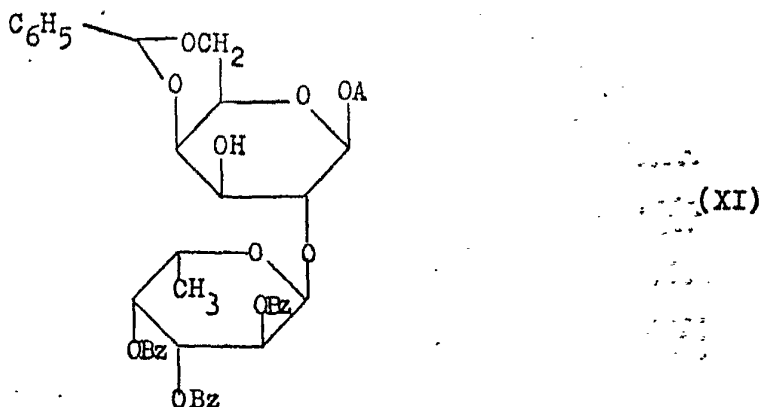
10. EJEMPLO 1. Preparación del trisacárido alil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-galactopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido de fórmula X: - - - - -



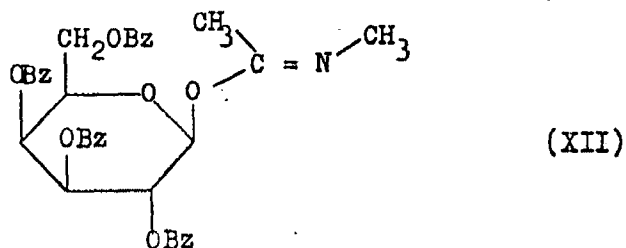
en la cual Bz representa el radical bencilo. - - - - -

Para elaborar el trisacárido de fórmula X, se hace reaccionar un disacárido, a saber una fucogalactopiranososa de

fórmula XI, la alil-3-O-benzoil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido. -----



5. con la 1-O-imidil-galactopiranososa de fórmula XII (1-O-(N-metil)-acetimidil-2,3,4,6-tetra-O-bencil-beta-D-galactopiranososa) -----

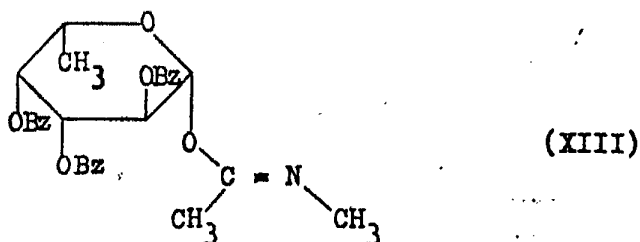


10. Previamente a esta reacción de condensación se procede a la preparación del disacárido XI por una parte, y de la 1-O-imidilgalactopiranososa XII por otra parte, operando como sigue. -----

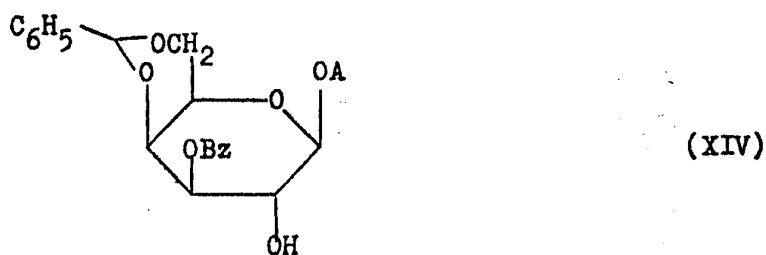
1 - Preparación del disacárido XI.

El disacárido XI se obtiene por condensación de la

fucopiranososa de fórmula XIII (la 1-O-(N-metil)-acetimidil-2,3,4-tri-O-bencil-beta-L-fucopiranososa) - - - - -



con la alilgalactopiranososa de fórmula XIV (la alil-3-O-benzoyl-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido) - - - - -



5. a) Preparación de la 1-O-(N-metil)-acetimidil-2,3,4-tri-O-bencil-beta-L-fucopiranososa de fórmula XIII.

Se disuelven 434 mg de 2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranososa de fórmula XV - - - - -



10. en 10 ml de diclorometano y después se adicionan 2,5 equivalentes de cloruro de dimetilcloroformiminio. La mezcla de reacción se somete a agitación al abrigo de humedad y después

se filtra al cabo de 40 mn, en una corta columna de gel de sílice y se evapora. Se obtiene cloruro de 2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosilo (rdt. 96%), que se introduce directamente en la fabricación de la 1-O-(N-metil)-acetimidilfucopiranososa. - - - - -

5. Se adicionan 434 mg de cloruro de fucopiranosilo y 190 mg de etildiisopropilamina a 10 ml de una solución bencénica anhidra que contiene 81 mg de N-metilacetamida, agitada bajo nitrógeno seco y al abrigo de la luz, en presencia de 10. 580 mg de óxido de plata y de tamices moleculares 4 Å. Al cabo de 20 h, el medio de reacción es filtrado sobre lecho de alúmina neutra, el cual es lavado con 250 mg de éter que contiene 0,1% de trietilamina. El filtrado y la fase etérea se evaporan a sequedad y el residuo sólido (462 mg, 94%) se re- 15. cristalizan en hexano, dando el imidato buscado (431 mg, 88%). - - - - -

P.F. 89-90°C;  $[\alpha]_D^{20} = -67^{\circ}$  (c 1, benceno); R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,18 (3H,d,7 Hz, Me-C), 1,84 (3H,s,Me-C), 2,97 (3H,s,Me-N), 5,80 (1H,d,J<sub>1,2</sub> 8Hz,H-1), 7,30-7,35 (15H,m,Ph); análisis: calc. para C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>5</sub>: C: 73,59; H: 7,20; N: 2,86; O: 16,34; hallado: C: 73,72; H: 7,33; N: 2,92; O: 16,19. - - - - -

b) Preparación de la alil-galactopiranososa de fórmula XIV.

Se realiza por acción del aldehído benzoico en presencia de 25. cloruro de zinc sobre el alil-beta-D-galactopiranosido, lo

que conduce al alil-4-6-0-benciliden-beta-D-galactopiranósido que se somete a una reacción de benzoilación. Estas etapas se efectúan como sigue: - - - - -

Alfa) alil-beta-D-galactopiranósido

5. Se somete a agitación una mezcla de 6 g de óxido mercuríco, de 0,4 g de bromuro mercuríco y de 10 g de Drierite durante 30 mn a la temperatura ambiente y al abrigo de la humedad en presencia de 80 ml de 1,2-dicloroetano y de alcohol alílico recientemente destilado. Se adicionan entonces 12 g de bromuro de 1,2,3,4-tetra-O-acetil-alfa-D-galactopiranósido y la agitación se prosigue durante 12 h. Los sólidos son escurridos y el filtrado es evacuado a sequedad. El residuo se disuelve en 200 ml de cloroformo y la solución obtenida es lavada con una solución acuosa al 10% de yoduro de potasio, con agua, secada (CaCl<sub>2</sub>) y evaporada. El residuo se disuelve en 100 ml de metanol y se adicionan 3 ml de una solución molar de metilato de sodio en metanol. - - - - -
- 10.
- 15.

- Al cabo de una hora, el medio de reacción es neutralizado (resina ácida) y evaporado. El residuo es cristalizado en etanol, dando el alil-beta-D-galactopiranósido (5,2 g, 81%); P.F. 103-104°C;  $[\alpha]_D^{20} = -19^{\circ}$  (c 1, MeOH); - - - - -
- 20.

Beta) alil-4,6-0-benciliden-beta-D-galactopiranósido

Se someten a continuación 5,96 g de alil-beta-D-galactopira-

nósido a una fuerte agitación durante 12 h en presencia de 80 ml de aldehído benzoico y de 5,5 g de cloruro de zinc. El medio de reacción es entonces lentamente vertido bajo fuerte agitación en 300 ml de diisopropiléter. El precipitado formado es escurrido al cabo de algunas horas y lavado con 100 ml de éter aproximadamente. El sólido obtenido es cristalizado en etanol, dando el alil-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido (6,92 g, 82%); P.F. 178-179°C,  $[\alpha]_D^{20} = -7^\circ$  (c 1, piridina); - - - - -

10. anál.: calc. para  $C_{16}H_{20}O_6 \cdot H_2O$ : C: 58,88; H: 6,79; O: 34,31  
hall.: C: 58,94; H: 6,47; O: 34,09.

Este producto está caracterizado por un di-O-acetato: P.F. 94-95°C  $[\alpha]_D^{20} + 56^\circ$  (c 1, cloroformo). - - - - -

15. anál.: calc. para  $C_{20}H_{24}O_8$ : C: 61,22; H: 6,16; O: 32,62  
hall.: C: 61,31; H: 6,12; O: 32,77.

Gamma) alil-3-O-benzoil-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido

20. Se adiciona a 5 ml de una solución clorofórmica anhidra, que contiene 443 mg de imidazol, una solución de 457 mg de cloruro de benzoilo en 2 ml de cloroformo anhidro a 5°C. Al cabo de 10 mn, el clorhidrato de imidazol formado es escurrido y lavado con 5 ml de cloroformo. Se adicionan entonces 20 ml de una solución clorofórmica anhidra de alil-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido (1 g) al filtrado y el medio de

reacción es llevado a reflujo, a 75°C, durante 18 h aproximadamente. Después de enfriamiento a la temperatura ambiente, el medio de reacción se diluye con 50 ml de cloroformo, se lava con una solución acuosa diluida de bicarbonato, con

5. agua, secado (CaCl<sub>2</sub>) y evaporado. El residuo se cristaliza en la mezcla acetato de etilo-éter dando el compuesto de fórmula XIV (1,14 g, 85%), P.F. 172-173°,  $[\alpha]_D^{20} = +93^\circ$  (c 1, cloroformo). - - - - -

anál.: calc. para C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>: C: 66,98; H: 5,87; O: 27,16

10. hall.: C: 67,01; H: 5,75; O: 27,37.

c) Condensación de los productos obtenidos en a) y b).

Se somete a agitación una solución de 619 mg del derivado de fórmula XIV en 20 ml de nitrometano anhidro durante 3 h al abrigo de la humedad y bajo nitrógeno seco en presencia de

15. tamices moleculares 4 Å en polvo (1 g). Se adicionan a esta solución de reacción 1,222 g de acetimidilfucopiranososa XIII y 344 mg de ácido p-toluensulfónico y se prosigue la agitación durante 20 h. El medio de reacción es entonces neutralizado con trietilamina y filtrado. El filtrado se evapora y

20. el residuo es purificado por cromatografía en una columna de 150 g de gel de sílice con la ayuda de mezcla hexano-acetato de etilo (5:2, v/v). Se obtiene el alil-3-O-benzoil-2-O-2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido en estado puro (1,131 g, 91%),

25.  $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ$  (c 1, cloroformo), R.M.N. (cloroformo-d):

delta 1,12 (3H,d,7 Hz, Me-C), 7,00-7,55 (20H,m,Ph). - - - - -

anál.: calc. para C<sub>50</sub>H<sub>52</sub>O<sub>11</sub>: C: 72,44; H: 6,32; O: 21,23

hall.: C: 72,66; H: 6,32; O: 21,27.

5. Este disacárido se somete a una reacción de O-debenzoilación selectiva procediendo como sigue: - - - - -

Se disuelven 1,03 g de un derivado de galactopiranosido en cuestión en 20 ml de metanol y se adiciona 1 ml de una solución metanólica molar de metilato de sodio. Al cabo de una hora, el medio de reacción es concentrado y vertido en agua helada. La fase obtenida es extraída con cloroformo, siendo

10. a continuación los extractos clorofórmicos lavados con agua, secados (CaCl<sub>2</sub>) y evaporados. El residuo es cristalizado en la mezcla acetato de etilo-éter-hexano, dando el alil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido (847 mg, 94%); P.F. 166-167°C,  $[\alpha]_D^{20} = -58^{\circ}$  (c, 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,12 (3H,d,7Hz, Me-C), 5,26 (1H,d,J<sub>1,2</sub> 4Hz, H-1'), 7,15-7,65 (20H,m,Ph). - - - - -

15.

anál.: calc. para C<sub>43</sub>H<sub>48</sub>O<sub>10</sub>: C: 71,52; H: 6,67; O: 22,07

20. hall.: C: 71,68; H: 6,63; O: 22,15.

2) Preparación de 1-O-(N-metil)-acetimidil de fórmula XII.

Este imidato se prepara a partir de la 2,3,4,6-tetra-O-bencil-D-galactopiranososa según el método descrito en 1-b). El cloruro de 2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-galactopiranosilo

formado intermediariamente se obtiene con un rendimiento de 93%,  $[\alpha]_D^{20} = +151^\circ$  (c 2,5, benceno). El imidato se obtiene con un rendimiento de 92%,  $[\alpha]_D^{20} = +25^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,84 (3H,s,Me-C), 2,95 (3H,s,Me-N), 5,83 (1H,d, $J_{1,2} = 8$  Hz,H-1), 7,30 (2OH,m,Ph).

5.

anál.: calc. para  $C_{37}H_{41}NO_6$ : C: 74,60; H: 6,94; N: 2,35; O: 16,12. hall.: C: 74,68; H: 6,91; N: 2,10; O: 16,31.

3) Condensación de los productos de 1) y 2).

10. Se somete a agitación durante 5 h, en presencia de tamices moleculares 4 Å (1 g) y bajo atmósfera de nitrógeno seco, una solución del compuesto alil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido (600 mg) y 900 mg del acitimidato de fórmula XII en 15 ml de nitrometano. Se adiciona a continuación una solución de
15. ácido p-toluensulfónico anhidro (150 mg) en 5 ml de nitrometano. La mezcla de reacción se somete a agitación durante 48 h a la temperatura ambiente. Después de adición de 1 ml de trietilamina, el medio de reacción es filtrado y el filtrado se evapora a sequedad. El residuo es disuelto en 50 ml de
20. cloroformo, siendo la solución lavada con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, con agua, secada ( $CaCl_2$ ) y evaporada. El residuo es cromatografiado en una columna de 80 g de gel de sílice con la ayuda de la mezcla hexano-acetato de etilo (5:2 v/v), conduciendo al compuesto de fórmula X
25. (907 mg, 88%) que es cristalizado en etano a 95% (865 mg,

84%), P.F. 117-118°  $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,18 (3H,d,7 Hz,  $\underline{\text{CH}_3}$  -C), 7,05-7,55 (40H,m,pH). - - - - -

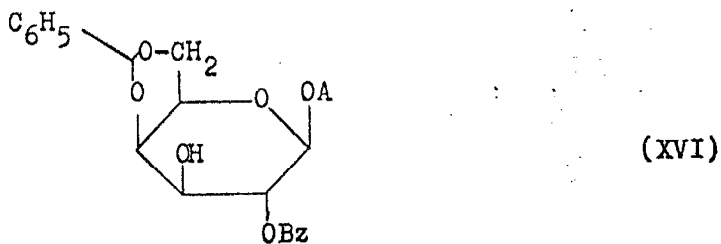
anál.: calc. para  $\text{C}_{77}\text{H}_{82}\text{O}_{15}$ : C: 74,13; H: 6,62; O: 19,24  
hall.: C: 74,22; H: 6,64; O: 19,54.

5.

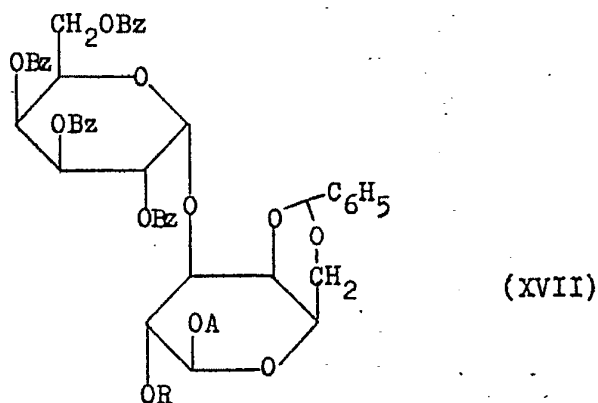
EJEMPLO 2.

Según una variante, se prepara el producto de fórmula X efectuando: - - - - -

10. 1/ La condensación de la imidilgalactopiranososa de fórmula XII, con la alil-galactopiranososa de fórmula XVI (la alil 2-O benzoil-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranososa) - - - - -



lo que conduce al disacárido alil-2-O-benzoil-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-galactopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido de fórmula: - - - - -



y después - - - - -

2/ la condensación del disacárido de fórmula XVII previamente O-debenzoilado, con la imidil-fucopiranososa de fórmula XIII. - - - - -

5. 1) Condensación de la imidil-galactopiranososa de fórmula XII con la alilgalactopiranososa de fórmula XVI

a) se prepara en principio el alil-2-O-benzoil-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido procediendo como sigue: - - - - -

10. Se adicionan 50 ml de una solución helada de hidróxido de sodio a 15 ml de una solución de acetona que contiene 1,5 g del compuesto de fórmula XIV. Se extrae al cabo de dos minutos el medio de reacción con 80 ml de cloroformo, siendo lavados los extractos orgánicos con agua, secados con  $\text{CaCl}_2$  y evaporados. El residuo es sometido a una cromatografía sobre 15. una columna de 80 g de gel de sílice con la ayuda de la mezcla acetato de etilo-hexano (1:1, v/v). Se obtiene así el producto de partida (782 mg, 52%) y el derivado buscado (661 mg, 44%), P.F. 144-145°C  $[\alpha]_D^{20} = +10,2^\circ$  (c 1, cloroformo). - - - - -

20. anál.: calc. para  $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$ : C: 66,98; H: 5,87; O: 27,16  
hall.: C: 67,04; H: 6,03; N: 27,12.

b) Se efectúa la galactosilación del galactopiranosido así formado con la ayuda del compuesto de fórmula XII. Se opera

según la técnica precedentemente descrita utilizando 285 mg del galactopiranosido y 596 mg del imidato. - - - - -

Después de purificación sobre una columna de gel de sílice (establecida con 40 g de sílice y una mezcla acetato de etilo-hexano 2:2 v/v) se obtienen 594 mg del disacárido busca-

5. do, lo que corresponde a un rendimiento de 95%. - - - - -

$[\alpha]_D^{20} = +80,5^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 4,63 (1H,d,J<sub>1,2</sub> Hz,H-1), 5,13 (1H,d,J<sub>1',2'</sub> 4Hz,H-1'). - - - - -

10. anál.: calc. para C<sub>57</sub>H<sub>58</sub>O<sub>12</sub>: C: 73,21; H: 6,25; O: 20,53  
hall.: C: 73,06; H: 6,02; O: 20,71.

c) El disacárido obtenido se somete a una O-debenzoilación selectiva. - - - - -

15. Se disuelven 580 mg del disacárido en 20 ml de metanol, después se trata con 1 ml de una solución metanólica 1M de metilato de sodio. 12 horas después se concentra el medio de reacción, se diluye con 50 ml de cloroformo, y después se lava con agua, se seca con CaCl<sub>2</sub> y se evapora. El residuo se cristaliza en metanol a 95°. Se obtienen 479 mg, rendimiento 93%

20. del disacárido O-debenzoilado. P.F. 150-151°C,  $[\alpha]_D^{20} = +44^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 2,86 (1H,d,J 3Hz,OH), 5,21 (1H, d,J<sub>1',2'</sub> 4Hz,H-1'), 7,10-7,60 (25H,m,Ph), - - - - -

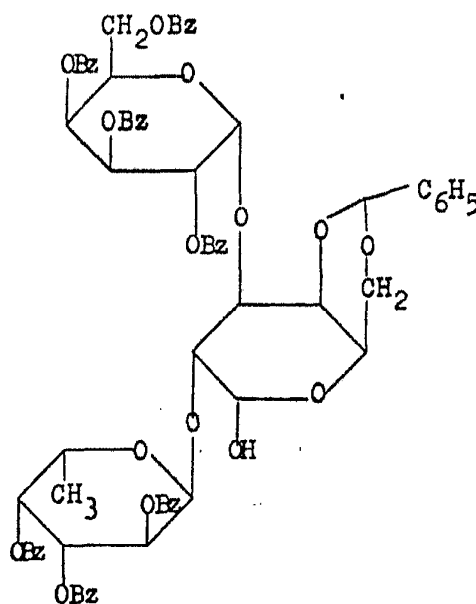
anál.: calc. para C<sub>50</sub>H<sub>54</sub>O<sub>11</sub>: C: 72,27; H: 6,55; O: 21,18

hall.: C: 72,46; H: 6,52; O: 21,29.

5. d) Según la técnica descrita anteriormente, se prepara el trisacárido de fórmula X condensando el disacárido de fórmula XVII con el imidato cristalino de fórmula XIII, utilizando respectivamente a razón de 275 y 325 mg. Se obtienen 370 mg de trisacárido, lo que corresponde a un rendimiento de 79%. P.F. 115-116°C,  $[\alpha]_D^{20} = +2^\circ$  (c 1, clorofermo). --

EJEMPLO 3.

10. Preparación de la 2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-2-L-fucopiranosil)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-galactopiranosil)-4,6-O-benciliden-D-galactopiranososa, de fórmula:



Se disuelven 624 mg de trisacárido de fórmula X en 10 ml de dimetilsulfóxido. La mezcla de reacción así formada se somete a agitación durante aproximadamente 4 h a 100°C, en pre-

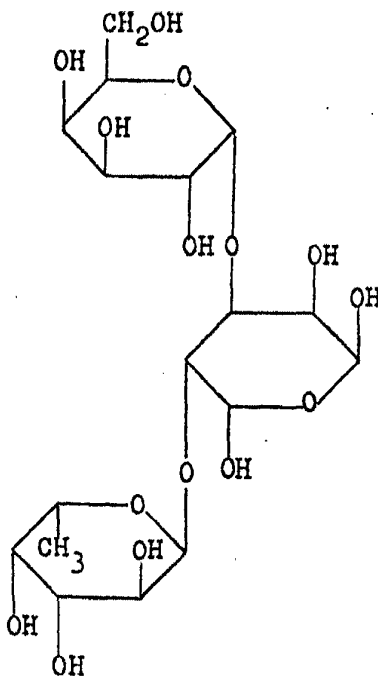
sencia de 294 mg de tert-butóxido de potasio. - - - - -

Después de enfriamiento a la temperatura ambiente, se vierte el medio de reacción en una solución acuosa helada al 10% de cloruro de amonio; esta solución se extrae con 60 ml de cloroformo, siendo lavados los extractos clorofórmicos con agua, secados con  $\text{CaCl}_2$  y evaporados. Se disuelve el residuo en 20 ml de la mezcla acetona-agua (9:1, v/v), y después se somete la solución a la agitación durante 30 mn en presencia de 428 mg de óxido mercuríco amarillo y 271 mg de cloruro mercuríco. Después de filtración, se lava el medio de reacción con una solución acuosa al 10% de yoduro de potasio, con agua, se seca con  $\text{CaCl}_2$  y después se evapora. El residuo se somete a una cromatografía sobre una columna de gel de sílice (50 g) con la ayuda de la mezcla hexano-acetato de etilo (3:2, v/v). Se obtienen así 495 mg del trisacárido buscado (rendimiento 82%) en forma de una espuma incolora;  $[\alpha]_D^{20} = +50^\circ$  (c 1, metanol), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 2,99 (3H, d, 7 Hz,  $\text{CH}_3$ -C), 5,56 (1H, s, CH Ph), 7,05-7,65 (40H, m, Ph). - - - - -

20. anál.: calc. para  $\text{C}_{74}\text{H}_{78}\text{O}_{15}$ : C: 73,61; H: 6,51; O: 19,87  
hall.: C: 73,80; H: 6,58; O: 20,06.

EJEMPLO 4:

Preparación del trisacárido B ó 2-O-(alfa-I-fucopiranosil)-3-O-(alfa-D-galactopiranosil)-D-galactopiranososa de fórmula:

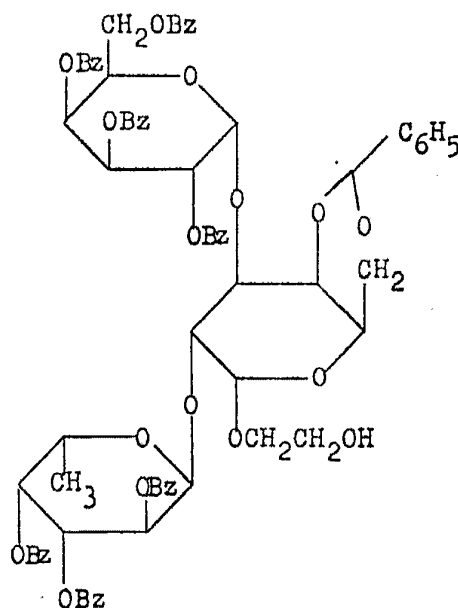


- Se someten 480 mg de trisacárido de fórmula XIX a una hidrogenólisis durante aproximadamente 20 h a la temperatura ambiente y a la presión atmosférica en 20 ml de ácido acético en presencia de 500 mg de paladio sobre carbón. Después de
5. escurrido del catalizador, el filtrado es evaporado a sequedad a una temperatura inferior a 35°C, dando el trisacárido buscado (186 mg, 96%) en forma de un polvo blanco. P.F. 135-138°C (descomposición),  $[\alpha]_D^{20} = +35$ , (c 1, agua:metanol, 19:1. v/v), espectro R.M.N. (D<sub>2</sub>O): delta 1,70 (3H, d, 7 Hz, CH<sub>3</sub>-C). - - - - -
- 10.

Este compuesto está caracterizado por un peracetato cristalino, P.F. 215-216°C,  $[\alpha]_D^{20} = +51$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,17 (3H, d, 6,5 Hz, Me-C), 1,90-2,20 (3OH, m, Ac), 6,40 (1H, d, J<sub>1,2</sub> 3,5 Hz, H-1, anómero alfa). -

EJEMPLO 5:

Preparación del beta-hidroxi-etil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-  
alfa-L-fucopiranosil)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-ga-  
lactopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido,  
5. de fórmula - - - - -



(XX)

Se agitan a temperatura ambiente 312 mg de trisacárido X  
(0,25 moles) en 16 ml de una mezcla dioxano-agua (3:1, v/v)  
a la cual se adicionan 1,25 mg de tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>).  
Al cabo de una hora, se adicionan 112 mg de peryodato de so-  
10. dio (NaIO<sub>4</sub>), 2,1 eq., y después se agita 4 h aproximadamente.

Se adicionan 50 mg de borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) luego,  
después de 10 mn, se evapora a sequedad y se toma de nuevo  
el residuo en 100 ml aproximadamente de cloroformo. Esta so-

lución clorofórmica es lavada con una solución acuosa de sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) a 10%, y después con agua, se seca a continuación sobre cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y después se filtra y se evapora el filtrado. Se obtiene un jarabe que es tratado con 16 ml de una mezcla de dioxano-agua (3:1 v/v) y se somete a agitación con 52 mg de  $\text{NaIO}_4$  (1 eq.). - - - - -

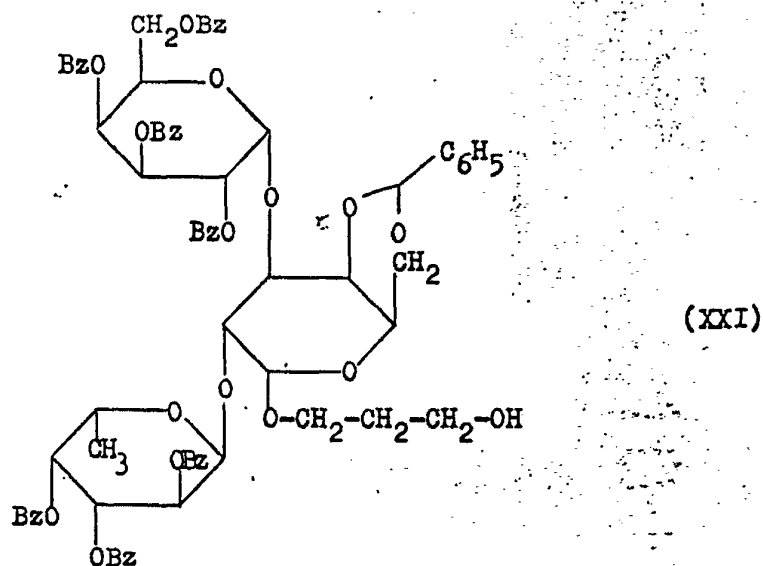
Al cabo de 3 h, se adicionan 50 mg de  $\text{NaBH}_4$ , luego 10 mn después, se evapora a sequedad y se toma de nuevo el residuo en 100 ml de cloroformo. Se procede al lavado de la solución clorofórmica como se ha indicado anteriormente. - - - - -

El jarabe obtenido es sometido a una cromatografía sobre 20 g de sílice ( $\text{SiO}_2$ ). Se utiliza como eluyente una mezcla de acetato de etilo y de hexano (3:1 v/v). - - - - -

El producto recogido después de evaporación en el eluyente es cristalizado en una mezcla éter-hexano. Se obtienen 247 mg del trisacárido buscado; P.F. 83-84°C - rendimiento 79%. - - - - -

EJEMPLO 6.

Preparación del gamma-hidroxiopropil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-  
alfa-L-fucopiranosil)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-ga-  
lactopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido,  
de fórmula XXI: - - - - -



- Se agitan a temperatura ambiente 312 mg del trisacárido X (0,25 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (3 ml) y se adicionan 0,8 ml de una solución 0,5 M de 9-borobiciclo  $\Delta^{3.3.1}$  nonano ó 9-BBN en tetrahidrofurano. Después de 4 h de calentamiento a reflujo y enfriamiento a la temperatura ambiente, el exceso de 9-BBN es destruido por adición de etanol (0,3 ml). Se adiciona a continuación una solución acuosa 3 M de hidróxido de sodio (0,2 ml), y después, gota a gota, 0,2 ml de una solución 10 M de agua oxigenada, manteniendo la temperatura entre 40 y 50°C. La mezcla de reacción es a continuación calentada a 50° bajo agitación durante 1 h. Después de enfriamiento, se adiciona carbonato de potasio sólido (1 g) y diclorometano (20 ml). Los sólidos son escurridos y el filtrado es evaporado. El residuo es purificado por paso sobre una columna de gel de sílice (15 g) y elución con la ayuda de la mezcla de acetato de etilo-hexano (2:1 v/v). El compuesto XXI es así obtenido en estado puro (292 mg, 92%),

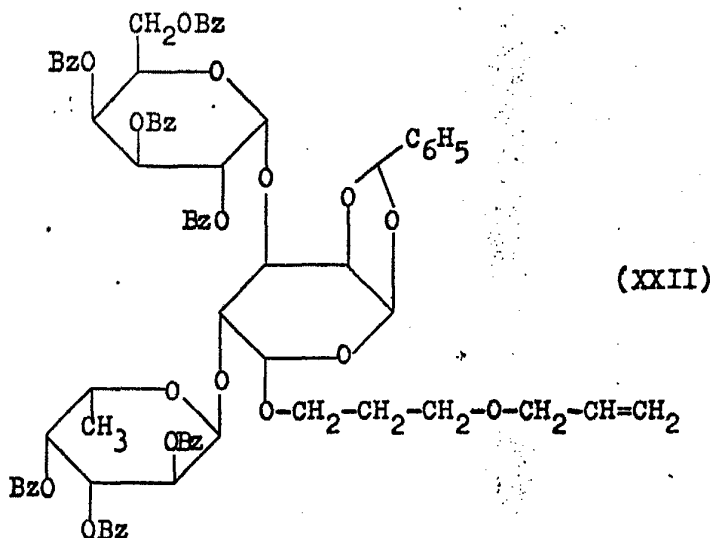
$\alpha_D^{20} = +2^\circ$  (c 1, cloroformo). - - - - -

Este compuesto está caracterizado por un acetato cristalino P.F. 112-113°,  $\alpha_D^{20} = +1,5^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,20 (3H,d,6,5 Hz, Me-C), 2,00 (s,3H,Ac), 7,10-7,60 (40H,m,Ph). - - - - -

EJEMPLO 7:

Preparación del gamma-aliloxipropil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-galactopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido,

de fórmula XXII: - - - - -



Se agitan a temperatura ambiente 633 mg del compuesto XXI con N,N-dimetilformamida (10 ml) en presencia de hidruro de sodio (96 mg de dispersión al 50% en aceite). Al cabo de una hora se adiciona bromuro de alilo (0,15 ml). La reacción se completa en 1 h 30. Después de adición de meta-

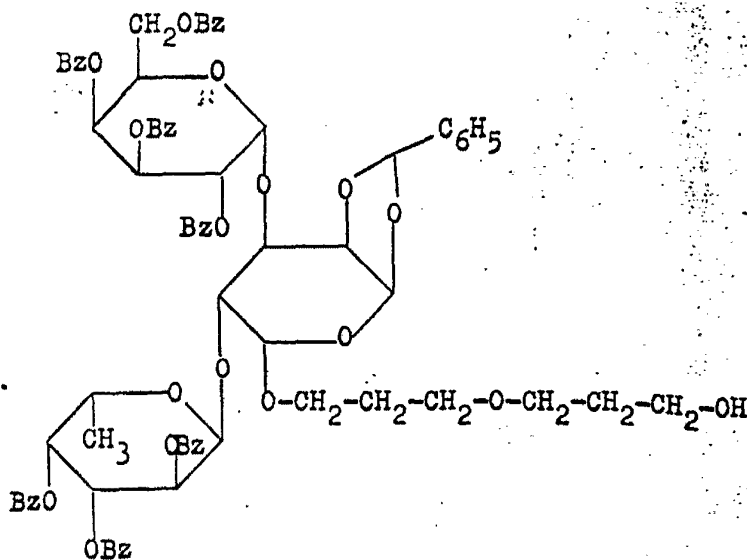
nol (2 ml), el medio de reacción es evaporado y el residuo tomado de nuevo en cloroformo (50 ml). La fase orgánica es lavada con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio, con agua, secada sobre sulfato de sodio, filtrada y evaporada.

5. El aceite contenido en el residuo es extraído con hexano hirviente (20 ml), el compuesto buscado es cristalizado en una mezcla acetato de etilo-hexano (588 mg, 90%), P.F: 103-104°,  $[\alpha]_D^{20} = + 3^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,21 (3H,d,J 7Hz, Me-C), 7,10-7,55 (4OH,m,Ph). - - - - -

EJEMPLO 8:

Preparación del gamma[(gamma-hidroxi)propiloxi]propil-2-O-(2,3,4-tri-O-bencil-alfa-L-fucopiranosil)-3-O-(2,3,4,6-tetra-O-bencil-alfa-D-galactopiranosil)-4,6-O-benciliden-beta-D-galactopiranosido, de fórmula XXIII: - - - - -

15.



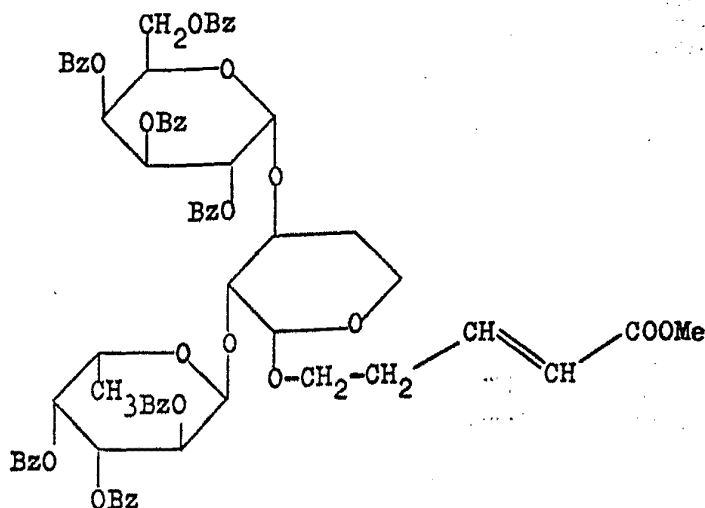
(XXIII)

Se agitan a temperatura ambiente 490 mg del deriva

- do XXII en tetrahidrofurano anhidro (4 ml) y se adiciona 1 ml de una solución 0,5 M de 9-BBN en tetrahidrofurano. Después de 2 h 30 de calentamiento a reflujo y enfriamiento a la temperatura ambiente, el exceso de 9-BBN, se destruye por adición de etanol (1 ml). Se adiciona a continuación una solución acuosa de 3 M de hidróxido de sodio (0,25 ml) y después, gota a gota, 0,38 ml de una solución 10 M de agua oxigenada, manteniendo la temperatura entre 40 y 50°C. La mezcla de reacción es a continuación calentada a 50° durante 1 h. Después de enfriamiento, la fase acuosa es saturada con carbonato de potasio (1 g), filtrada y evaporada. El residuo es purificado por paso por una columna de gel de sílice (30 mg) y elución con la ayuda de una mezcla acetato de etilo-hexano (2:1, v/v). El compuesto XXIII se obtiene así en estado puro (442 mg, 89%),  $[\alpha]_D^{20} = +1,5^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,20 (3H,d,6,5Hz, Me-C), 7,60-7,70 (40H,m,Ph). - - - - -
- 5.
- 10.
- 15.

EJEMPLO 9:

Preparación del compuesto de fórmula XXIV: - - - - -



- A una mezcla de diclorometano (15 ml) y de piridina (0,644 ml) se adiciona, bajo agitación y al abrigo de la humedad, trióxido de cromo seco (400 mg). Después de 20 minutos de agitación, se adiciona una solución del trisacárido
5. XXI (633 mg) en diclorometano (5 ml). Al cabo de 20 minutos, el medio de reacción es decantado, siendo extraído el residuo con cloroformo. La fase clorofórmica es lavada con una solución saturada de bicarbonato de sodio, con agua, secada sobre sulfato de sodio, filtrada y evaporada. El residuo es
10. purificado por cromatografía sobre gel de sílice (10 g) con la ayuda de la mezcla acetato de etilo-hexano (3:1, v/v). El aldehído obtenido (575 mg, 91%) es transformado en derivado XXIV gracias a la reacción de Wittig clásica en benceno (15 ml). Este derivado es cristalizado en éter-hexano (524 mg,
15. 88%), P.F. 152-153°,  $\alpha_D^{20} - 3^\circ$  (c 1, cloroformo), espectro R.M.N. (cloroformo-d): delta 1,23 (3H,d,6,5 Hz, Me-C), 3,69 (3H,s,COOMe), 7,10-7,55 (4OH,m,Ph). - - - - -

EJEMPLO 10:

20. Aplicación de trisacáridos de la invención como inmunoabsorbentes: - - - - -

a - Se procede a la fijación del trisacárido XXIV sobre unos soportes a base de agarosa. - - - - -

1º) - Se utiliza una matriz de agarosa activada recubierta por suero de albúmina humana. - - - - -

La activación de la agarosa se realiza con bromuro de cianógeno CNBr según el método de Axen y als. descrito en Nature, 214, 1302 (1967) modificado por March y als. según la técnica descrita en Anal. Biochem, 60, 149, (1974). - - - - -

5. Para recubrir la agarosa con suero de albúmina humana, se opera según el método de Parikh y als. descrito en "Methods in enzymology", 35, 77 (1974). - - - - -

- 1 ml de gel de agarosa comprimido contiene aproximadamente 2 mg de albúmina. - - - - -

10. Se efectúa el acoplamiento del trisacárido XXIV sobre el derivado de agarosa-albúmina con la ayuda de 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida-meto-p-toluen-sulfonato operando según las técnicas conocidas en este campo, en particular la de Parikh y als., de la que se ha hablado anteriormente, o de Weetall y als. en la misma obra, p. 59, o incluso de Hoare y als. en JACS 88, 2057, (1966) ó J. Biol. Chem. 242, 2447 (1967). - - - - -

Se introducen así aproximadamente 10 a 20 moléculas de trisacárido XXIV por molécula de albúmina. - - - - -

20. 2ª) - En una variante, el soporte está constituido por agarosa activada como se ha indicado anteriormente, transformada a continuación en un derivado de aminoalcoilagarosa con la ayuda de etilendiamina según el modo operatorio descri

to por Cohen en Methods in enzymology 35, 102 (1974). El aco  
polamiento del derivado de agarosa obtenido con el trisacári  
do XXIV se efectúa con la ayuda del derivado de carbodiimida  
como se ha expuesto más arriba. Se procede a continuación a  
5. la acetilación del producto de acoplamiento para eliminar el  
exceso de los grupos amino. - - - - -

b - Se constituye otra serie de inmunoabsorbentes fijando un  
derivado de trisacárido de fórmula II en la cual R represen-  
ta un átomo de hidrógeno y A es un grupo  $-(CH_2)_3-O-(CH_2)_4N_2$   
10. sobre carboximetilcelulosa. El acoplamiento se efectúa con  
la ayuda del derivado de carbodiimida conocido descrito más  
arriba. - - - - -

EJEMPLO 11:

Utilización del trisacárido de fórmula XXIV para la neutrali  
15. zación de las hemolisinas anti-B. - - - - -

Se utiliza una solución con 10 mg/ml del compuesto  
de fórmula XXIV operando según las técnicas de la farmacopea  
europea, se constata una inhibición total de una dosis aglu-  
tinante de un suero-test anti-B con una dilución 1/5 del tri  
20. sacárido de la invención. - - - - -

A los efectos consiguientes se declaran de novedad  
y propiedad para España, sus territorios y plazas de sobera-  
nía, las reivindicaciones que siguen. - - - - -

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de preparación de derivados de ósidos, caracterizado porque se hace reaccionar: - - - - -

5. - un derivado de ósido a) constituido por una o varias funciones osas, eventualmente fijada(s) a un resto orgánico, siendo substituida esta función osa, o una por lo menos de estas funciones osas, en el carbono anómero en posición 1 por un grupo -O-imidilo de fórmula  $-O-C(-R_2) = N-R_1$  en la cual los substituyentes  $R_1$  y  $R_2$ , idénticos o diferentes el uno del otro, representan un radical arilo o un radical alcolilo que comprende preferentemente 1 a 4 átomos de carbono, estando los grupos -OH del derivado de ósido protegidos por unos grupos apropiados, con - - - - -

10.

15. - un derivado de ósido b) constituido por una o varias funciones osas, eventualmente fijada(s) a un resto orgánico, estando libre un solo grupo -OH de esta o estas funciones osas y ocupando una cualquiera de las posiciones hidroxilo secundario 1 a 4, comprendiendo los derivados de ósidos a) y/o b) una función con por lo menos dos osas. - - - - -

20. 2.- Procedimiento de preparación de derivados de ósidos, caracterizado porque para obtener unos ósidos ramificados se hace reaccionar el derivado de ósido a) según la reivindicación 1 con un derivado de ósido constituido por una o varias funciones osas, eventualmente fijada(s) a un res

to orgánico, estando libre un solo grupo -OH de esta o estas funciones y ocupando una posición hidroxilo 1 a 4 ó 6 que permite la formación de una cadena osídica ramificada. - - -

5. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque el derivado de ósido a) utilizado está constituido por una función galactopiranososa. - - - - -

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el derivado de ósido a) está constituido por una función fucopiranososa. - - - - -

10. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el derivado de ósido b) comprende una función osa que presenta en posición 1 una substitución -OA constituida por un grupo funcional, no reactivo en las condiciones de la síntesis osídica, o hecho no reactivo, o por un grupo funcionalizable, es decir que permite en el curso o al final de la síntesis la introducción de grupos funcionales. - - - - -

20. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque, en la substitución -OA, A representa un radical que comprende uno o varios enlaces insaturados, tal como un radical etilénicamente insaturado, preferentemente un radical alcenilo que comprende 2 a 10 átomos de carbono, así como cualquier radical al cual puede dar lugar, según las técnicas clásicas de síntesis orgánica, la funcionalización

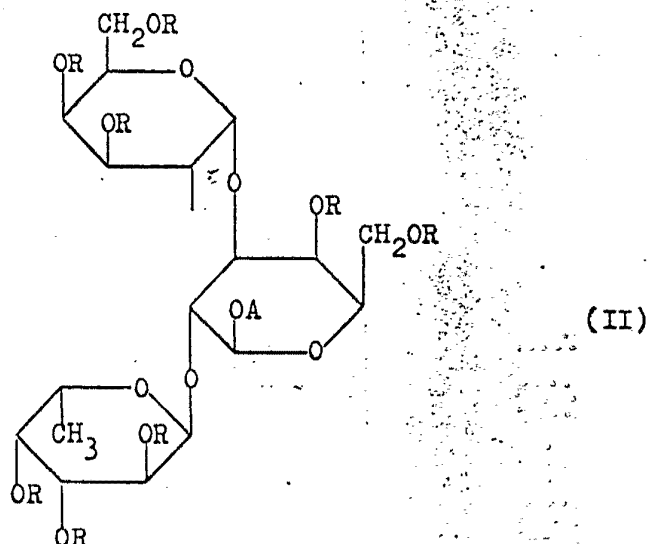
del o de los enlaces insaturados en cuestión. - - - - -

5. 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque A representa un radical alcoílo, que comprende en particular 2 a 10 átomos de carbono, y substituido por lo menos por un grupo -OH, que, en caso necesario, está protegido por un grupo de bloqueo o introducido en un radical funcional. - - - - -

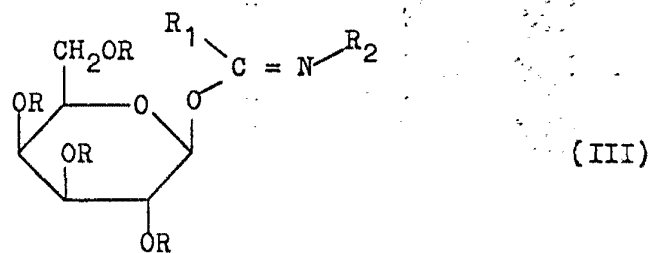
8.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque A representa el radical alilo. - - - - -

10. 9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado porque A es un grupo funcional que contiene por lo menos un radical éter y/o amina elegido en particular entre un radical alcoxi-alcenilo, alcoxi-alcohol, alcoxi-éster, alcoxi-amida o amina, alcoxi-alcoilamina o alcoilamida, o alcoxi-ácido carboxílico, pudiendo comprender estos diferentes radicales además una función amina intermedia. - - - - -

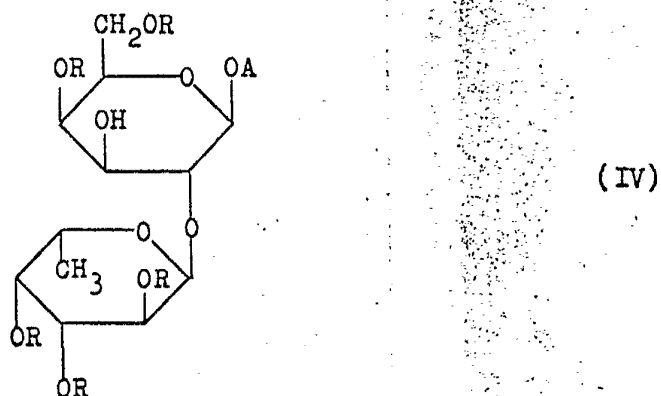
20. 10.- Procedimiento de preparación de derivados de ósidos, y más particularmente de un derivado de trisacárido ramificado que comprende un encadenamiento galactopiranosagalactopiranosafucopiranosay que responde a la estructura II - - - - -



caracterizado porque se hace reaccionar: - - - - -  
- una 1-O-imidil-beta-D-galactopiranososa de fórmula III - - -



5. con un disacárido constituido por una fuco-galactopiranososa que comprende un grupo -OH libre en posición 3 de la función galactopiranososa, respondiendo este disacárido a la fórmula IV: - - - - -

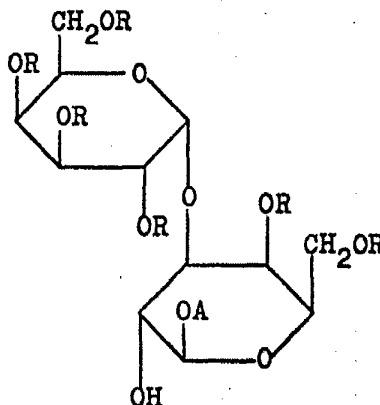


en las cuales: - - - - -

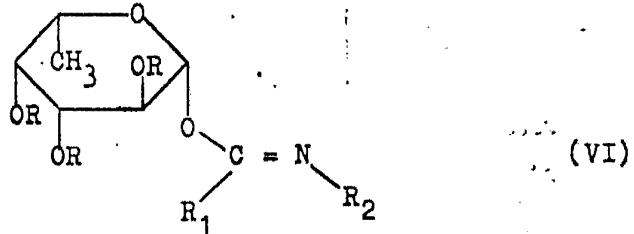
5. - los sustituyentes  $R$ , idénticos o diferentes los unos de los otros, representan unos grupos de protección de radicales hidroxilo, en caso necesario con un sustituyente vecino, y se eligen entre unos grupos estables, no reactivos en las condiciones habituales de síntesis osídica y fácilmente eliminables, en condiciones suaves compatibles con el mantenimiento de la estructura osídica, en particular por unos grupos que constituyen con el átomo de oxígeno del hidroxilo unos éteres bencílicos o unos acetales bencilidénicos, - - -
10. -  $A$  representa un resto orgánico tal como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y - - - - -

-  $R_1$  y  $R_2$  presentan las significaciones dadas en la reivindicación 3. - - - - -

15. 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque se utiliza una digalactopiranososa, que comprende un grupo -OH libre en posición 2 de una de las funciones galactopiranososa, y que responde a la fórmula V: - - - - -



y porque se efectúa su condensación con el grupo -O-imidilo de una 1-O-imidil-beta-L-fucopiranososa de fórmula VI: - - - -

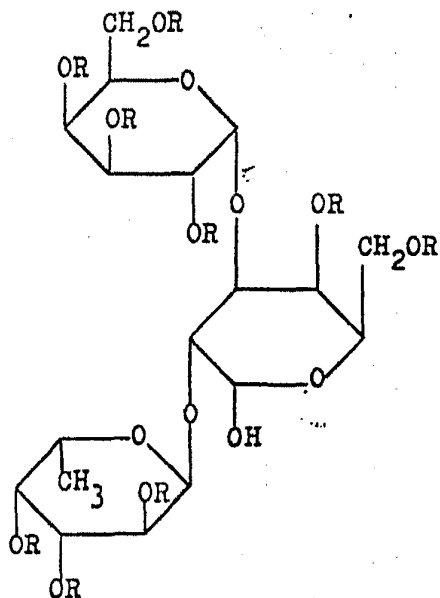


R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R y A tienen en estas fórmulas las significaciones dadas en la reivindicación 10. - - - - -

5. 12.- Procedimiento según la reivindicación 10 ó 11, caracterizado porque el sustituyente A del disacárido de fórmula IV está constituido por el radical alilo. - - - -

10. 13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se opera en presencia de ácido p-toluensulfónico anhidro y de nitrometano. - - - - -

15. 14.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, caracterizado porque, aplicándose a la síntesis del trisacárido B, se procede a la eliminación secuencial, en condiciones suaves, del sustituyente A del producto de estructura II obtenido, lo que conduce a un producto de estructura IX: - - - - -



seguida de una hidrogenólisis. -----

15.- "PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE DERIVADOS DE OSIDOS". -----

5. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria que consta de cincuenta y cuatro hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras.

BARCELONA, 10 ABR. 1979  
P.A. M. CURELL SUÑOL