



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 324 137**

② Número de solicitud: 200703049

⑤ Int. Cl.:
C07H 15/26 (2006.01)
C07H 5/10 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01)

⑫ PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

⑫ Fecha de presentación: **14.11.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2009**

Fecha de la concesión: **25.01.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **12.02.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
12.02.2010

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla**
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES

⑱ Inventor/es: **Moreno Vargas, Antonio José;**
Molina Sanz, Lidia;
Carmona Asenjo, Ana Teresa;
Lambelet, Martine;
Spertini, Oliver y
Robina Ramírez, Inmaculada

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Tiofucósidos conteniendo prolinas hidroxiladas, síntesis y usos de los mismos.**

㉑ Resumen:

Tiofucósidos conteniendo prolinas hidroxiladas, síntesis y usos de los mismos.

Compuesto que comprende un tiofucósido conteniendo prolinas hidroxiladas. 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.

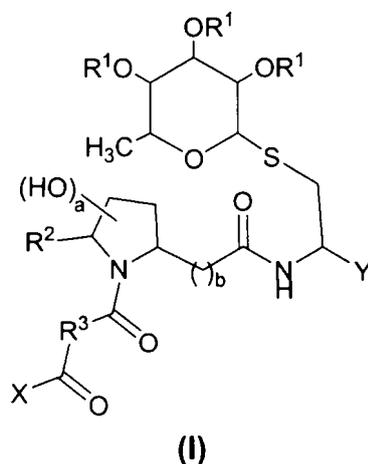
ES 2 324 137 B2

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

DESCRIPCIÓN

Tiofucósidos conteniendo prolinas hidroxiladas, 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. Selectinas 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) ($\text{NeuAc}\alpha(2\rightarrow3)\text{Gal}\beta(1\rightarrow4)[\text{Fuc}\alpha(1\rightarrow3)]\text{GlcNAc}\beta 1$), 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).

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 0189531A1).

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. *et al.*, *Int. J. Cancer* 2007, vol. 121, pp. 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).

También se ha demostrado que el reconocimiento entre L-selectinas y determinados carbohidratos desempeña un 15 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).

El propio SLex como fármaco presenta los inconvenientes de una baja afinidad hacia las selectinas, una síntesis 20 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., Norman, K. E. *et al.*, *Faseb J.* 2004, vol. 18, pp. 152-154). Debido al interés de aplicabilidad de estos productos, existen patentes relacionadas: US2006241022A1; US6111084A).

Con la idea de obtener fármacos de utilidad clínica, se han preparado y estudiado estructuralmente miméticos del 30 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; US5919769A)

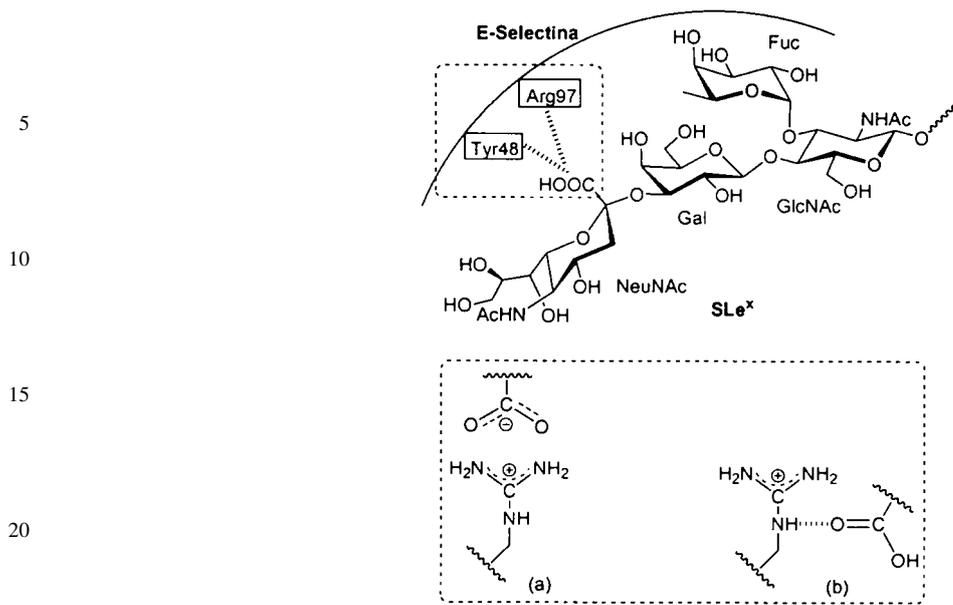
Todos los compuestos mencionados en los anteriores artículos o patentes contienen una función ácido carboxílico 35 que mimetiza la unidad de ácido acetilneuramínico presente en el SLex natural. (Su acción ha sido recientemente tratada en el artículo de revisión: Tizt, A. *et al.*, *Chimia*, 2007, vol. 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; W09831697A1; W09809976A1).

Todos estos modelos se acogen a un modelo inicial de interacción ligando-selectinas en el que un grupo carboxi- 45 lato 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



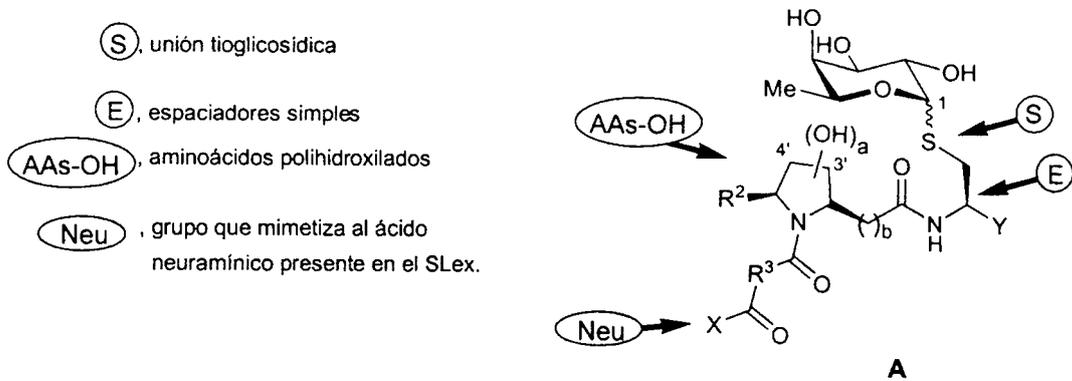
Esto abre las puertas hacia el diseño y preparación de nuevos ligandos de selectinas no cargados en los que la función ácido carboxílico está mimetizada por otras funciones neutras como ésteres o amidas.

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 en un rango mM bajo de IC_{50} . La presencia de un átomo de S en el enlace glicosídico (S-conjugados) es novedosa en este tipo de compuestos y su aplicabilidad, lo que le da 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, vol. 98, pp. 833-862) en cuanto a su simplicidad, viabilidad sintética y menor coste.

Algunos de los 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 :

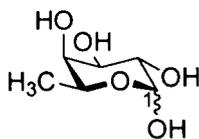


Donde: S, unión tioglicosídica; E, espaciadores simples; AAs-OH, prolinas polihidroxiladas; y Neu, grupo que mimetiza al ácido neuramínico presente en el SLe^X .

ES 2 324 137 B2

Mediante el término “glicósido” se hace referencia a carbohidratos que llevan sustituyentes en el carbono anomérico C-1, que tiene carácter de acetal o hemiacetal. El término “L-fucosa” se refiere al monosacárido $\text{CH}_3\text{-(CHOH)}_4\text{-CHO}$ que presenta la siguiente estructura cíclica:

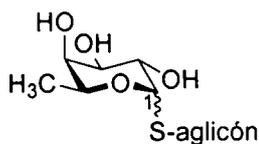
5



10

El término “tio” indica un átomo de azufre en el C-1. El término “aglicón” denota el sustituyente que va unido a dicho átomo de azufre.

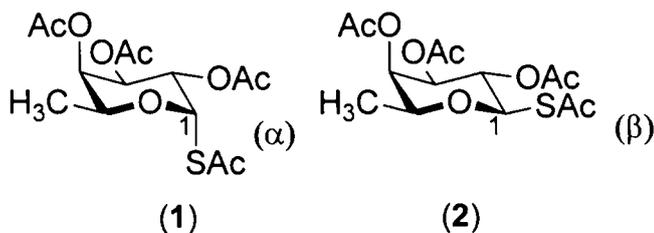
15



20

El C-1 puede tener las configuraciones *S* y *R*, que se expresan también y respectivamente como α (1) y β (2). Se denotan también como epímeros por ser isómeros que difieren solamente en la configuración de uno de sus carbonos, siendo configuración la disposición en el espacio de cada sustituyente del carbono.

25



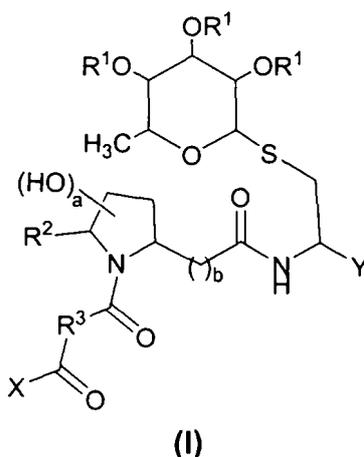
35

El término “no cargado” se refiere a que no existe un grupo -COOH que en medio básico pueda formar un carboxilato cargado negativamente: -COO^- .

40

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales:

45



55

60

donde:

65

X se selecciona del grupo que comprende -OR^4 -NHR^4 , R^4 se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, alquilo ($\text{C}_1\text{-C}_6$) o arilo ($\text{C}_6\text{-C}_{12}$), preferiblemente R^4 es un alquilo C_4 , más preferiblemente n-butilo ó t-butilo;

R^1 se selecciona del grupo que comprende H ó -COCH_3 (Ac), preferiblemente R^1 es hidrógeno (H);

ES 2 324 137 B2

R² se selecciona del grupo que comprende H, -CH₂OH ó -CH₃ (Me), preferiblemente R² es hidrógeno;

R³ se selecciona del grupo que comprende alquilo C₁-C₆ o cicloalquilo (C₃-C₆), preferiblemente R³ es un alquilo no sustituido, más preferiblemente R³ es un alquilo C₃, y aún más preferiblemente n-propilo;

“a” es 1 ó 2, preferiblemente “a” es 1. Si a = 1 indicaría un grupo -OH unido al C-3' ó al C-4' del anillo, y si a = 2 indicaría dos grupo -OH unidos a C-3' y C-4';

“b” es 0 ó 1, preferiblemente “b” es 0. Si b = 0 indicaría derivados de prolina, y si b = 1 indicaría derivados de homoprolinas; e

Y se selecciona del grupo que comprende H ó -COOR⁵, donde R⁵ se selecciona del grupo que comprende alquilo (C₁-C₆) ó arilo (C₆-C₁₂), preferiblemente Y es hidrógeno o R⁵ es un alquilo (C₁-C₆), y más preferiblemente R⁵ es un metilo.

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).

En la presente invención el término “alquilo” se refiere a cadenas carbonadas alifáticas, lineales o ramificadas, sustituidas o no sustituidas. 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, i-propilo, n-butilo (Bu), t-butilo (Bu^t), n-pentilo, etc.

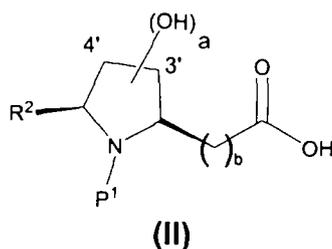
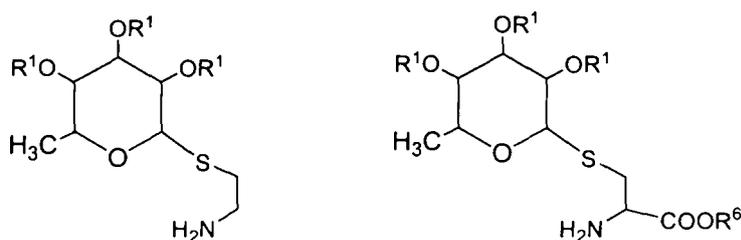
Por “cicloalquilo” se refiere en la presente invención a cadenas carbonadas alifáticas cíclicas. Cuando se hace referencia a un cicloalquilo C₃-C₆, se entiende que dicho grupo tiene entre 3 y 6 átomos de carbono, por ejemplo el grupo ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo ó ciclohexilo.

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, naftilo.

La presente invención además se refiere a la preparación de glicósidos no cargados que incorporan una unidad de L-fucosa, un enlace tioglicosídico, y aminoácidos no proteínogénicos 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 los siguientes pasos:

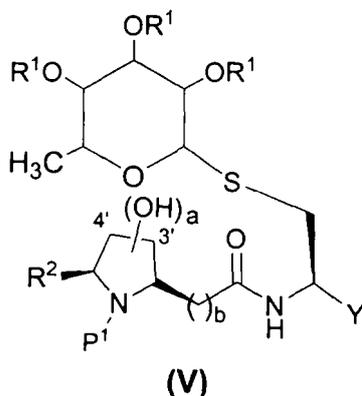
- a. acoplamiento de cualquiera de los siguientes compuestos de fórmula general (III) ó (IV) (llamados tiofucosil derivados) con el compuesto de fórmula general (II) (derivados hidroxi-prolínicos u homoprolínicos):



R⁶ es seleccionado del grupo que comprende H, alquilo (C₁-C₄) ó arilo (C₆); P¹ es un grupo protector; y R¹, R², a y b están definidos en la reivindicación 1.

ES 2 324 137 B2

En este paso (a) se obtiene el compuesto de fórmula general (V):



- 20
- 25
- b. acoplamiento de los compuestos obtenidos en el paso (a) con derivados mono-protectidos de los ácidos malónico, succínico o glutámico. Estos derivados son compuestos de estructura general X-OC-R³-COOH donde X es un grupo O-alquilo u O-arilo, y R³ está definido anteriormente, es decir, es un grupo -(CH₂)_n, donde n = 1,2,3;
 - c. liberación de los grupos protectores del compuesto obtenido en el paso (b) para la obtención del compuesto de fórmula (I) (R¹ = COCH₃; Y = H; y X = OH) o tratamiento del compuesto del paso (b) con una base débil para la obtención del compuesto de fórmula (I) (X = -OR⁴; R¹ = H; e Y = H).

En una realización preferida del método de la invención, además comprende el siguiente paso:

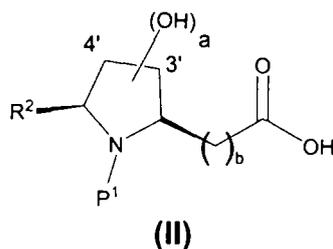
- 30
- d. acoplamiento del compuesto obtenido en (c) (compuestos de estructura general (I) (R¹ = COCH₃; Y = H; y X = OH)) con aminas, que pueden ser alifáticas o aromáticas, para obtener compuestos de fórmula general (I) (X = -NR⁴).

35 El método de obtención de los compuestos de fórmula general (IV), tiofucosil aminoácidos, podría comprender los siguientes pasos:

- 40
- a. reacción de L-fucosa peracetilada (CH₃CH-(CHOCOCH₃)₃-O-CHOCOCH₃) con HBr en CH₃COOH para obtener acetobromofucosa (CH₃CH-(CHOCOCH₃)₃-O-CHBr);
 - b. reacción del compuesto obtenido en (a) con derivados del aminoácido L-cisteína N- y O- protegido (grupos protectores) y con una base, en condiciones de catálisis de transferencia de fase.
 - c. Eliminación de los grupos protectores para dar los compuestos de fórmula general (IV).

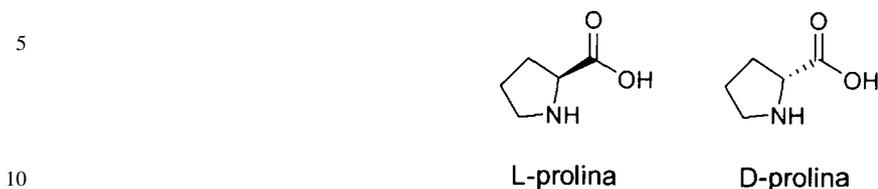
45 El término “tiofucosil derivados” o “S-fucosil derivados” indica la existencia de sustituyentes unidos al átomo de S. Estos sustituyentes incluyen cadenas carbonadas lineales o cíclicas o aromáticas terminadas en un grupo amino (NH₂) que se encuentra protegido con un grupo protector, indicando grupo protector a los grupos que se puedan introducir en un grupo funcional (en este caso NH₂) y que se pueda quitar fácilmente para volver a generar el mismo grupo NH₂. 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-tio-glicoconjugados.

55 Se entiende por derivados hidroxiprolineicos e hidroxihomoprolinicos aquellos compuestos que contienen un anillo saturado de 5 eslabones (pirrolidina) conteniendo un átomo de nitrógeno, el cual lleva grupos COOH (prolinas)/CH₂OOH(homoprolinas), -OH, -CH₃ y -CH₂OH como sustituyentes.



ES 2 324 137 B2

$R^2 = H, -CH_3, -CH_2OH$, $a = 1 \text{ ó } 2$, $b = 0 \text{ ó } 1$. Se entiende por D- y L-prolina los aminoácidos relacionados cuya estructura se indican:



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

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

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

20 Particularmente, la invención se refiere a los métodos de producción de tales compuestos, dando buenos 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 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 E- y P-selectinas. Estas enfermedades pueden ser procesos inflamatorios, cáncer, artritis, trombosis, dermatitis, inflamaciones pulmonares o afecciones cardíacas.

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.

45 En una realización preferida el compuesto de la invención, compuesto de fórmula general (I), tiene afinidad frente a E- y P-selectinas en un rango de concentraciones mM y puede actuar como agente anticancerígeno en un rango de concentración μM .

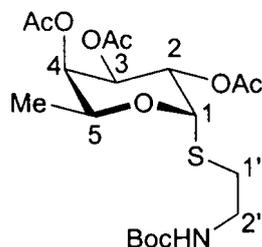
50 Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquier compuesto de fórmula general (I) además de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 “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.

60 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.

3. Obtención de los bloques de síntesis (4) y (16)

3.1. Síntesis del compuesto (4)



(4)

A una disolución del α -1-tiofucósido, compuesto (1), (379 mg, 1.09 mmoles) y *N*-Boc-2-bromo-etilamina (3) (Boc = $-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) (235 mg, 1.05 mmoles) en dimetilformamida (DMF) seca (6 ml), se añadió dietilamina (0.7 ml). 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, 1:2), obteniéndose el compuesto (4) (400 mg, 82%) como un aceite incoloro (Esquema 2).

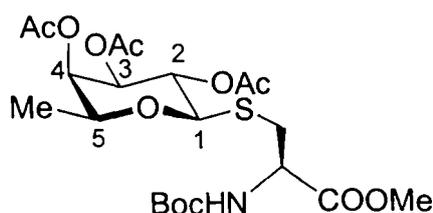
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 298 K, J Hz, δ ppm) δ 5.67 (d, 1H, $J_{1,2} = 5.2$, H-1), 5.28 (br. d, $J_{3,4} = 3.3$, H-4), 5.20 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.9$, H-2), 5.18 (dd, 1H, H-3), 4.90 (s ancho, 1H, $-\text{NHBoc}$), 4.45 (q, $J_{4,\text{CH}} = 6.5$, 1H, H-5), 3.33-3.26 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.60-2.79-2.60 (m, 2H, H-1'a y 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, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.44 (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 170.5, 170.2, 169.9 (3 $-\text{COO-}$), 155.6 ($-\text{CO-}$ de Boc), 82.8 (C-1), 79.5 ($(\text{CH}_3)_3\text{C-}$), 70.8 (C-4), 68.5 (C-3), 67.9 (C-2), 65.0 (C-5), 40.2 (C-2'), 30.9 (C-1'), 28.4 ($(\text{CH}_3)_3\text{C-}$), 20.8, 20.6, 20.5 (3 $\text{CH}_3\text{CO-}$), 15.9 (CH_3 de fucosa).

FABMS m/z 472 (15%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$)

HRFABMS calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{NO}_9\text{SNa}$ 472.1617, encontrado 472.1627.

3.2. Síntesis del compuesto (16)

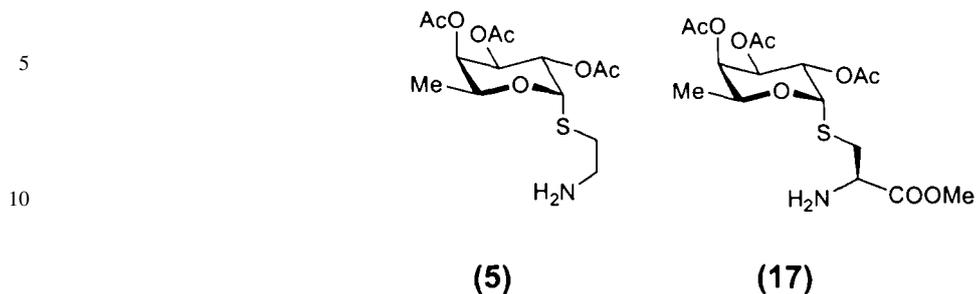


(16)

A una disolución del bromuro de 1,2,3,4-tetra-*O*-acetil- α -L-fucopiranosilo, compuesto (14), (0.74 g, 1.869 mmoles) en AcOEt (15 mL) se adicionó una disolución del éster metílico de la *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-L-cisteína (15) (0.33 g, 1.40 mmoles) en Na_2CO_3 acuoso al 10% (15 mL). A la mezcla se añadió TBAHS (1.8 g, 5.34 mmoles) y se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 h. Seguidamente la mezcla se diluyó con AcOEt y se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y de NaCl. 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 (AcOEt: éter de petróleo, 1:2) obteniéndose el derivado (16) (0.66 g, 93%) (Esquema 4).

ES 2 324 137 B2

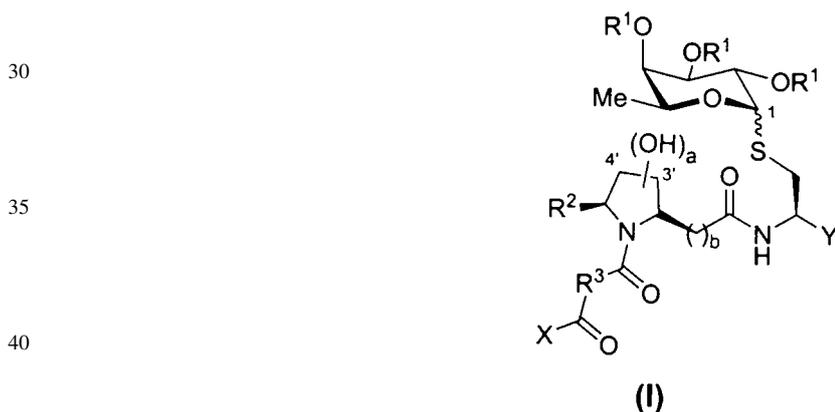
4. Procedimiento general para la obtención de los bloques de síntesis (5) y (17)



15 A una disolución de los derivados (4) ó (16) (200 mg) en diclorometano (8 ml) se añadió ácido trifluoroacético (TFA) (2 ml) para liberar el grupo protector 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) ó (17) de manera cuantitativa. Estos compuestos se emplearon directamente en el siguiente paso sin previa purificación (Esquemas 2 y 20 4, respectivamente).

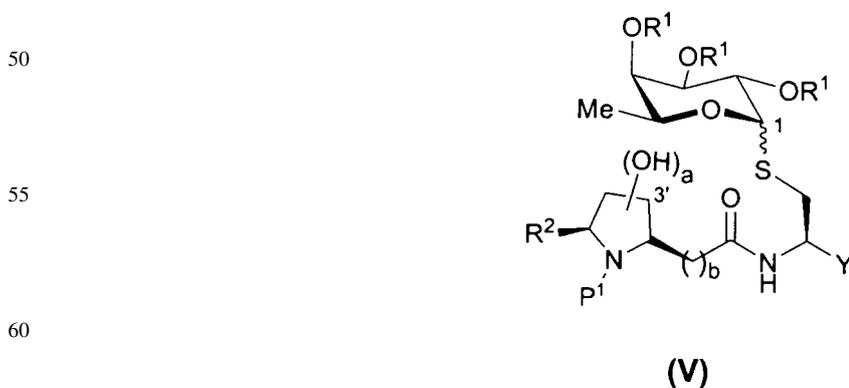
Ejemplo 2

25 *Procedimiento general para la obtención de los compuestos de estructura general (I) a partir de los compuestos (5) y (17), y de sus epímeros β*



45 R^1 , R^2 , R^3 , a, b, X e Y están definidos anteriormente.

a. *Acoplamiento entre (5)/(17), o de sus epímeros β, y el derivado hidroxiprolineo/hidroxihomoprolínico (II)*

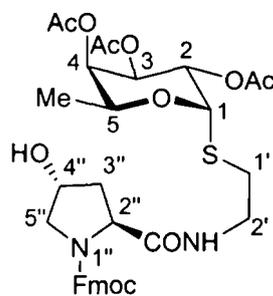


65 Se disolvió el bloque de síntesis (5)/(17) (0.71 mmol) en DMF (5 ml) y se añadió sucesivamente el correspondiente derivado hidroxiprolineo o hidroxihomoprolínico *N*-protegido con el grupo Fmoc (fluorenilmetoxicarbonil) (0.785 mmol), diisopropiletilamina (488 μ L, 2.856 mmoles) y PyBOP (hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-il-oxi) tripirrolidinofosfonio) (404 mg, 0.785 mmol). La mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 5 h. A

ES 2 324 137 B2

continuación se evaporó a sequedad y el residuo se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 1N, con disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y con NaCl saturado. 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 (éter: acetona 7:1) obteniéndose el correspondiente derivado de estructura general (V) (75-85%) (Esquemas 3 y 4).

a.1. Datos del compuesto (7)



(7)

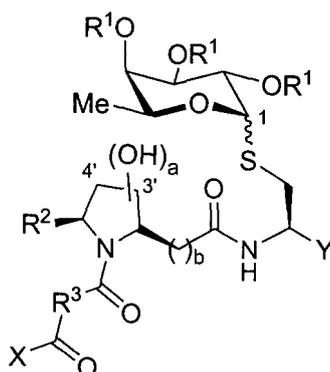
FABMS m/z 707 (100%, $[\text{M}+\text{Na}]^+$).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , 350 K, J Hz, δ ppm) δ 7.85 (d, 2H, $J = 7.6$, H-ar), 7.64 (d, 2H, $J = 7.3$, H-ar), 7.41 (t, 2H, $J = 7.3$, H-ar), 7.31 (t, 2H, $J = 7.3$, H-ar), 5.58 (d, 1H, $J_{1,2} = 5$, H-1), 5.18 (s ancho, 1H, H-4), 5.13 (dd, 1H, $J_{2,3} = 10.8$, H-2), 5.09 (d ancho, 1H, H-3), 4.4 (s muy ancho, 1H, H-5), 4.35-4.10 (m, 5 H, H-2'', H-4'', - CH_2 - de Fmoc y - CH - de Fmoc), 3.51 (dd, 1H, $J_{5''a,5''b} = 11.0$, $J_{5''a,4''} = 4.6$, H-5''a), 3.40 (d ancho, 1H, H-5''b), 3.25 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.61 (m, 2H, H-1'a y H-1'b), 2.11 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.98 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.95 (m, 2H, H-3'a y H-3'b), 1.92 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CO-}$), 1.04 (s muy ancho, 3H, CH_3 de fucosa).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , 350 K, J Hz, δ ppm) δ 171.4 (-CONH-), 169.6, 169.1, 168.9 (3 $\text{CH}_3\text{COO-}$), 143.5, 140.3, 127.2, 126.6, 124.7, 119.6 (6 C-aromat.), 81.6 (C-1), 70.2 (C-4), 67.7, 67.6, 67.1, 66.4 (C-2, C-3, C-4'', CH_2 de Fmoc), 64.5 (C-5), 58.7 (C-2''), 54.3 (C-5''), 46.5 (CH de Fmoc), 39.5 (bajo DMSO, C-3''), 38.4 (C-2'), 28.8 (C-1'), 19.9, 19.8, 19.7 (3 $\text{CH}_3\text{CO-}$), 15.1 (CH_3 de fucosa).

HRFABMS calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{11}\text{SNa}$ 707.2251, encontrado 707.2269.

b. Acoplamiento entre el derivado de estructura general (V) y el monoéster derivado del diácido malónico, succínico o glutárico



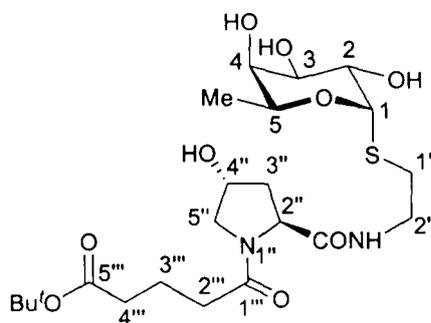
(I) (con $\text{R}^1 = \text{CH}_3\text{CO-}$)

El compuesto de estructura general (V) (0.276 mmol) se disolvió en DMF (5 mL), se añadió dietilamina (1.1 mL) y la mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 20 min. Se evaporó a sequedad y el residuo obtenido se disolvió en DMF (3.5 mL) y se le añadió sucesivamente una disolución del mono-terc-butil éster de cualquiera de los ácidos glutárico/succínico/malónico (0.33 mmol) en DMF (3.5 mL), diisopropiletilamina (114 μL , 0.66 mmol) y PyBOP (172 mg, 0.33 mmol). La mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 3 h. A continuación se evaporó a sequedad y el residuo se diluyó con CH_2Cl_2 y se lavó con HCl 1 N, con disolución acuosa saturada de NaHCO_3 y con NaCl saturado. 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 (éter:acetona 5:1) obteniéndose el correspondiente derivado de estructura general (I) (con $\text{R}^1 = \text{CH}_3\text{CO-}$) (60-70%).

ES 2 324 137 B2

c. Obtención de los productos finales desprotegidos de estructura general (I)

c.1. Síntesis del compuesto (10)



(10)

El derivado de estructura general (I) (X = OBU¹, Y = H, R¹ = CH₃CO-, R² = H, R³ = -(CH₂)₃-, a = 1, b = 0) (160 mg, 0.253 mmol) se disolvió en Bu¹OH:Et₃N:H₂O (2:1:1, 4 ml) y la mezcla se agitó durante un día a temperatura ambiente. A continuación, el disolvente se evaporó a sequedad y el crudo se purificó en columna de cromatografía de gel de sílice (diclorometano:metanol, 8:1) obteniéndose el compuesto (10) (90 mg, 70%) como una espuma blanca (Esquema 3).

$$[\alpha]_D = -177 (1.2, \text{MeOH})$$

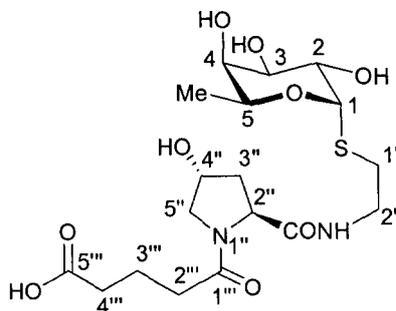
¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 298 K, J Hz, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 5.36 (d, 1H, J_{1,2} = 5.6, H-1), 4.51-4.43 (m, 2 H, H-2'' y H-4''), 4.29 (q, 1H, J_{5,CH} = 6.6 H-5), 4.06 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.1, H-2), 3.75 (dd, 1H, J_{5''a,4''} = 4.4, J_{5''a,5''b} = 10.9, H-5''a), 3.67 (d ancho, 1H, H-4), 3.60 (dd, 1H, J_{3,4} = 3.2, H-3), 3.52 (d ancho, 1H, H-5''b), 3.43 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.77-2.65 (m, 2H, H-1'a y H-1'b), 2.42 (t, 2H, J_{2''',3'''} = 7.6, H-2'''), * 2.32 (t, 2H, J_{3''',4'''} = 7.4, H-4'''), 2.27-1.83 (m, 4H, H-3''a, H-3''b y H-3'''), 1.46 (s, 9H, (CH₃)₃C-), 1.24 (d, 3H, -CH₃ de fucosa).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 298 K, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 175.1, 175.0, 174.7 (3 -CO), 88.4 (C-1), 82.0 (-C(CH₃)₃), 73.9 (C-4), 72.9 (C-3), 71.3 (C-4''), 70.0 (C-2), 68.7 (C-5), 60.9 (C-2''), 57.0 (C-5''), 41.0 (C-2'), 39.8 (C-3''), 36.0 (C-4'''), * 35.0 (C-2'''), * 31.1 (C-1'), 28.9 ((CH₃)₃C-), 21.8 (C-3'''), 17.1 (-CH₃ de fucosa).

FABMS m/z 506 (100%, [M+Na]⁺).

HRFABMS calculado para C₂₂H₃₅N₂O₉SNa 529.2195, encontrado 529.2196.

c.2. Síntesis del compuesto (11)



(11)

Se disolvió el compuesto (10) (65 mg, 0.128 mmoles) en una disolución de ácido trifluoroacético en diclorometano (20%, 5 ml) y la mezcla se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante 20 min. Al cabo de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad, obteniéndose (11) como un sólido blanco de manera cuantitativa (Esquema 3).

$$[\alpha]_D = -59 (0.75, \text{H}_2\text{O})$$

ES 2 324 137 B2

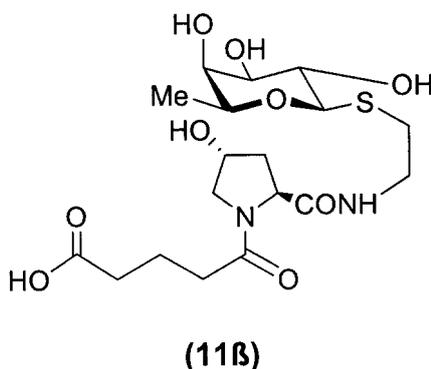
¹H-NMR (300 MHz, D₂O, 298 K, J Hz, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 5.36 (d, 1H, J_{1,2} = 5.6, H-1), 4.51 (m, 1H, H-4''), 4.39 (t, 1H, J_{2',3''a} = J_{2',3''b} = 8.6, H-2''), 4.28 (q, 1H, J_{5,CH} = 6.6, H-5), 4.00 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.4, H-2), 3.74 (m, 2H, H-5''a y H-4), 3.64 (dd, 1H, J_{3,4} = 3.3, H-3), 3.58 (d ancho, 1H, J_{5''a,5''b} = 11.6, H-5''b), 3.44-3.32 (m, 2H, H-2'a y H-2'b), 2.78-2.65 (m, 2H, H-1'a y H-1'b), 2.44-1.79 (m, 8H, H-2''', H-3''', H-4''', H-3''a y H-3''b),* 2.32 (t, 2H, J_{3''',4'''} = 7.4, H-4'''), 2.27-1.83 (m, 4H, H-3''a, H-3''b y H-3'''), 1.16 (d, 1H, -CH₃ de fucosa).

¹³C-NMR (75 MHz, D₂O, 298 K, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 180.0 (-COOH), 176.6, 176.0 (2 -CONH-), 88.2 (C-1), 73.6 (C-4), 72.2 (C-3), 71.6 (C-4''), 69.6, (C-2), 69.3 (C-5), 61.1 (C-2''), 57.4 (C-5''), 41.1 (C-2'), 39.4 (C-3'''), 35.0 (C-4'''),* 34.8 (C-2'''),* 31.5 (C-1'), 21.5 (C-3'''), 17.3 (-CH₃ de fucosa).

FABMS m/z 473 (100%, [M+Na]⁺).

HRFABMS calculado para C₁₈H₃₀N₂O₉SNa 473.1570, encontrado 473.1581.

c.3. Síntesis del compuesto (11β)



El procedimiento seguido para la síntesis de (11β) es análogo al seguido en la síntesis de su epímero (11), excepto que se empleó el compuesto (2), en lugar del compuesto (1), como producto de partida para la síntesis.

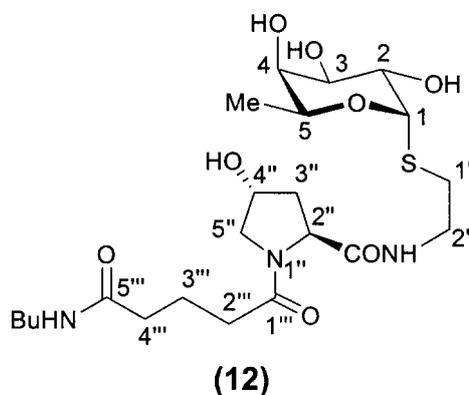
[α]_D = -10 (c 1.4, MeOH)

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 298 K, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 177.0 (-COOH), 174.7, 174.2 (2 -CONH-), 87.5 (C-1), 76.4 (C-4), 76.2 (C-3), 73.3 (C-4''), 71.2 (C-2), 70.8 (C-5), 60.5 (C-2''), 56.6 (C-5''), 40.0 (C-2'), 39.3 (C-3'''), 34.5 (C-4'''),* 33.9 (C-2'''),* 30.5 (C-1'), 21.2 (C-3'''), 17.1 (-CH₃ de fucosa).

FABMS m/z 473 (100%, [M+Na]⁺).

HRFABMS calculado para C₁₈H₃₀N₂O₉SNa 473.1570, encontrado 473.1588.

c.4. Síntesis del compuesto (12)



El derivado de estructura general (I) (X = OBU^t, Y = H, R¹ = CH₃CO-, R² = H, R³ = -(CH₂)₃-, a = 1, b = 0) (79 mg, 0.125 mmol) se disolvió en una disolución de ácido trifluoroacético en diclorometano (20%, 5 ml) y la mezcla se dejó evolucionar durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo el disolvente se evaporó a sequedad. El crudo obtenido anteriormente disuelto en dimetilformamida (1.5 ml) se añadió sobre una disolución de butilamina (25 μl, 0.21 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (42 mg, 0.31 mmol), y EDCI (60 mg, 0.31 mmol) en dimetilformamida (1.5 ml) a 0°C. La mezcla

ES 2 324 137 B2

se agitó a temperatura ambiente durante una noche. A continuación, el disolvente se evapora a sequedad, el crudo se diluyó con diclorometano (40 ml) y se lavó con disolución acuosa de HCl (1M, 15 ml), disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (15 ml), y disolución acuosa saturada de NaCl (15 ml). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a sequedad. El crudo se purificó en columna cromatográfica de gel de sílice (diclorometano:metanol, 12:1→10:1) obteniéndose el derivado de estructura general (I) (X = -NHBU, Y = H, R¹ = CH₃CO-, R² = H, R³ = -(CH₂)₃-, a = 1, b = 0, 60 mg, 76%). Este producto se disolvió en una disolución de MeOH:Et₃N:H₂O (2:1:1, 3 ml) y se dejó evolucionar a temperatura ambiente durante una noche, al cabo de este tiempo se evaporó el disolvente a sequedad, obteniéndose el compuesto (12) de manera cuantitativa como un sólido blanco (Esquema 3).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD, 298 K, J Hz, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 5.37 (d, 1H, J_{1,2} = 5.7, H-1), 4.58-4.43 (m, 2H, H-4'' y H-2''), 4.29 (q, 1H, J_{5,CH} = 6.4, H-5), 4.06 (dd, 1H, J_{2,3} = 10.1, H-2), 3.74 (dd, 1H, J_{5'a,5'b} = 11.0, J_{5'a,4''} = 4.3, H-5''a), 3.67 (d ancho, 1H, H-4), 3.60

(dd, 1H, J_{3,4} = 3.4, H-3), 3.53 (d ancho, 1H, H-5''b), 3.43 (t, 2H, J_{2',1'a} = J_{2',1'b} = 7.0, H-2'a y H-2'b), 3.19 (t, 2H, J = 6.7, CH₂ de Bu), 2.80-2.61 (m, 2H, H-1'a y H-1'b), 2.41 (t, 2H, J_{2''',3'''} = 7.2, H-2'''a y H-2'''b), * 2.25 (t, 2H, J_{4''',3'''} = 7.0, H-4'''a y H-4'''b), * 2.20 (m, 1H, H-3''a), 2.06 (m, 1H, H-3''b), 1.92 (m, 2H, H-3'''a y H-3'''b), 1.54-1.45 (m, 2H, CH₂ de Bu), 1.41-1.31 (m, 2H, CH₂ de Bu), 1.24 (d, 3H, CH₃ de fucosa), 0.95 (t, 3H, J = 7.2, CH₃ de Bu).

¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD, 298 K, δ ppm, mezcla de rotámeros) rotámero mayoritario δ 176.0, 175.2, 174.6 (3 -CONH-), 88.3 (C-1), 73.9 (C-4), 72.9 (C-3), 71.3 (C-4''), 70.0, (C-2), 68.7 (C-5), 61.0 (C-2''), 57.1 (C-5''), 40.9 (C-2'), 40.6 (-CH₂- de Bu), 39.8 (C-3''), 36.6 (C-4'''), * 34.9 (C-2'''), * 33.0 (-CH₂- de Bu), 31.1 (C-1'), 22.7 (C-3m), 21.6 (-CH₂- de Bu), 17.1 (-CH₃ de fucosa), 14.6 (-CH₃ de Bu).

FABMS m/z 528 (50%, [M+Na]⁺).

HRFABMS calculado para C₂₂H₃₉N₃O₈SNa 528.2356, encontrado 528.2348.

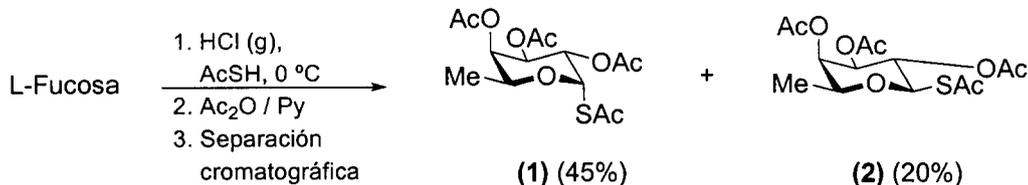
*Señales intercambiables.

c.5. Síntesis del compuesto (18)

La preparación de los compuestos de fórmula general (I) (Y = COOalquilo) (como ejemplo compuesto (18)) se realizó de manera análoga pero partiendo de derivados de tiofucosilamino ácidos (como ejemplo compuesto (17)). Para la preparación de éstos se empleó fucosa peracetilada (13) como sustancia de partida que se transformó en el 1-bromoderivado (14) por tratamiento con HBr en CH₃COOH. Después se hace reaccionar con el aminoácido L-cisteína N- y O- protegido (15) en condiciones de transferencia de fase, que produjo (16) en un 93% de rendimiento. La eliminación del grupo protector Boc (COOC(CH₃)₃) con ácido trifluoroacético acuoso al 20% (TFA) originó el tiofucosilaminoácido O-protegido (17), tal y como se describió anteriormente. La transformación de (17) en (18) es análoga a lo descrito anteriormente para transformar el compuesto (7) en (12). (Esquema 2). Se entiende transferencia de fase un procedimiento experimental que utiliza como medio de reacción un disolvente orgánico y uno acuoso, inmiscibles entre sí, y un catalizador que es un compuesto soluble en ambas fases que pone en contacto para reaccionar las sustancias disueltas en cada una de las fases inmiscibles (Esquema 4).

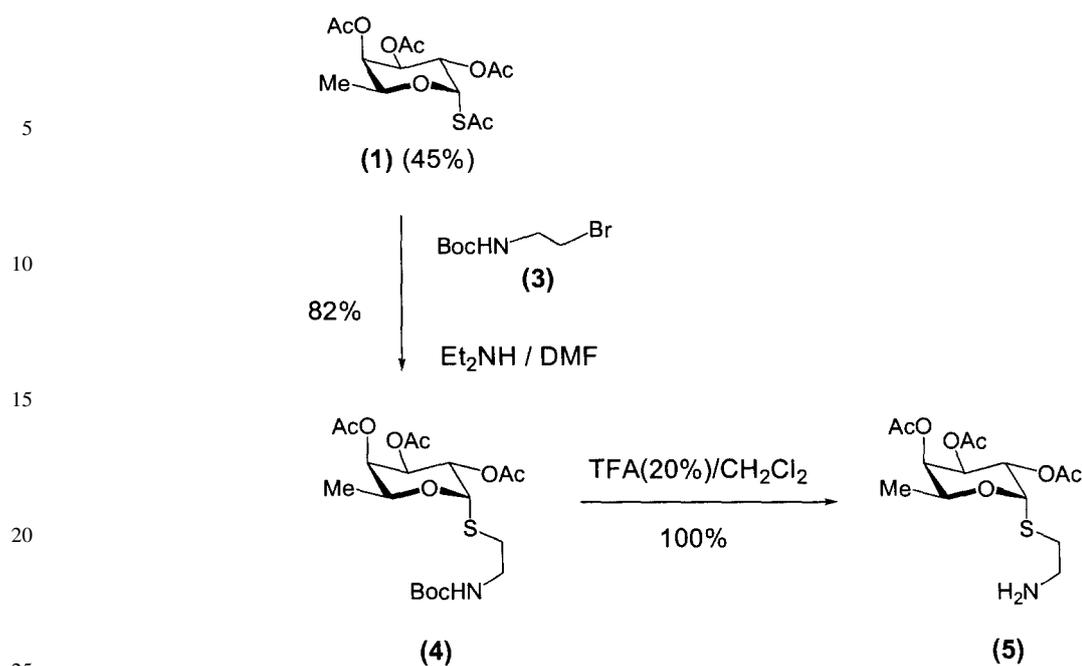
Esquemas

A continuación se detallan los esquemas de síntesis de los compuestos anteriormente descritos.

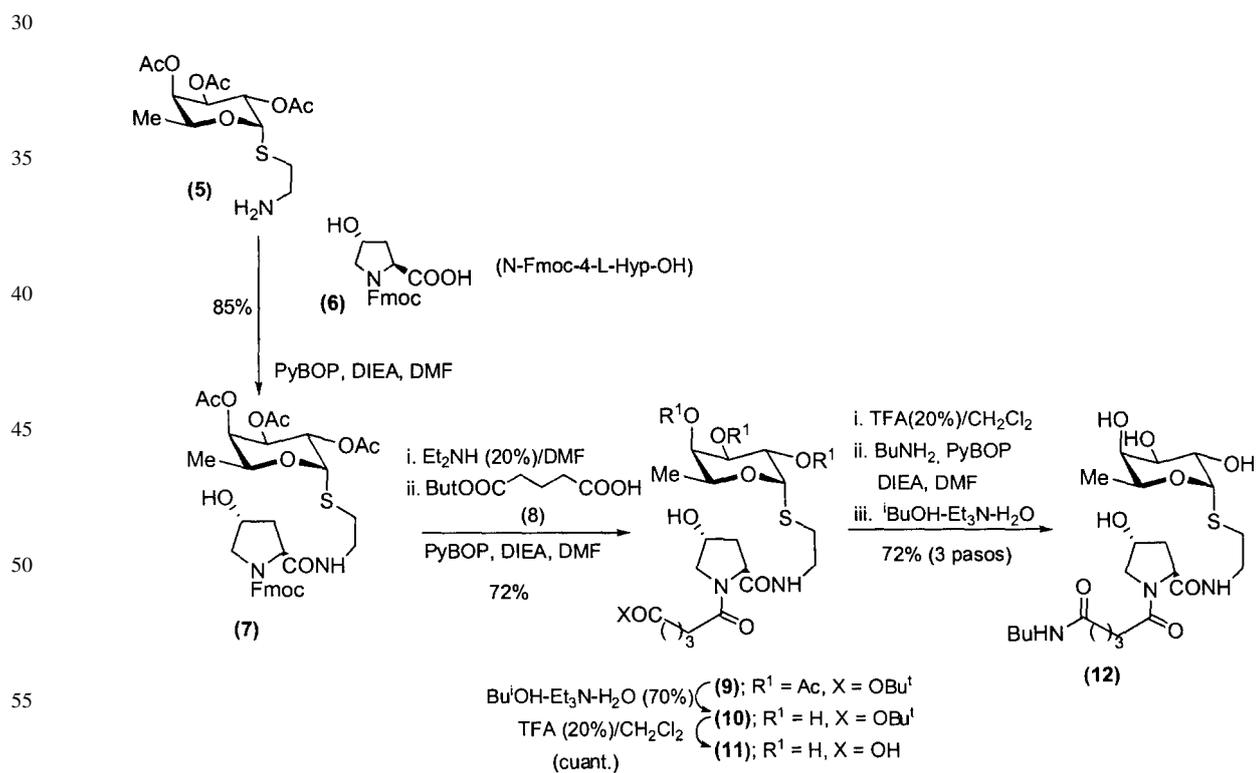


Esquema 1. Ejemplo de preparación de los compuestos (1) y (2). [AcSH es CH₃COSH, Ac₂O es CH₃COOCOCH₃ y Py es piridina].

ES 2 324 137 B2



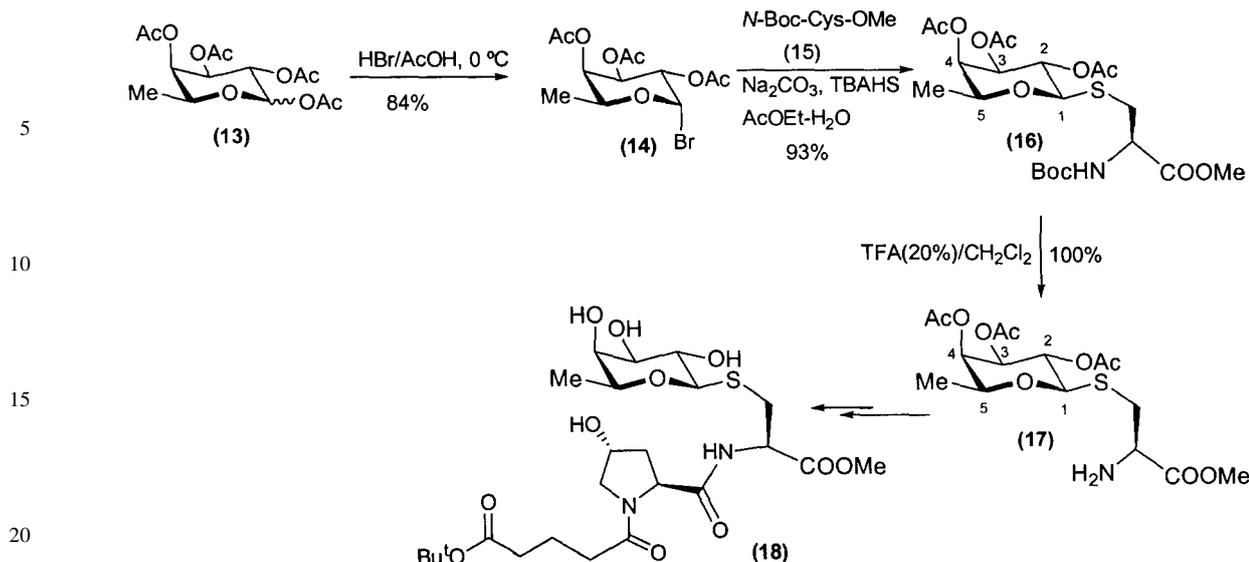
Esquema 2. Ejemplo de preparación de los compuestos (4) y (5).



Esquema 3. Ejemplo de preparación de compuestos (9), (10), (11) y (12). La síntesis de los compuestos epímeros en C-1 (β -análogos) de (9), (10), (11) y (12) se realiza de manera análoga pero partiendo del compuesto (2).

65

ES 2 324 137 B2



25 Esquema 4. Ejemplo de preparación del compuesto de fórmula general (I) (donde Y = COOR) (18). El compuesto (15) tiene la fórmula:



Ejemplo 3

40 *Ensayos biológicos*

Afinidad frente a selectinas

Método

45 SLex-BSA 2.3 $\mu\text{g/ml}$ ó PSGL1/IgG quimera 5 $\mu\text{g/ml}$ 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 incubaron durante 4 h a temperatura ambiente con E-selectina/ μ (1 $\mu\text{g/ml}$) ó P-selectina/ μ (5 $\mu\text{g/ml}$) precomplejada con inmunoglobulina biotilada de macho cabrío anti-humana IgM (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y estreptavidina-HRPO (0.6 $\mu\text{g/ml}$) en presencia del compuesto que se analizó. Después de repetidos lavados, la unión o anclaje a la selectina se reveló con hidrócloruro de *o*-fenilendiamina (0.67 mg/ml, Sigma) en presencia de 0.16% H_2O_2 . La reacción se paró con H_2SO_4 3M. OD se leyó a 490 nm.

55 Los valores de IC_{50} se calcularon usando el programa Prism de GraphPad®.

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

Cáncer

60 *Protocolo de los ensayos de citotoxicidad*

1.- *Líneas celulares*

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

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

ES 2 324 137 B2

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

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

5 2.- Cultivo celular

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 estreptomicina 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).

10 3.- Medidas de citotoxicidad (SRB)

15 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.

*GI*₅₀: Concentración que origina la inhibición del 50% de crecimiento.

20 Evaluación biológica

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:

25

TABLA 1

30 *Valores de IC₅₀ (mM) medidos para la afinidad de los miméticos de SLe^x (10), (11) y (18) hacia E- y P-Selectinas. Para las medidas se ha utilizado el Test ELISA*

35

	10	11	11β	18
E-Selectina	2.5	3.3	3.4	2.3
P-Selectina	2.3	3.2	3.2	nd

40

nd = no determinada

45

TABLA 2

50 *Valores de GI₅₀ (µM) para la actividad anticáncer del compuesto (11β)*

55

	Cáncer de mama	NSCLC (pulmón)	Cáncer de colon
11β	16.6 µM	-	-

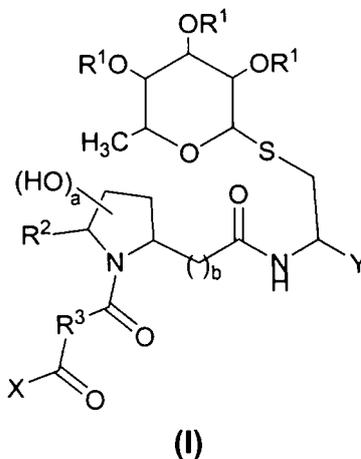
60

65

65

REIVINDICACIONES

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



donde:

X se selecciona del grupo que comprende -OR⁴ -NHR⁴, donde R⁴ se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, alquilo (C₁-C₆) o arilo (C₆-C₁₂),

R¹ se selecciona del grupo que comprende H ó -COCH₃ (Ac);

R² se selecciona del grupo que comprende H, -CH₂OH ó -CH₃;

R³ se selecciona del grupo que comprende alquilo (C₁-C₆) ó cicloalquilo (C₃-C₆);

“a” es 1 ó 2;

“b” es 0 ó 1; e

Y se selecciona del grupo que comprende H o -COOR⁵, donde R⁵ se selecciona del grupo que comprende alquilo (C₁-C₆) ó arilo (C₆-C₁₂).

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R¹ es hidrógeno.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde R⁴ es hidrógeno ó alquilo (C₄).

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R² es hidrógeno.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde a es 1.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde b es 0.

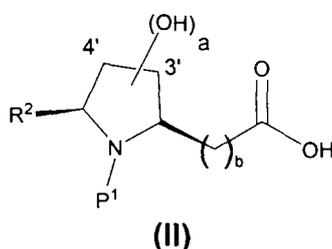
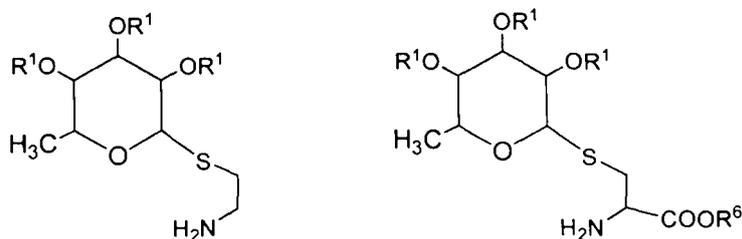
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R³ es un alquilo (C₃).

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde Y es hidrógeno ó -COOCH₃.

ES 2 324 137 B2

9. Método de obtención del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:

- a. acoplamiento de cualquiera de los siguientes compuestos de fórmula general (III) ó (IV) con el compuesto de fórmula general (II):



R⁶ es seleccionado del grupo que comprende H, alquilo (C₁-C₄) ó arilo (C₆); P¹ es un grupo protector; y R¹, R², a y b están definidos en la reivindicación 1.

- b. acoplamiento de los compuestos obtenidos en el paso (a) con derivados mono-prottegidos de los ácidos malónico, succínico o glutárico;
- c. liberación de los grupos protectores del compuesto obtenido en el paso (b) o tratamiento del compuesto del paso (b) con una base débil.

10. Método según la reivindicación anterior, que además comprende:

- d. acoplamiento del compuesto obtenido en (c) con aminas.

11. Compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso como medicamento.

12. Compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento de enfermedades que cursen con afinidad frente a E- y P-selectinas.

13. Compuesto según la reivindicación anterior donde las enfermedades se seleccionan del grupo que comprende procesos inflamatorios, cáncer, artritis, trombosis, dermatitis, inflamaciones pulmonares o afecciones cardíacas.

14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, como agente anticancerígeno en un rango de concentración μM .

15. Uso del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursen con afinidad frente a E- y P-selectinas.

16. Uso del compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como productos miméticos del sialil Lewis X (SLe^x).

17. Composición farmacéutica que comprende cualquier compuesto de fórmula general (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, además de un vehículo farmacéuticamente aceptable.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 324 137

② N° de solicitud: 200703049

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.	1-17
A	US 6111084 A (WONG et al) 29.08.2000, reivindicaciones.	1-17
A	WO 9629339 A1 (SANDOZ y THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 26.09.1996, resumen; reivindicación 1.	1-17
A	X ZHU et al, ORGANIC LETTERS 2004, vol. 6, n° 7, páginas 1083-1085. "Synthesis of novel S-Neoglycopeptides from glycosylthiomethyl derivatives", resumen.	1

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 n°:

Fecha de realización del informe

26.06.2009

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H 15/26 (2006.01)

C07H 5/10 (2006.01)

A61K 31/7056 (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,REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.06.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-17	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.