

PCT ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
 SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁵ : C07H 3/06, A61K 31/70	A1	(11) Número de publicación internacional: WO 93/09755 (43) Fecha de publicación internacional: 27 de mayo de 1993 (27.05.93)
(21) Solicitud internacional: PCT/ES92/00074 (22) Fecha de presentación internacional: 13 de noviembre de 1992 (13.11.92) (30) Datos relativos a la prioridad: P 9102522 13 de noviembre de 1991 ES (13.11.91) (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 17, E-28006 Madrid (ES). (72) Inventores; e (75) Inventores/solicitantes (sólo US) : SANTOS BENITO, Fernando, F. [ES/ES]; NIETO SAMPEDRO, Manuel [ES/ES]; Inst^a de Neurobiología "Ramón y Cajal", Doctor Arce, 37, E-28002 Madrid (ES). FERNANDEZ-MAYORALAS, Alfonso [ES/ES]; MARTIN LOMAS, Manuel [ES/ES]; Inst^a Química Orgánica General, Juan de la Cierva, 3, E-28006 Madrid (ES). (74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Consejo Superior Investigaciones Científicas, Serrano, 113, E-28002 Madrid (ES). (81) Estados designados: US, Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional. Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones. será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.</i>		
(54) Title: OLIGOSACCHARIDES USED FOR INHIBITING THE MITOSIS OF ASTROCYTES AND TUMORAL CELLS OF THE NERVOUS SYSTEM, AND METHODS FOR OBTAINING THEM (54) Título: OLIGOSACARIDOS UTILIZABLES PARA INHIBIR LA MITOSIS DE ASTROCITOS Y CELULAS TUMORALES DEL SISTEMA NERVIOSO. SU PROCEDIMIENTO DE OBTENCION (57) Abstract The method for obtaining oligosaccharides starts with the allylation of position (3') of β-lactosides followed by the controlled benzylolation which leads to perbenzylated and partially benzylated compounds. The latter are glycosylated in position 3, not benzylated, with a donor of α-L-fucopyranosyl to yield protected trisaccharides. These and perbenzylated β-lactosides are desallylated and, later, are glycosylated with a donator of 2-azido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl to yield protected tetrasaccharides and trisaccharides, respectively. The debenzylolation of said products accompanied by the reduction of the azydo group and simultaneous acetylation of the amino group produces intermediary products which, by O-desacetylation, leads respectively to the final tetrasaccharides and trisaccharides. The resulting oligosaccharides produce, in vitro, inhibition of the mitosis of astrocytes and tumoral cells of the nervous system and, for this reason, could be used for controlling the glial scar and for the treatment of tumours of the nervous system. (57) Resumen El procedimiento para obtener los oligosacáridos comienza con la alilación de la posición 3' de β-lactosidos seguida de bencilación controlada, que conduce a compuestos perbencilados y parcialmente bencilados. Los últimos se glicosilan en la posición 3, no bencilada, con un donador de α-L-fucopiranosilo para dar trisacáridos protegidos. Estos y los β-lactósidos perbencilados se desalilan y, posteriormente, glicosilan con un donador de 2-azido-2-desoxi-α-D-galactopiranosilo para dar tetrasacáridos y trisacáridos protegidos respectivamente. La desbencilación de estos productos acompañada de la reducción del grupo azido y acetilación simultánea del grupo amino dan lugar a productos intermedios que por O-desacetilación conducen, respectivamente, a los tetrasacáridos y trisacáridos finales. Los oligosacáridos obtenidos producen, in vitro, inhibición de la mitosis de astrocitos y células tumorales del sistema nervioso y, por ello, podrían utilizarse en el control de la cicatriz glial y tratamiento de tumores del sistema nervioso.		

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	FI	Finlandia	MN	Mongolia
AU	Australia	FR	Francia	MR	Mauritania
BB	Barbados	GA	Gabón	MW	Malawi
BE	Bélgica	GB	Reino Unido	NL	Países Bajos
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Noruega
BG	Bulgaria	GR	Grecia	NZ	Nueva Zelandia
BJ	Benin	HU	Hungría	PL	Polonia
BR	Brasil	IE	Irlanda	PT	Portugal
CA	Canadá	IT	Italia	RO	Rumania
CF	República Centroafricana	JP	Japón	RU	Federación de Rusia
CG	Congo	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CH	Suiza	KR	República de Corea	SE	Suecia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	República Eslovaca
CM	Camerún	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	SU	Unión Soviética
CZ	República Checa	MC	Mónaco	TD	Chad
DE	Alemania	MG	Madagascar	TG	Togo
DK	Dinamarca	ML	Mali	UA	Ucrania
ES	España			US	Estados Unidos de América

MEMORIA DESCRIPTIVA

Título

Oligosacaridos utilizables para inhibir la mitosis de astrocitos y celulas tumorales del sistema nervioso. Su procedimiento de obtención.

5

Campo de la técnica

Oligosacáridos (C07H3) y preparaciones medicamentosas que contienen ingredientes orgánicos activos (A61K31).

10 Introducción

La muerte o lesión neuronal está siempre asociada con un aumento en el número, tamaño y apariencia fibrosa de los astrocitos. La transición de los astrocitos del estado quiescente al estado reactivo tiene gran importancia desde el punto de vista clínico porque da lugar a la formación de la cicatriz glial que es uno de los principales problemas para la recuperación funcional del sistema nervioso central. Después de una lesión la proliferación de astrocitos precede al crecimiento de axones e impide su paso a través del area dañada, lo que hace imposible el restablecimiento de las sinapsis. Por tanto, la reparación del sistema nervioso central requiere la intervención externa para modificar el transcurso relativo de la proliferación glial y el crecimiento axonal. Así, resulta de gran importancia la purificación de las sustancias naturales involucradas en el control de la división de las células gliales o la síntesis de moléculas similares a dichas sustancias naturales.

En estudios recientes hemos demostrado la existencia en cerebro de rata sana de inhibidores de la mitosis de astrocitos cuyos niveles disminuyen considerablemente después de una lesión y también hemos postulado que el dominio estructural responsable de la inhibición posiblemente sea un carbohidrato complejo relacionado con los grupos sanguíneos A H o Lewis [Nieto-Sampedro, M. and Broderick, J.T. (1988) A soluble brain molecule related to epidermal growth factor receptor is a mitogen inhibitor for astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **22**: 28-35]. Además hemos comprobado que oligosacáridos de estructuras similares a los grupos sanguíneos son capaces de inhibir la proliferación de astrocitos in vitro.

Estado de la técnica

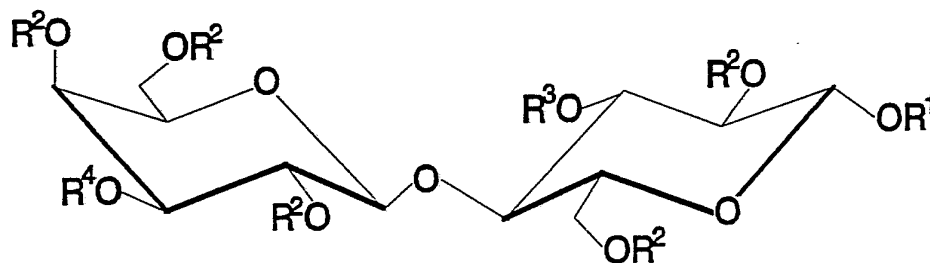
La patente europea EP 0394971 (de 31/10/90) reivindica el uso de *Inhibidores, conteniendo oligosacáricos, del crecimiento de células endoteliales y angiogenesis*. La patente se refiere a compuestos conteniendo de 6 a 8 sacáridos en su molécula. Puede también citarse la patente europea EP 0208623 (de 14/01/87) titulada *Uso de poli y oligosacáridos para obtención de medicamentos activos en la patología de los tejidos conjuntivos*.

Los compuestos objeto de la presente invención son nuevos y por consiguiente no hay nada publicado referente a su síntesis.

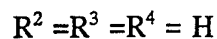
10 Descripción de la invención

En esta patente se describe un procedimiento de obtención de oligosacáridos inhibidores de la mitosis de astrocitos y células tumorales del sistema nervioso, probablemente análogos de inhibidores naturales, y la investigación de su actividad inhibitoria.

Se han preparado trisacáridos de fórmula general 8 y tetrasacáridos de fórmula general 13 a partir de β -lactósidos de fórmula general 1. Los intermediarios comunes para la síntesis de productos de tipo 8 y 13 (compuestos de fórmula general 2) han sido los 3'-O-alil- β -lactósidos obtenidos a partir de 1 previa activación selectiva de la posición 3' con óxidos de alquil estaño y posterior alilación. La bencilación controlada de los compuestos de tipo 2 da lugar a compuestos perbencilados (3) y a productos parcialmente bencilados (4). Los compuestos de tipo 3 se han utilizado en la síntesis de los trisacáridos de tipo 8 y los compuestos de tipo 4 se han utilizado en la síntesis de los tetrasacáridos de tipo 13.



1 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo



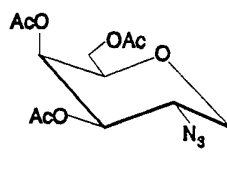
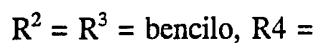
- 2 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo
 $R^2 = R^3 = H$, $R^4 =$ alilo

- 3 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo
 5 $R^2 = R^3 =$ bencilo, $R^4 =$ alilo

- 4 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo
 $R^2 =$ bencilo, $R^3 = H$ $R^4 =$ alilo

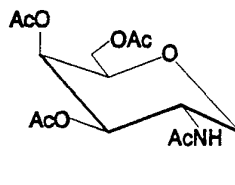
- 5 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo
 10 $R^2 = R^3 =$ bencilo, $R^4 = H$

- 6 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo

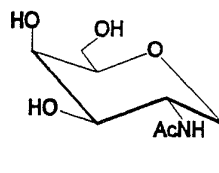


- 7 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o
 $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo

- 20 $R^2 = R^3 = H$, $R^4 =$



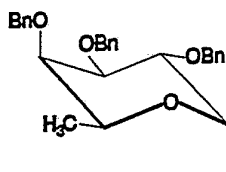
- 8 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo
 25 $R^2 = R^3 = H$, $R^4 =$



- 30 9 $R^1 = C_1 - C_8$ n-alquilo, o $(CH_2)_7-CO_2Me$, o $(CH_2)_7NCBz$, o arilo

$R^2 = \text{bencilo}, R^3 =$

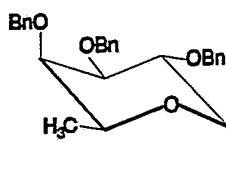
$R^4 = \text{alilo}$



5

10 $R^1 = C_1 - C_8 \text{ n-alquilo, o } (CH_2)_7-CO_2Me, \text{ o } (CH_2)_7NCBz, \text{ o arilo}$

$R^2 = \text{bencilo}, R^3 =$

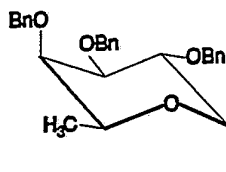


10

$R^4 = H$

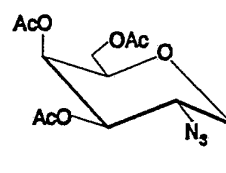
11 $R^1 = C_1 - C_8 \text{ n-alquilo, o } (CH_2)_7-CO_2Me, \text{ o } (CH_2)_7NCBz, \text{ o arilo}, R^2 = \text{bencilo},$

$R^3 =$



15

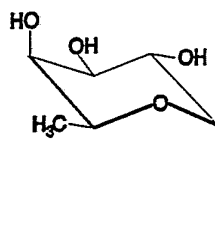
$R^4 =$



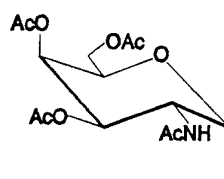
20

12 $R^1 = C_1 - C_8 \text{ n-alquilo, o } (CH_2)_7-CO_2Me, \text{ o } (CH_2)_7NCBz, \text{ o arilo}$

$R^2 = H, R^3 =$

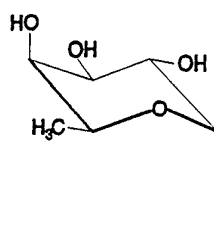


30

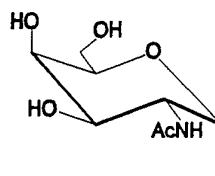
R⁴ =

5

13 R¹ = C₁-C₈ n-alquilo, o (CH₂)₇-CO₂Me, o (CH₂)₇NCBz, o arilo

R² = H, R³ =

10

R⁴ =

15

20

Los compuestos de fórmula general 3 se han sometido a dasalilación para dar compuestos de tipo 5 que se han glicosilado con un donador de 2-azido-2-desoxi- α -D-galactopiranosilo dando los trisacáridos protegidos de tipo 6. La reducción del grupo azido acompañada de desbencilación con acetilación simultanea del grupo amino dio lugar a intermedios del tipo 7 que tras O-desacetilación condujeron a los trisacáridos de tipo 8.

Los compuestos de fórmula general 4 se han glicosilado con un donador de α -D-fucopiranosilo para dar los trisacáridos protegidos de tipo 9 que por desalilación han conducido a compuestos de fórmula general 10. Los compuestos de tipo 10 se han sometido a una segunda reacción de glicosilación con un donador de 2-azido-2-desoxi- α -D-galactopiranosilo para dar los tetrasacáridos protegidos de tipo 11. La desbencilación de los productos de tipo 11 con reducción concomitante del grupo azido y N-acetilación simultanea del grupo

30

amino condujo a los intermedios de tipo 12 que por O-desacetilación dieron lugar, finalmente, a los tetrasacáridos de tipo 13.

La actividad inhibitoria de los oligosacáridos sintetizados se ha investigado analizando sus efectos sobre la incorporación de timidina al DNA en diferentes células del sistema nervioso durante el proceso de división celular. Los resultados indican que compuestos de este tipo tienen una potencial aplicación como inhibidores de la división celular, particularmente en el control de la aparición de la cicatriz glial y en el tratamiento de tumores del sistema nervioso.

Los siguientes ejemplos ilustran el proceso sintético y muestran las mediciones de actividad biológica con algunos de los productos preparados. Debe ser entendido, sin embargo, que la invención no está limitada a los reactivos y condiciones mostrados en los ejemplos.

Ejemplos

Preparación del trisacárido 8

Una mezcla de metil β -lactósido (1 con $R^1 = \text{Me}$, 17.26 g, 45.24 mmol), óxido de dibutilestaño (14.62 g, 58.75 mmol) y tamiz molecular tipo 3Å (58 g) en acetonitrilo (975 ml) se calentó a reflujo con agitación durante 14 h. Posteriormente, se añadieron bromuro de tetrabutilamonio (7.21 g, 22.38 mmol) y bromuro de alilo (55.2 g, 0.45 mol) y se continuó la calefacción. Al cabo de 9 h se añade más bromuro de tetrabutilamonio (2.4 g, 7.5 mmol) y bromuro de alilo (19 g, 0.15 mol) y se dejó continuar la reacción durante 14 h adicionales. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. Al residuo se adicionó acetato de etilo y el sólido precipitado de metil 3'-alil- β -lactósido (2 con $R^1 = \text{Me}$, 7.27 g) se filtró. El filtrado se concentró y al residuo resultante se adicionó metanol hasta aparecer un sólido cristalino que se filtró y desechó. El filtrado se evaporó a sequedad y se fraccionó en una columna de gel de sílice empleando acetato de etilo-metanol (6:1 $\rightarrow$ 3:2) como eluyente. Se obtuvo una fracción que contiene 2 (5.82 g) que se juntó con el obtenido anteriormente.

El compuesto **2** (5 g, 14 mmol) se trató con cloruro de bencilo (30 ml) en presencia de hidróxido potásico (9 g) y la mezcla se calentó a 100 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar, se diluyó con cloroformo (150 ml) y se lavó sucesivamente con agua, H₂SO₄ 1M y agua. La disolución clorofórmica se secó (Na₂SO₄) y evaporó. El residuo se pasó a través de una columna de gel de sílice empleando hexano-acetato de etilo (1:0 → 4:1) como eluyente. Se obtuvo primero el compuesto **3** (R¹ = Me) (4.90 g, 41%) y a continuación **4** (R¹ = Me) (2.92 g, 28%).

El compuesto **3** (5 g, 5.34 mmol) se disolvió en una mezcla de acetato de etilo-etanol-ácido acético-agua (2:2:1:1, 60 ml) y se calentó a 80-90 °C con agitación en presencia de catalizador de Pd al 10% sobre carbón activo (200 mg). Al cabo de 10 h el Pd/C se filtró, se lavó con cloroformo y el filtrado y aguas de lavado se juntaron y lavaron con una disolución acuosa de NaHCO₃ y, posteriormente, agua. La fase orgánica se concentró y el residuo se cromatografió en una columna de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 5:1 → 3:1) para obtener **5** (R¹ = Me) (2.61 g, 55%).

Una mezcla de **5** (1.5 g, 1.67 mmol), cianuro mercuríco (2.41 g, 9.53 mmol), bromuro mercuríco (3.48 g, 9.65 mmol) y tamiz molecular tipo 4 Å en diclorometano (85 ml), se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 1 h. Al cabo de este tiempo, se adicionó bromuro de 3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2-desoxi- α -D-galactopiranosilo (0.77 g, 1.95 mmol) disuelto en diclorometano (5 ml) y se continuó la agitación. Pasadas 13 y 22 horas se adicionó más bromuro de galactopiranosilo (0.85 g, en cada adición) y la reacción se dejó estar durante 60 h, tras lo cual se filtró y el filtrado se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de NaI al 10%, NaHCO₃ saturada y agua. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄) y evaporó. El sirupo resultante se pasó a través de una columna de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 3:1 → 7:4) para dar lugar a **6** (R¹ = Me) (1.7 g, 87%) como un sirupo. [a]_D²⁰ +61.2° (c = 0.7, cloroformo).

El compuesto **6** (1.75 g, 1.45 mmol) disuelto en etanol (100 ml) en presencia de anhídrido acético (2 ml) se hidrogenó empleando catalizador de paladio sobre carbón activo (1 g) durante 4 días. La suspensión se filtró sobre celita y el filtrado se concentró a sequedad para dar un sirupo que se purificó sobre una columna de gel de sílice (cloroformo-metanol

8:1). Se obtuvo **7** ($R^1 = \text{Me}$) (0.75 g, 75%). P.f. 149–151 °C, $[\alpha]_D +94.0^\circ$ ($c = 0.6$, metanol). Este compuesto se disolvió en una solución 0.1 M de metóxido sódico en metanol (4 ml) a temperatura ambiente, se dejó estar durante 30 min y a continuación se trató con amberlita IR-120 (H^+) hasta neutralidad, se filtró y se concentró a sequedad para dar el trisacárido **8** ($R^1 = \text{Me}$) (0.54 g, 95%), como un sólido. P.f. 293–298 °C, $[\alpha]_D +124.5^\circ$ ($c = 0.5$, agua).

Preparación del tetrasacárido **13**

Una mezcla de **4** ($R^1 = \text{Me}$) (2.94 g, 3.48 mmol) (obtenido de la bencilación de **2**), bromuro mercuríco (0.4 g, 1.11 mmol), tamiz molecular 4Å (5.7 g) en diclorometano (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Pasado este tiempo, se adicionó bromuro de 2,3,4-tri-O-bencil- α -L-fucopiranosilo (2.4 g, 4.83 mmol) disuelto en diclorometano (40 ml) lentamente durante 5 h y se continuó la agitación durante 1 h adicional, tras lo cual, la mezcla de reacción se filtró sobre celita, se lavó sucesivamente con disoluciones acuosas de KI al 10%, NaHCO_3 saturada y agua. La fase orgánica se secó (Na_2SO_4) y evaporó a sequedad. El residuo siruposo se pasó a través de una columna de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 5:1) para obtener **9** ($R^1 = \text{Me}$) (3.94 g, 84%) como un sirupo. $[\alpha]_D -40.3^\circ$ ($c = 0.7$, cloroformo).

El compuesto **9** (3.57 g, 2.83 mmol) disuelto en acetato de etilo (28 ml) y etanol 95% (140 ml), se trató con ácido p-toluensulfónico (0.28 g) y catalizador de paladio sobre carbón activado (0.52 g). La mezcla se calentó a 80 °C con agitación durante 1 h y 30 min, pasado este tiempo se filtró sobre celita, se adicionó trietilamina (0.5 ml) y se evaporó. El sirupo resultante se cromatografió sobre una columna de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 4:1) dando lugar a **10** ($R^1 = \text{Me}$) (2.24 g, 65%), $[\alpha]_D -40.8^\circ$ ($c = 0.6$, cloroformo).

25

Una mezcla de **10** (2.12 g, 1.73 mmol), cianuro mercuríco (2.1 g, 8.31 mmol), bromuro mercuríco (3.04 g, 8.43 mmol), tamiz molecular 4Å (11.4 g) en diclorometano (76 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, tras la cual, se añadió una disolución de bromuro de 3,4,6-tri-O-acetil-2-azido-2-desoxi- α -D-galactopiranosilo (2 g, 5.07 mmol) disuelto en diclorometano (40 ml) y se continuó la agitación. Al cabo de 20, 30, 52 y 76 h se adicionó más bromuro de galactopiranosilo (0.4, 0.43, 0.23 y 0.2 g respectivamente) y, después de 92 h, más $\text{Hg}(\text{CN})_2$ y HgBr_2 (1.05 y 1.52 g, respectivamente). Pasadas 120 h, la

30

mezcla de reacción se filtró sobre celita, se lavó con disoluciones acuosas de KI al 10%, NaHCO₃ saturada y agua. La solución orgánica se evaporó a sequedad y el residuo se pasó a través de una columna de gel de sílice (hexano-acetato de etilo 3:1 → 7:4). Se obtuvo **11** (R¹ = Me) (2.22 g), impurificado con el bromuro de galactopiranosilo, que se utilizó en la
5 siguiente etapa. Esta fracción (2.17 g) se disolvió en etanol absoluto (100 ml) conteniendo anhídrido acético (1.5 ml) y se trató con hidrógeno en presencia de catalizador de paladio sobre carbón activo (0.5 g) durante 60 h. La suspensión se filtró sobre celita y se evaporó a sequedad. El residuo se fraccionó en columna de gel de sílice (cloroformo-metanol 6:1) y se obtuvo **12** (R¹ = Me) (0.86 g, 74%) como un sólido. P.f. 162–167°C, [α]_D +28.2° (c = 0.9,
10 metanol).

El compuesto **12** (0.81 g, 0.97 mmol) se trató con una disolución 0.1M de metóxido sódico en metanol (150 ml) durante 30 min. La mezcla de reacción se neutralizó con amberlita IR-120 (H⁺) y se evaporó. Se obtiene **13** (R¹ = Me) (0.69 g, 100%), como un sólido. P.f.
15 165–167°C, [α]_D +33.8° (c = 0.4, agua).

Actividad biológica de los compuestos **8** y **13**

La inhibición de la mitosis producida por los oligosacaridos sintetizados se comprobó in vitro midiendo la incorporación de timidina tritiada [Nieto-Sampedro, M. (1987) Astrocyte
20 mitogenic activity in aged normal and alzheimer's human brain. *Neurobiol. Aging*. 8: 249–252] en cultivos de astrocitos preparados según el método de McCarthy y de Vellis [McCarthy, K.D. and de Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell. Biol.* 85: 890–902] y en cultivos de células tumorales del sistema nervioso. Las tablas 1 y 2 recogen los ejemplos concretos de las inhibiciones
25 producidas por los compuestos **8** y **13** a diferentes concentraciones sobre astrocitos y las líneas celulares A7 (glioma), N₂A y N1E 115 (neuroblastomas).

5

10

TABLA 1				
Inhibición de la incorporación de timidina (% respecto al control) producida en diferentes células por el compuesto 8 ($R^1 = \text{Me}$)				
Conc (μM)	Astrocitos	A7	N2A	N1E 115
1000.0	89.2	79.5	72.1	87.3
500.0	69.6	55.9	53.2	73.8
250.0	51.3	41.3	45.7	54.4
125.0	40.3	19.8	21.6	21.8
62.5	24.8	7.7	9.6	11.3
31.3	16.0	0.0	0.0	0.0
15.6	9.9	0.0	0.0	0.0

15

20

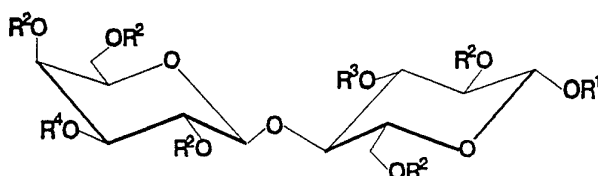
25

TABLA 2				
Inhibición de la incorporación de timidina (% respecto al control) producida en diferentes células por el compuesto 13 ($R^1 = \text{Me}$)				
Conc (μM)	Astrocitos	A7	N2A	N1E 115
1000.0	100.0	90.5	100.0	100.0
500.0	95.4	79.2	95.1	96.4
250.0	83.1	69.4	73.8	64.4
125.0	57.8	36.5	46.3	40.8
62.5	47.9	23.1	38.2	22.6
31.3	35.2	18.8	11.2	8.9
15.6	18.7	9.8	4.1	0.0

REIVINDICACIONES

1. Oligosacáridos útiles para inhibir la mitosis de astrocitos y células tumorales del sistema nervioso de fórmula general

5



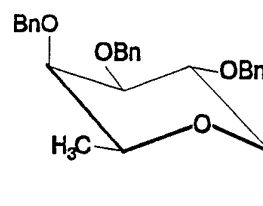
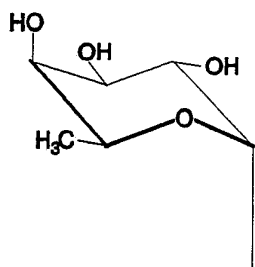
10 donde

$R^1 = C_1-C_8$ n-alquilo, ó $(CH_2)_7-CO_2Me$, ó $(CH_2)_7-NCBz$, o arilo

$R^2 = H$, ó bencilo

$R^3 = H$, ó bencilo ó

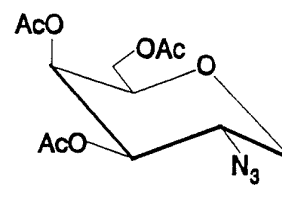
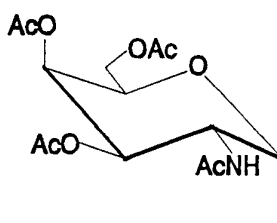
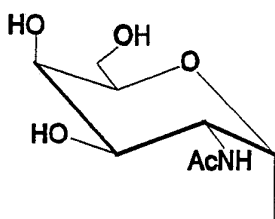
15



20

ó

$R^4 = H$, ó alilo, ó



ó

ó

25

2. Procedimiento de obtención de oligosacáridos de fórmula según reivindicación 1, caracterizado porque en la primera etapa de la reacción, unos β -lactósidos de fórmula general β -D-

Gal-(1→4)-β-D-Glc-R (Gal = galactosa, Glc = glucosa, R = C₁ - C₈ n-alquilo ó (CH₂)₇-CO₂Me ó (CH₂)₇NCBz o arilo) se alilan selectivamente en la posición 3'. Los 3'-O- alil β-lactósidos resultantes se bencilan controladamente en la segunda etapa para dar dos tipos diferentes de productos, unos totalmente bencilados que se utilizan en la preparación de

5 trisacáridos de fórmula general α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-R (GalNAc = N-acetilgalactosamina), otros parcialmente bencilados, posición 3 no bencilada, que se utilizan en la preparación de los tetrasacáridos de fórmula general α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-[α-L-Fuc-(1→3)]-β-D-Glc-R (Fuc = fucosa). Los β-lactósidos totalmente bencilados se someten en la tercera etapa a una desalilación y, en la cuarta etapa,

10 a una α-glicosilación estereoselectiva de la posición 3' con un donador de 2-azido-2-desoxi-α-D-galactopiranosilo para dar los trisacáridos de fórmula general α-D-GalN₃-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-β-D-Glc-R protegidos (GalN₃ = 2-azido-2-desoxi-galactosa). Estos trisacáridos, en la quinta y sexta etapas se reducen, desbencilan, N-acetilan y O-desacetilan para dar los trisacáridos de fórmula general α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-

15 β-D-Glc-R. Los β-lactósidos no bencilados en la posición 3 se someten en la séptima etapa a una α-glicosilación estereoselectiva para dar los trisacáridos β-D-Gal-(1→4)-[α-L-Fuc-(1→3)]-β-D-Glc-R protegidos. En la octava etapa estos trisacáridos se desalilan y en la novena etapa se α-glicosilan estereoselectivamente con un donador de 2-azido-2-desoxi-α-D-galactopiranosido para dar los tetrasacáridos α-D-GalN₃-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-[α-

20 L-Fuc-(1→3)]-β-D-Glc-R protegidos. Estos últimos compuestos se desbencilan, reducen y N-acetilan en la décima etapa y por O-desacetilación en la undécima etapa conducen a los tetrasacáridos de fórmula general α-D-GalNAc-(1→3)-β-D-Gal-(1→4)-[α-L-Fuc-(1→3)]-β-D-Glc-R.

25 3. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la primera etapa la posición 3' de β-lactósidos, preferentemente metilβ-lactósido, se alila selectivamente con un haluro de alilo, preferentemente bromuro de alilo, en acetonitrilo previa activación con óxidos de alquil estaño en presencia de tamiz molecular.

30 4. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la segunda etapa 3'-O-alil β-lactósidos se protegen controladamente empleando un haluro de bencilo,

preferentemente cloruro de bencilo, en presencia de una base, como hidróxido potásico, a una temperatura de 100°C.

5. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la tercera etapa tiene
5 lugar una desalilación del 3-O-alil β -lactósido bencilado, disuelto previamente en un azeotropo, calentando entre 80-90°C y en presencia de catalizadores de rodio, iridio, o paladio sobre carbón activo.
6. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la cuarta etapa se lleva
10 a cabo una α -glicosilación empleando un haluro o un tricloroacetimidato de 3,4,6-tri-O-acil-2-azido-2-desoxi-D-galactopiranosilo en presencia de ácidos de Lewis, particularmente trifluoruro de boro eterato o triflato de trimetil sililo.
7. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la quinta etapa la
15 desbencilación y reducción simultaneas del grupo azido y la acetilación de la amina resultante se realiza utilizando hidrógeno en presencia de un catalizador de paladio sobre carbón activo y anhídrido acético.
8. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la sexta etapa se realiza
20 una O-desacetilación con metóxido sódico en metanol, en presencia de una resina cambiadora, para la obtención del trisacárido correspondiente.
9. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la séptima etapa se lleva
a cabo una α -fucosilación selectiva empleando un haluro o un tricloroacetimidato de
25 2,3,4-tri-O-bencil fucopiranosilo en presencia de un catalizador de plata o mercurio o de un ácido de Lewis, particularmente trifluoruro de boro eterato o triflato de trimetil sililo.
10. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la octava etapa la
desalilación de los trisacáridos se realiza empleando un catalizador de rodio, iridio, o paladio
30 sobre carbón activo, en presencia de ácido p-toluensulfónico.

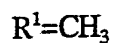
11. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la novena etapa la glicosilación se lleva a cabo empleando un haluro, preferentemente bromuro mercurico, o un tricloroacetimidato de 3,4,6-tri-O-acil-2-azido-2-desoxi-D-galactopiranosilo, en presencia de un catalizador de mercurio o de plata, o en presencia de un ácido de Lewis, particularmente trifluoruro de boro eterato o triflato de trimetil sililo.

12. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la décima etapa la desbencilación y reducción simultánea del grupo azido y la acetilación de la amina resultante se realiza utilizando hidrógeno en presencia de un catalizador de paladio y anhídrido acético.

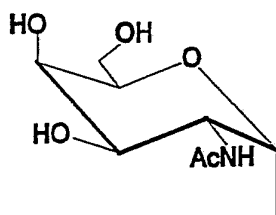
10

13. Un procedimiento según reivindicación 2 caracterizado porque en la undécima etapa se realiza una O-desacetilación con metóxido sódico en metanol, en presencia de amberlita, para la obtención del tetrasacárido correspondiente.

15 14. Oligosacáridos de fórmula según la reivindicación 1 y obtenidos según procedimiento de reivindicaciones 2 a 13, con radicales específicos



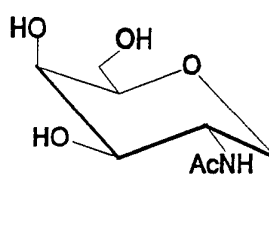
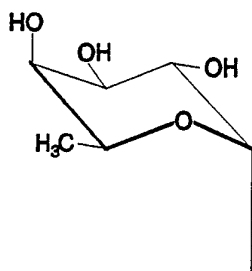
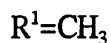
20



para su aplicación como inhibidores en el tratamiento de tumores del sistema nervioso y en el control de la cicatriz glial, caracterizados porque han demostrado actividad inhibidora, in vitro, de la mitosis de astrocitos y células tumorales del sistema nervioso de la rata, medida

en tanto por ciento sobre la incorporación de timidina al DNA respecto al control del 72.1% al 9.6%, para concentraciones micromolares de 1000.0 a 62.5.

15. Oligosacáridos de fórmula según reivindicación 1 y obtenidos según procedimiento de reivindicaciones 2 a 13, con radicales específicos



10

para su aplicación como inhibidores en el tratamiento de tumores del sistema nervioso y en el control de la cicatriz glial, caracterizados porque han demostrado actividad inhibidora, in vitro, de la mitosis de astrocitos y células tumorales del sistema nervioso de la rata, medida en tanto por ciento sobre la incorporación de timidina al DNA respecto al control del 100.0% al 4.1%, para concentraciones micromolares de 1000.0 a 15.6.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 92/00074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5: C07H 3/06; A61K 31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5: C07H; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CARBOHYDRATE RESEARCH Vol. 100, 1982, AMSTERDAM NL pages 87 - 101 HAYES M.L. 'Methyl .beta.-lactoside: 600 MHz ¹ H and 75-MHz ¹³ C-N.M.R. studies of ² H and ¹³ C enriched compounds' see page 87 - page 88	1
P, X	----- CARBOHYDRATE RESEARCH Vol. 230, 1992, AMSTERDAM NL pages 185 - 190 SANTOS-BENITO F.F. ET AL 'Synthesis of oligosaccharide inhibitors of neural cell division.' see the whole document ----- -/-	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 March 1993 (29.03.93)

Date of mailing of the international search report

28 April 1993 (28.04.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 92/00074

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCIENCE Vol. 240, 1988, LANCASTER, PA US page 1784 - 1786 NIETO-SAMPEDRO 'Astrocyte Mitogen Inhibitor Related to Epidermal Growth Factor Receptor' see the whole document -----	1
A	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH Vol. 22, No. 1, January 1989, NEW YORK, NY USA page 28 - 35 NIETO-SAMPEDRO M. AND BRODERICK J.T. 'A Soluble Brain Molecule Related to Epidermal Growth Factor Receptor is a Mitogen Inhibitor for Astrocytes' see the whole document -----	1
A	DE, A, 3 032 636 (MEITO SANGKYO K.K.) 9 April 1981 see claims -----	1

ES 9200074
SA 67201

29/03/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-3032636	09-04-81	JP-A- 56034701	07-04-81
		GB-A, B 2061306	13-05-81
		US-A- 4398023	09-08-83

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 92/00074

I. CLASIFICACION DE LA INVENCION (caso de ser aplicables varios simbolos de clasificación, indicarlos todos) ⁶

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

CIP. 5 C07H3/06; A61K31/70

II. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada ⁷

Sistema de clasificación	Símbolos de clasificación
CIP. 5	C07H ; A61K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda ⁸

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES ⁹

Categoría *	Identificación de los documentos citados, ¹¹ con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes ¹²	N° de las reivindicaciones a las que se refieran ¹³
X	CARBOHYDRATE RESEARCH. vol. 100, 1982, AMSTERDAM NL páginas 87 - 101 HAYES M.L. ET AL 'Methyl .beta.-lactoside: 600 MHz 1H and 75-MHz 13C-N.M.R. studies of 2H and 13C enriched compounds' ver página 87 - página 88 ---	1
P,X	CARBOHYDRATE RESEARCH. vol. 230, 1992, AMSTERDAM NL páginas 185 - 190 SANTOS-BENITO F.F. ET AL 'Synthesis of oligosaccharide inhibitors of neural cell division.' ver el documento completo --- -/-	1-15

* Categorías especiales de documentos citados: ¹⁰

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de prioridad y que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse como nueva ni que implique una actividad inventiva

"Y" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de parentes

IV. CERTIFICACION

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 29 MARZO 1993	Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional 28. 04. 93
Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA EUROPEA DE PATENTES	Firma del funcionario autorizado DAY G.J.

EPO FORM (P0436)

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES (CONTINUACION DE LOS DATOS INDICADOS EN LA SEGUNDA HOJA)		
Categoría *	Identificación de los documentos citados, con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones a las que se refieran
A	SCIENCE vol. 240, 1988, LANCASTER, PA US páginas 1784 - 1786 NIETO-SAMPEDRO 'Astrocyte Mitogen Inhibitor Related to Epidermal Growth Factor Receptor' ver el documento completo ---	1
A	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH vol. 22, núm. 1, Enero 1989, NEW YORK, NY USA páginas 28 - 35 NIETO-SAMPEDRO M. AND BRODERICK J.T. 'A Soluble Brain Molecule Related to Epidermal Growth Factor Receptor is a Mitogen Inhibitor for Astrocytes' ver el documento completo ---	1
A	DE,A,3 032 636 (MEITO SANGYO K.K.) 9 Abril 1981 ver reivindicaciones -----	1

ES 9200074
SA 67201

29/03/93

EOP Formulario P0444

Para mayor información sobre este anexo: ver el Diario Oficial de la Oficina Europea de Patentes, n° 12/82