



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 625**

(51) Int. Cl.:
C08B 37/00 (2006.01)
A61K 31/715 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01972171 .1**
(86) Fecha de presentación : **20.09.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1322673**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2003**

(54) Título: **Polisacáridos con actividad antitrombótica que comprenden al menos un enlace covalente con la biotina o un derivado de la biotina.**

(30) Prioridad: **22.09.2000 FR 00 12094**

(73) Titular/es: **Sanofi-Aventis**
174, avenue de France
75013 Paris, FR

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

(72) Inventor/es: **Duchaussoy, Philippe;**
Herbert, Jean-Marc;
Petitou, Maurice y
Savi, Pierre

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Polisacáridos con actividad antitrombótica que comprenden al menos un enlace covalente con la biotina o un derivado de la biotina.

La presente invención se refiere a nuevos oligo- y polisacáridos de síntesis que presentan al menos un enlace covalente con biotina o un derivado de la biotina y que poseen las actividades farmacológicas anticoagulantes y antitrombóticas de la heparina.

La heparina cataliza, especialmente mediante la antitrombina III (AT III), la inhibición de dos enzimas que intervienen en la reacción de coagulación de la sangre, es decir, el factor Xa y el factor IIa (o trombina). Las preparaciones de heparinas de bajo peso molecular (HBPM), contienen las cadenas formadas por 4 a 30 monosacáridos y tienen la propiedad de actuar más selectivamente sobre el factor Xa que sobre la trombina.

Se sabe que la inhibición del factor Xa requiere la fijación de la heparina sobre la AT III mediante el dominio del enlace con la antitrombina (Dominio-A) y que la inhibición del factor IIa (trombina) requiere la fijación a la AT III, mediante el Dominio-A, así como a la trombina mediante un dominio de enlace menos bien definido (Dominio-T).

Son conocidos los oligosacáridos de síntesis que corresponden al dominio Dominio-A de la heparina. Se describen por ejemplo en las patentes europeas EP 84999 y EP 529715, la solicitud de patente internacional publicada número WO 99/36428 y la publicación *Bioorg.*

Med. Chem. 1.998, 6,1.509-1.516. Estos oligosacáridos de síntesis tienen la propiedad de inhibir selectivamente mediante la antitrombina III, el factor Xa de la coagulación sin ninguna actividad sobre la trombina. Manifiestan actividad antitrombótica en la trombosis venosa.

Se han descrito oligosacáridos de síntesis capaces de inhibir la trombina y el factor Xa mediante la activación de la AT III, en las solicitudes de patente internacionales publicadas números WO 98/03554 y WO 99/36443.

En estas solicitudes de patente se describen nuevos derivados polisacarídicos sulfatados y alquilados biológicamente activos. Son en particular anticoagulantes y antitrombóticos. Se ha demostrado en particular que estos polisacáridos sulfatados y alquilados pueden ser poderosos antitrombóticos y anticoagulantes según la disposición de los grupos alquilo y los grupos sulfato soportados por la cadena glucídica. De manera más general, se ha encontrado que por realización de secuencias polisacarídicas es posible modular con precisión las actividades de tipo GAGs para obtener productos muy activos que presenten las propiedades farmacológicas anticoagulantes y antitrombóticas de la heparina. Con respecto a la heparina, presentan la ventaja de tener una estructura determinada y de no reaccionar con el factor 4 plaquetario, causa de los efectos trombocitopeniantes de la heparina.

Sin embargo, se puede comprobar que el uso en terapéutica humana de ciertos productos descritos en las solicitudes de patente internacionales publicadas números WO 98/03554 y WO 99/36443 y en la patente europea EP 529715 puede ser delicado, en particular si estos productos poseen una semivida larga. En el campo de la prevención o del tratamiento de la trombosis con los productos anteriores, se debe restablecer o mantener la fluidez de la sangre mientras se evita provocar una hemorragia.

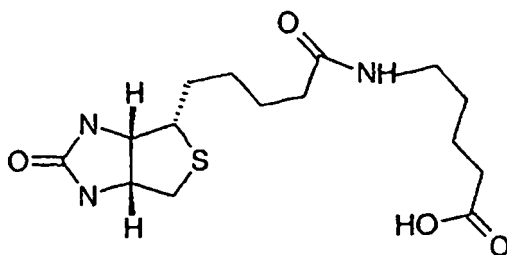
Se sabe bien en efecto que por una causa accidental cualquiera, se puede desencadenar una hemorragia en un paciente bajo tratamiento. Se puede necesitar igualmente intervenir quirúrgicamente a un enfermo en tratamiento antitrombótico. Además, durante ciertos actos quirúrgicos, se pueden utilizar anticoagulantes en dosis importantes para impedir la coagulación de la sangre y es necesario neutralizarlos al final de la intervención. Es interesante pues tener agentes antitrombóticos neutralizables para detener la actividad anticoagulante en cualquier momento. O, los oligosacáridos de síntesis conocidos, descritos anteriormente, no se pueden neutralizar fácilmente por los antídotos conocidos de la heparina o de las HBPM, incluido el sulfato de protamina.

La presente invención se refiere a nuevos polisacáridos de síntesis, de estructura próxima a la de los compuestos descritos en las solicitudes de patente internacionales publicadas números WO 98/03554 y WO 99/36443 y en la patente europea EP 529715: las estructuras de los oligosacáridos de síntesis objeto de la invención se modifican en el sentido que presenten un enlace covalente con la biotina (ácido hexahidro-2-oxo-1H-tieno[3.4-d]imidazol-4-pentanoico) o con un derivado de la biotina. De manera sorprendente, parece ser que la introducción de biotina o de un derivado de la biotina no modifica la actividad farmacológica de los polisacáridos. En efecto, los nuevos polisacáridos, objeto de la invención, presentan una actividad antitrombótica comparable con la de los oligosacáridos de la técnica anterior. Pero poseen además la ventaja de poder ser neutralizados rápidamente por un antídoto específico, en situación de urgencia. Este antídoto específico es la avidina (The Merck Index, Duodécima Edición, 1.996, M.N. 920, páginas 151-152) o la estreptavidina, dos proteínas tetrámeras de masas respectivas iguales a aproximadamente 66.000 y 60.000 Da, que poseen una afinidad muy fuerte por la biotina.

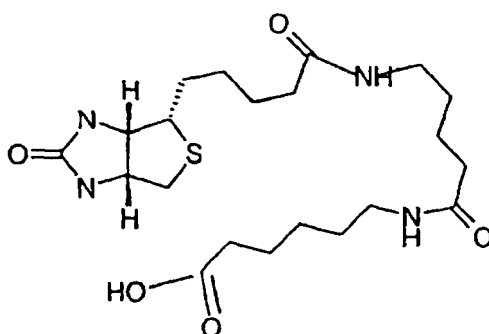
De manera general, la invención se refiere a los polisacáridos sintéticos con actividad antitrombótica que presentan al menos un enlace covalente con la biotina o un derivado de la biotina.

ES 2 292 625 T3

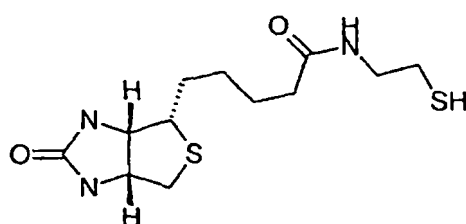
Como derivado de la biotina, se pueden citar los derivados de la biotina indicados en el catálogo Pierce 1.999-2.000 páginas 62 a 81, por ejemplo el 6-biotinamidohexanoato,



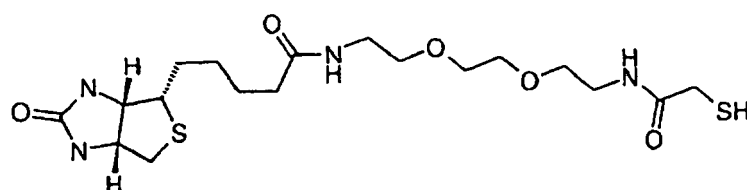
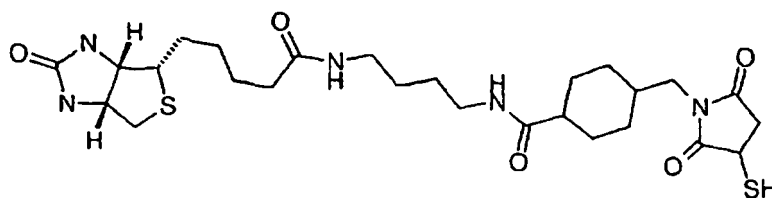
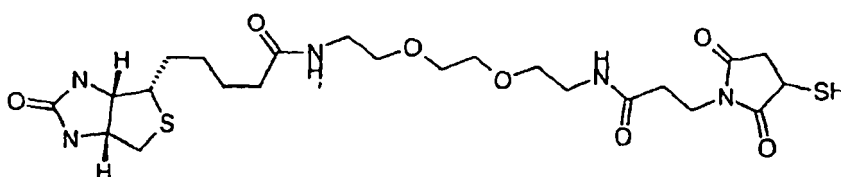
o el 6-(6-biotinamidohexanamido)hexanoato,

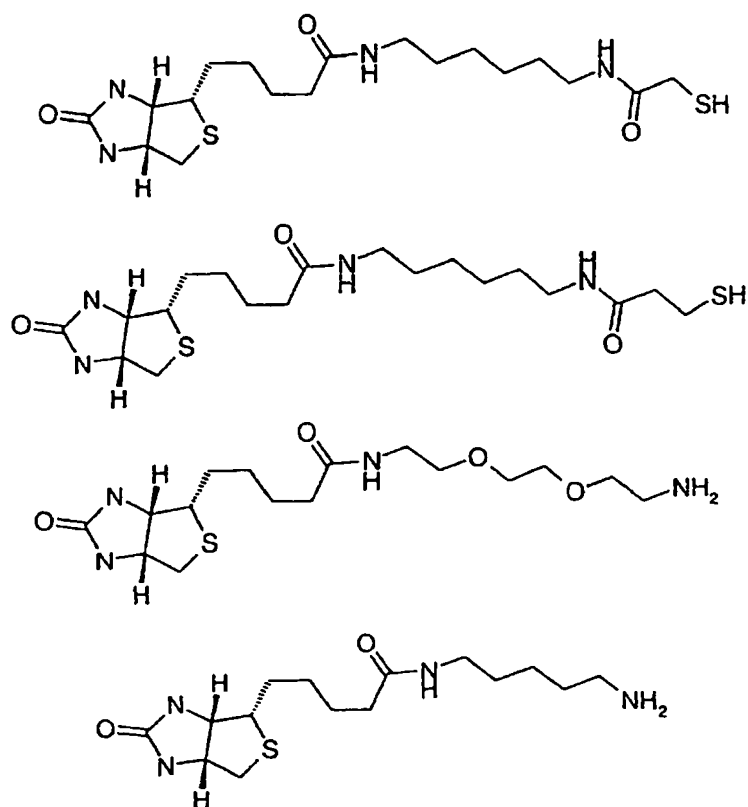


o incluso el 2-biotinamidoetanotiol

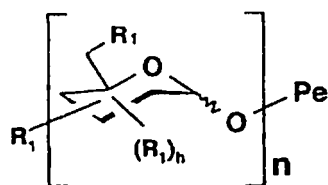


o incluso los compuestos de las fórmulas siguientes:





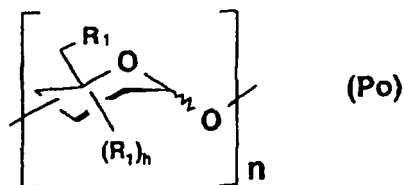
En particular, la presente invención tiene por objeto los polisacáridos de fórmula (I):



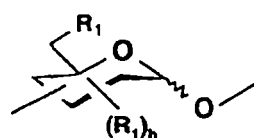
(I)

en la que:

- el trazo ondulado representa un enlace situado bien por debajo o por arriba del plano del anillo piranósico,



Po representa un polisacárido, que contiene n unidades monosacáridas idénticas o diferentes, unidas por su carbono anomérico a Pe ,

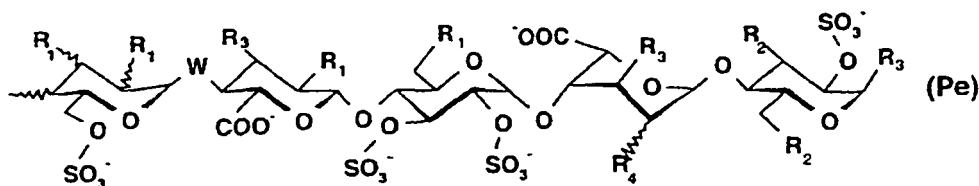


es una representación esquemática de una unidad monosacárida con estructura piranósica elegida entre hexosas, pentosas y los desoxiazúcares correspondientes, estando unida esta unidad por su carbono anomérico a otra unidad mo-

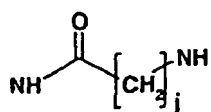
ES 2 292 625 T3

nosacárida y estando sustituidos los grupos hidroxí de esta unidad por grupos R_1 idénticos o diferentes, siendo R_1 tal como se define a continuación,

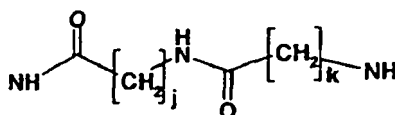
- Pe representa un pentasacárido de estructura:



- h es igual a 1 ó 2,
- n es un número entero y puede tener cualquier valor de 0 a 25,
- R_1 representa la agrupación -T-Biot, un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
- R_2 representa la agrupación -T-Biot, un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
- R_3 representa la agrupación -T-Biot, un grupo alcoxi (C_1-C_6),
- R_4 representa la agrupación -T-Biot, un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$ o bien R_4 constituye un puente $-O-CH_2-$, estando unido el grupo $-CH_2-$ al átomo de carbono portador de la función carboxílica en el mismo ciclo; entendiéndose que al menos uno de los sustituyentes R_1, R_2, R_3 o R_4 representa un grupo -T-Biot,
- W representa un átomo de oxígeno o un grupo metileno,
- T representa una de las secuencias elegida entre: NH ,

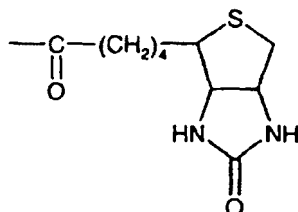


o



en las que j y k , idénticas o diferentes, son números enteros que pueden ser cualquier valor de 1 a 10;

- Biot representa el grupo:



así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como se indicó anteriormente, se observará de manera general en la presente descripción que un trazo ondulado representa un enlace situado, bien por debajo o por encima del plano del ciclo piranósico.

Los monosacáridos contenidos en Po pueden ser idénticos o diferentes entre sí, pudiendo ser los enlaces interglucosídicos del tipo α o β .

Estos monosacáridos se eligen ventajosamente entre las hexosas D o L: alosa, altrosa, glucosa, manosa, galosa, idosa, galactosa, talosa (en este caso $h = 2$) o entre las pentosas D o L: ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa (en este caso $h = 2$). Se pueden utilizar igualmente otros monosacáridos tales como por ejemplo los desoxiazúcares ($h = 1$ y/o $-\text{CH}_2\text{R}_1 = \text{CH}_3$).

La parte polisacárida Po puede estar constituida por 0 a 25 unidades monosacáridas alquiladas y di-o trisulfatadas.

La parte polisacárida Po puede estar constituida igualmente por 0 a 25 unidades monosacáridas alquiladas y mono-o disulfatadas.

La parte polisacárida Po puede estar constituida por 0 a 25 unidades monosacáridas alquiladas no cargadas y/o parcialmente cargadas y/o totalmente cargadas.

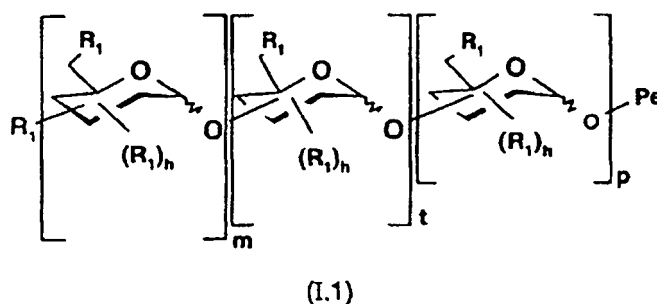
Las unidades cargadas o no cargadas pueden estar dispersadas a lo largo de la cadena o por el contrario pueden estar agrupadas en dominios sacáridos cargados o no cargados.

Los enlaces entre las unidades pueden ser 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6 y del tipo α o β .

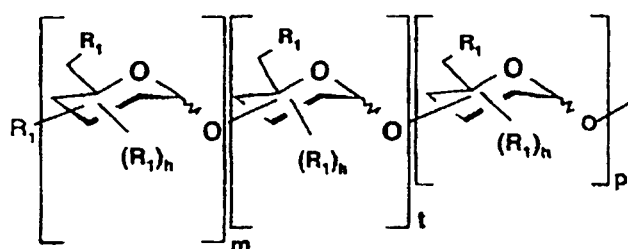
En la presente descripción, se ha elegido representar las conformaciones $^1\text{C}_4$ para el ácido L-idurónico, $^4\text{C}_1$ para el ácido D-glucurónico, pero se tiene que destacar que de una manera general, la conformación en disolución de las unidades monosacáridas es fluctuante.

Así, el ácido L-idurónico puede tener la conformación $^1\text{C}_4$, $^2\text{S}_0$ o $^4\text{C}_1$.

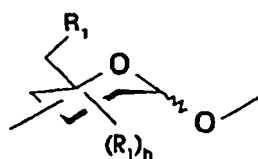
Según uno de sus aspectos, la invención se refiere a los polisacáridos de fórmula (I.1):



en los que:



representa una familia particular de polisacáridos Po, unidos por su carbono anomérico a Pe tal como se define para (I),



es tal como se define para (I),

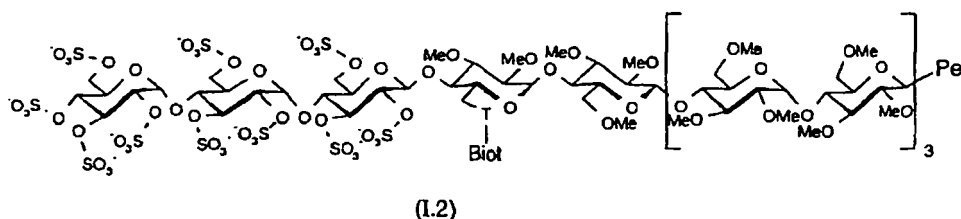
- los grupos R_1 son tal como se define para (I) y, para un mismo monosacárido, pueden ser idénticos o diferentes,

- el monosacárido contenido en $[]_m$ se repite m veces, el monosacárido contenido en $[]_t$ se repite t veces, el monosacárido contenido en $[]_p$ se repite p veces,
- m es un número entero que varía de 1 a 5, t es un número entero que varía de 0 a 24 y p es un número entero que varía de 0 a 24, entendiéndose que $1 \leq m+t+p \leq 25$,

así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

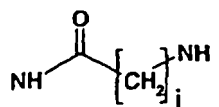
Entre estos polisacáridos de fórmula (I.1), los polisacáridos en los que uno solo de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 o R_4 representa la agrupación T-Biot, siendo T y Biot tal como se define para (I), así como sus sales farmacéuticamente aceptables, constituyen otro aspecto de la invención.

Según un aspecto particular, la invención se refiere a los hexadecasacáridos de fórmula (1.2):

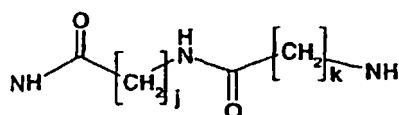


en los que:

- T representa una de las secuencias elegida entre: NH,

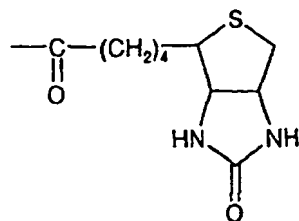


o

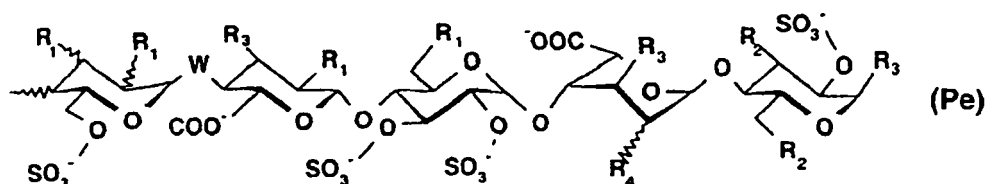


en las que j y k, idénticas o diferentes, son números enteros que pueden ser cualquier valor de 1 a 10;

- Biot representa el grupo:



- Pe representa un pentasacárido de estructura:

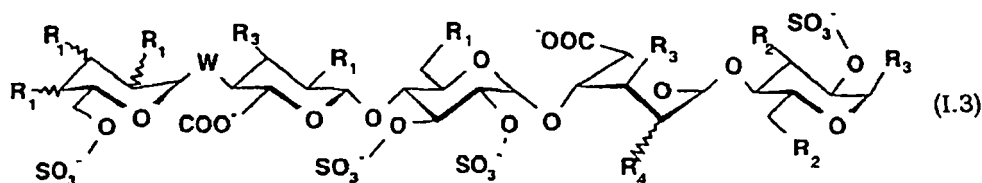


en la que:

- R_1 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
- R_2 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
- R_3 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6),
- R_4 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$ o bien R_4 constituye un puente $-O-CH_2-$, estando unido el grupo $-CH_2-$ al átomo de carbono portador de la función carboxílica en el mismo ciclo,
- W representa un átomo de oxígeno o un grupo metileno,

así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

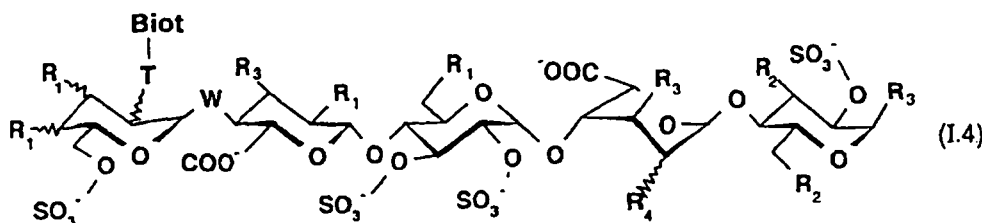
Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a los pentasacáridos de fórmula (I.3):



en los que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y W son tal como se definió para (I), así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

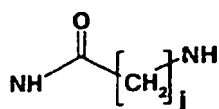
Entre estos pentasacáridos de fórmula (I.3), los pentasacáridos en los que uno solo de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 o R_4 representa la agrupación -T-Biot, siendo T y Biot tal como se definió para (I), así como sus sales farmacéuticamente aceptables, constituyen otro aspecto de la invención.

Entre estos pentasacáridos de fórmula (I.3), la invención tiene igualmente por objeto los pentasacáridos de fórmula (I.4):

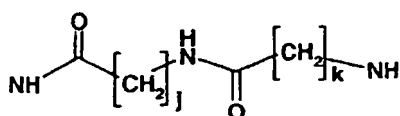


en la que:

- T representa una de las secuencias elegida entre: NH,

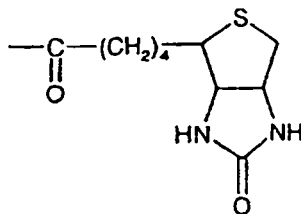


o



en las que j y k, idénticas o diferentes, son número enteros que pueden ser cualquier valor de 1 a 10;

- Biot representa el grupo:



- R_1 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
 - R_2 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
 - R_3 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6),
 - R_4 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$ o bien R_4 constituye un puente $-O-CH_2-$, estando unido el grupo $-CH_2-$ al átomo de carbono portador de la función carboxílica en el mismo ciclo,
 - W representa un átomo de oxígeno o un grupo metileno, así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

Según otro de sus aspectos, la invención se refiere a los siguientes polisacáridos:

- Sal de sodio de metil(2,3,4,6-tetra-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-biotinamido-6-desoxi-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-*O*-sulfonato-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
 - Sal de sodio de metil(2,3,4,6-tetra-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamidohexamido) hexamido]-6-desoxi-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-*O*-sulfonato-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
 - Sal de sodio de metil(2,3,4,6-tetra-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamidohexamido) hexamido]-6-desoxi-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-*O*-sulfonato-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
 - Sal de sodio de metil(2-biotinamido-2-desoxi-3,4-di-*O*-metil-6-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
 - Sal de sodio de metil(2-[N-(6-biotinamido hexanoil)]-2-desoxi-3,4-di-*O*-metil-6-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
 - Sal de sodio de metil(2-[6-(6-biotinamidohexamido) hexamido]-2-desoxi-3,4-di-*O*-metil-6-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido.

La invención incluye los polisacáridos en su forma ácida o en la forma de una cualquiera de sus sales farmacéuticamente aceptables. En la forma ácida, las funciones $-COO^-$ y $-SO_3^-$ están respectivamente en forma $-COOH$ y $-SO_3H$.

Se entiende por sal farmacéuticamente aceptable de los polisacáridos de la invención, un polisacárido en el que una o varias de las funciones -COO- o -SO_3^- están unidas de manera iónica a un catión farmacéuticamente aceptable. Las sales preferidas según la invención son aquéllas en las que el catión se elige entre los cationes de metales alcalinos y más preferiblemente aún aquéllas en las que el catión es Na^+ o K^+ .

Los compuestos de la fórmula (I) anterior comprenden igualmente aquéllos en los que uno o varios átomos de hidrógeno o de carbono se han reemplazado con su isótopo radiactivo por ejemplo el tritio o el carbono-14. De los compuestos señalados son útiles en los trabajos de investigación, metabolismo o farmacocinética en los ensayos bioquímicos como ligandos.

En su principio el procedimiento de preparación de los compuestos según la invención utiliza sintones de base di-u oligosacáridica preparados como se indicó anteriormente en la bibliografía. Se referirá especialmente a las patentes o solicitudes de patente europeas EP 300099, EP 529715, EP 621282 y EP 649854 así como a los documentos C. van Boeckel, M Petitou, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1.993, 32, 1.671-1.690. Estos sintones se acoplan a continuación unos con otros de manera que se proporcione un equivalente totalmente protegido de un polisacárido según la invención. Este equivalente protegido se transforma a continuación en un compuesto según la invención.

Uno de los sintones de base evocados anteriormente contiene una función protegida particular que permite la introducción ulterior de la biotina o de un derivado de biotina, por ejemplo, una función amina latente en forma de grupo azido o protegida en forma de N-ftalimido.

En las reacciones de acoplamiento evocadas anteriormente, un di-u oligosacárido "donador", activado en su carbono anomérico, se hace reaccionar con un di-u oligosacárido "aceptor", que posea un hidroxilo libre.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de los compuestos de fórmula (I) caracterizados porque: en una primera etapa, se sintetiza un equivalente completamente protegido del polisacárido (I) deseado, que contiene un precursor protegido del dominio Pe prolongado en su extremo no reductor por un precursor protegido del polisacárido sulfatado Po, uno de estos precursores contiene especialmente una función amina razonablemente protegida por la introducción ulterior de la biotina o de un derivado de biotina; en una segunda etapa, se introducen y/o se desenmascaran los grupos cargados negativamente; en una tercera etapa, se desprotege la función amina, después se introduce la biotina o el derivado de biotina.

La síntesis de Pe se realiza según los métodos descritos, en particular en las solicitudes de patente internacionales publicadas números WO98/03554 y WO99/36443 así como en la bibliografía (citada anteriormente).

La síntesis de la parte polisacáridica precursora de Po se realiza según las reacciones bien conocidas por el experto en la materia, utilizando los métodos de la síntesis de oligosacáridos (G. J. Boons, Tetrahedron, 1.996, 52, 1.095-1.121, la patente internacional WO98/03554 y la patente internacional WO99/36443) o un oligosacárido cuando un oligosacárido donador de enlace glicosídico está acoplado con un oligosacárido receptor de enlace glicosídico para conducir a otro oligosacárido cuyo tamaño es igual a la suma de los tamaños de las dos especies reactivas. Esta secuencia se repite hasta la obtención del compuesto de fórmula (I) deseado. La naturaleza y el perfil de la carga del compuesto final deseado determinan la naturaleza de las entidades químicas utilizadas en las diferentes etapas de la síntesis, según las reglas bien conocidas por los expertos en la materia. Se podrá hacer referencia por ejemplo a C. van Boeckel, M. Petitou, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1.993, 32, 1.671-1.690 o también a H. Paulsen, "Advances in selective chemical syntheses of complex oligosaccharides" Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 21, 155-173 (1.982).

Los compuestos de la invención se obtienen a partir de sus precursores polisacáridicos protegidos completamente utilizando la siguiente secuencia de reacciones:

- las funciones alcohol que deben ser transformadas en un grupo O-sulfo y los ácidos carboxílicos son desprotegidos por la eliminación de los grupos protectores utilizados durante la elaboración del esqueleto después,
- se introducen los grupos sulfo a continuación,
- se desprotege la función amina que permite introducir la biotina o el derivado de biotina,
- la biotina o el derivado de biotina se introduce por una reacción clásica de acoplamiento amino/ácido.

Los compuestos de la invención se pueden preparar naturalmente utilizando diferentes estrategias conocidas por el experto en la materia de la síntesis de los oligosacáridos.

El procedimiento descrito anteriormente es el procedimiento preferido de la invención. Sin embargo, los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar por otros métodos bien conocidos de la química de los azúcares descritos por ejemplo en Monosaccharides, Their chemistry and their roles in natural products, P. M. Collins y R. J. Ferrier, J. Wiley & Sons, 1.995 y en G. J. Boons, Tetrahedron, 1.996, 52, 1.095-1.121.

Los pentasacáridos Pe se pueden obtener pues a partir de sintones disacáridicos de la manera descrita en la publicación de C. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1.993, 32, 1.671-1.690.

Los grupos protectores utilizados en el procedimiento de preparación de los compuestos (I) son los utilizados comúnmente en la química de los azúcares, por ejemplo en *Protective Groups in Organic Synthesis*, TW Greene, John Wiley & sons, Nueva York, 1.981.

Los grupos protectores se eligen ventajosamente, por ejemplo entre los grupos: acetilos, halogenometilos, benzoílos, levulinilos, bencilos, bencilos sustituidos, tritilos eventualmente sustituidos, tetrahidropirranilos, alilos, pentenilos, *tert*-butildimetilsililos (tBDMS) o trimetilsililetilos.

Los grupos activadores son los utilizados clásicamente en la química de los azúcares según por ejemplo G. J. Boons, *Tetrahedron*, 1.996, 52, 1.095-1.121. Estos grupos activadores se eligen, por ejemplo, entre: imidatos, tioglicósidos, pentenilglicósidos, xantatos, fosfitos o halogenuros.

En lo que se refiere a la manera en que se une la biotina al oligosacárido así como la naturaleza del derivado de biotina, la bibliografía química ofrece otras posibilidades que es posible emplear por los juegos de grupos protectores bien conocidos por el experto en la materia. Se utilizará preferentemente una función amina o incluso una función tiol o incluso una función ácido carboxílico o incluso una función aldehído que le hará reaccionar con un derivado de biotina que conste de un grupo reactivo del tipo éster activado, maleimida, yodoacetilo o amina primaria, haciéndose la reacción en las condiciones descritas en la bibliografía (cf. *Savage et al.*, *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chemical Company, 1.992).

El procedimiento descrito anteriormente permite obtener los compuestos de la invención en forma de sales. Para obtener los ácidos correspondientes, se ponen en contacto los compuestos de la invención en forma de sales, con una resina de intercambio de cationes en forma ácida.

Los compuestos de la invención en forma de ácidos se pueden neutralizar a continuación por una base para obtener la sal deseada. Para la preparación de las sales de los compuestos de fórmula (I), se puede utilizar cualquier base mineral u orgánica, que proporcione con los compuestos de fórmula (I), sales farmacéuticamente aceptables. Se utiliza preferentemente como base el hidróxido de sodio, potasio, calcio o magnesio. Las sales de sodio y de calcio de los compuestos de fórmula (I), son las sales preferidas.

Los compuestos según la invención han sido objeto de estudios bioquímicos y farmacológicos.

Se ha estudiado la actividad antitrombótica global de estos productos y su neutralización, en un modelo de trombosis venosa constituido por una inyección de factor tisular seguido por una estasis de la vena cava en ratas, tal como se describe por J.-M. Herbert *et al.*, *Blood*, 1.998, 91, 4.197-4.205. En este modelo, se obtiene una inhibición del 60% de la trombosis después de la inyección intravenosa de 0,1 a 30 mmoles/kg de los compuestos.

La inyección de avidina en una relación molar de 1 a 1.000 reduce enormemente el efecto antitrombótico de estos compuestos, pudiendo ser la reducción obtenida superior al 50%. Paralelamente, la actividad prohemorrágica de los compuestos se neutraliza por inyección de avidina en las dosis citadas previamente. Igualmente, la actividad circulante de los oligosacáridos, medida por la actividad anti-Xa y/o la actividad anti-IIa, se neutraliza por inyección de avidina.

Así, la presente invención tiene por objeto igualmente un procedimiento que emplea avidina o estreptavidina caracterizado porque permite neutralizar los polisacáridos según la invención. Se puede utilizar avidina o estreptavidina para la preparación de medicamentos destinados a neutralizar los polisacáridos según la presente invención.

Gracias a su actividad bioquímica y farmacéutica, los oligosacáridos de la presente invención constituyen medicamentos muy interesantes. Su toxicidad es perfectamente compatible con esta utilización. Son igualmente muy estables y son pues particularmente apropiados para constituir el principio activo de las especialidades farmacéuticas.

Se pueden utilizar en diversas patologías consecutivas con una modificación de la homeostasis del sistema de la coagulación que aparecerá en particular durante los trastornos del sistema cardiovascular y cerebrovascular como los trastornos tromboembólicos asociados con la aterosclerosis y la diabetes tales como: angina inestable, ataque cerebral, reestenosis después de angioplastia, endarterectomía, la colocación de prótesis endovasculares o los trastornos tromboembólicos asociados con la retrombosis después de la trombolisis, infarto, demencia de origen isquémico, enfermedades arteriales periféricas, hemodiálisis, fibrilaciones auriculares o incluso durante la utilización de prótesis vasculares de puentes aortocoronarios.

Se pueden utilizar estos productos por otro lado para el tratamiento o la prevención de patologías tromboembólicas de origen venoso tales como las embolias pulmonares. Se pueden utilizar o para prevenir o para tratar las complicaciones trombóticas observadas por ejemplo después de operaciones quirúrgicas, desarrollos tumorales o desajustes de la coagulación, inducidas por activadores bacterianos, víricos o enzimáticos. En el caso de su utilización durante la colocación de prótesis, los compuestos de la presente invención pueden recubrir las prótesis y hacerlas así hemocompatibles. En particular, se pueden fijar a prótesis intravasculares (endoprótesis). En este caso, se pueden modificar

químicamente eventualmente por introducción en el extremo no reductor o reductor de un brazo apropiado, como se describe según la patente europea EP 649854.

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar igualmente como adyuvantes durante la endarterectomía realizada con globos porosos.

Los compuestos según la invención se pueden utilizar para la preparación de medicamentos destinados a tratar las enfermedades anteriores.

Según otro de sus aspectos, la presente invención tiene pues por objeto una composición farmacéutica que contiene como principio activo, un polisacárido de síntesis según la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, eventualmente en asociación con uno o varios excipientes inertes y apropiados.

Dichos excipientes se eligen según la forma farmacéutica y el modo de administración deseados: oral, sublingual, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, transdérmico, transmucoso, local o rectal.

El principio activo se puede presentar igualmente en forma de complejo con una ciclodextrina, por ejemplo α , β o γ ciclodextrina, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina o metil- β -ciclodextrina.

Se puede liberar el principio activo igualmente por un globo que lo contenga o por un extensor endovascular introducido en los vasos sanguíneos. La eficacia farmacológica del principio activo no se ve así afectado.

En cada unidad de administración, el principio activo está presente en las cantidades adaptadas a las dosis diarias pretendidas con el fin de obtener el efecto profiláctico o terapéutico deseado. Cada unidad de administración puede contener de 0,1 a 100 mg de principio activo, preferentemente 0,5 a 50 mg. Estas dosis de compuestos anticoagulantes se podrían neutralizar por las dosis de avidina o de estreptavidina que van de 1 a 1.000 mg en inyección iv (intravenosa), inyección intravenosa rápida o vascularización.

Los compuestos según la invención se pueden utilizar igualmente en asociación con uno u otros varios principios activos útiles para la terapéutica deseada tal como por ejemplo: antitrombóticos, anticoagulantes, antiagregantes plaquetarios tales como por ejemplo: dipiridamol, aspirina, ticlopidina, clopidogrel o los antagonistas del complejo de la glicoproteína IIb/IIIa.

Los métodos, las preparaciones y los esquemas siguientes ilustran la síntesis de diferentes compuestos intermedios útiles para la obtención de polisacáridos según la invención.

Se utilizan las abreviaturas siguientes:

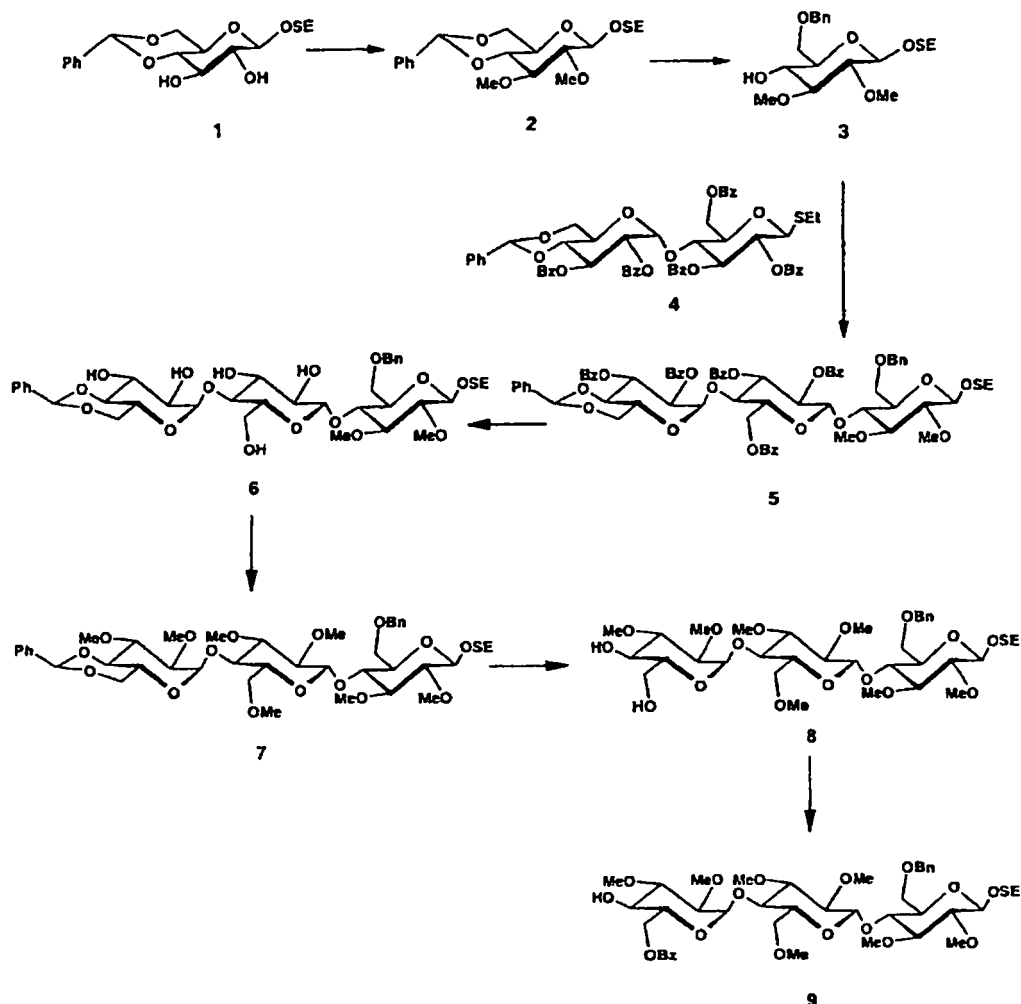
Bn: bencilo; Bz: benzoílo; CCF: cromatografía en capa fina. Ts: tosilo; Lev: levulinilo; Et: etilo; Ph: fenilo; Me: metilo; Ac: acetilo; SE: trimetilsililetilo; ESI: son las siglas Ionización por Electropulverización en inglés; Biotina: Ácido hexahidro-2oxo-1*H*-tieno[3.4-d]imidazol-4-pentanoico; Z: benziloxicarbonilo.

A continuación, se detallan como ilustración los ejemplos de síntesis de los compuestos de la invención.

(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 1

Síntesis del trisacárido 9



Preparación 1

2-(Trimetilsilil)etilo 4,6-O-bencilideno-2,3-di-O-metil-O-D-glucopiranosido (2)

A una disolución del compuesto 1 (15,8 g; 42,8 mmoles) (preparada según K. Jansson *et al.*, J. Org. Chem., 1988, 53, 5.629-5.647) y yoduro de metilo (20 ml; 319 mmoles) en tetrahidrofurano (350 ml), se añaden, a 0°C, en pequeñas cantidades de hidruro de sodio (18 g). Se agita durante 4 horas la mezcla de reacción a temperatura ambiente. El exceso de hidruro de sodio se elimina con metanol y se vierte la mezcla de reacción en agua fría (1,5 l). Después de extracción con acetato de etilo, se lava la fase orgánica con una disolución saturada de cloruro de sodio, agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. La purificación del residuo se efectúa por cromatografía de columna sobre gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo 15/1 (v/v)) para dar 16,8 g del compuesto 2.

$[\alpha]_D = -41^\circ$ (c = 0,69, diclorometano).

Preparación 2

2-(Trimetilsilil)etilo 6-O-bencil-2,3-di-O-metil-β-D-glucopiranosido (3)

A una disolución del compuesto 2 (16 g; 40,3 mmoles) en tetrahidrofurano (600 ml), se añaden sucesivamente tamiz molecular 3Å en polvo (82 g), naranja de metilo (indicador coloreado), cianoborohidruro de sodio (34 g; 526 mmoles) después gota a gota una disolución saturada de ácido clorhídrico en dietil éter hasta obtener una coloración

ES 2 292 625 T3

rosa. Después de filtración y extracción con acetato de etilo, se lava la fase orgánica con una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio, agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. Una cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetato de etilo 3/1 (v/v)) permite obtener 12,5 g del compuesto 3.

5 $[\alpha]_D = -42^\circ$ (c = 1,2, diclorometano).

Preparación 3

10 *2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-benzoil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (5)*

Una mezcla de tioglicósido 4 (16,52 g; 16,60 mmoles) (obtenido según la preparación 1 de la solicitud de patente internacional publicada número WO 99/36443), compuesto 3 (6,0 g; 15,05 mmoles) y tamiz molecular 4Å en polvo (16,7 g) en tolueno (300 ml) se agita en atmósfera de argón durante 1 hora. Después la mezcla se enfría a -20 °C. Se añade gota a gota a la mezcla de reacción una disolución de N-yodosuccinimida (3,9 g; 17,4 mmoles) y ácido trifluorometanosulfónico (0,17 ml; 1,97 mmoles) en una mezcla de diclorometano/dioxano 1/1 (v/v) (86 ml). Después de 10 minutos, se filtra la mezcla de reacción, se diluye con diclorometano, se lava sucesivamente con una disolución de tiosulfato de sodio 1 M, una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 10% y agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. La purificación del residuo se efectúa por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetato de etilo 6/1 (v/v)) para dar 18,8 g del trisacárido 5.

$[\alpha]_D = +34^\circ$ (c = 1,26, diclorometano).

25

Preparación 4

30 *2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (6)*

A una disolución del compuesto 5 (18,7 g; 14 mmoles) en una mezcla de metanol-dioxano 1/1 (v/v) (140 ml) se añade *tert*-butilato de potasio (3,15 g). Se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutraliza con la resina Dowex® 50WX4 H⁺, se filtra y se concentra al vacío. La purificación del residuo se efectúa por cromatografía de columna sobre gel de sílice (diclorometano/metanol 20/1 (v/v)) para dar 10,0 g del compuesto 6.

35

$[\alpha]_D = +29^\circ$ (c = 1,11, diclorometano).

40 Preparación 5

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (7)

45 A una mezcla enfriada (0°C) del compuesto 6 (9,93 g; 12,24 mmoles), yoduro de metilo (9,0 ml; 138 mmoles) en tetrahidrofurano anhidro (100 ml), se añaden, en pequeñas cantidades, hidruro de sodio (5,2 g; 216 mmoles) en atmósfera de argón. La mezcla se agita durante 20 horas a temperatura ambiente. Se elimina el exceso de hidruro de sodio con metanol y se vierte la mezcla de reacción en agua helada (500 ml). Después de extracción con acetato de etilo, se lava la fase orgánica con una disolución saturada de cloruro de sodio, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío para dar 11 g del compuesto 7, que se utiliza en la etapa siguiente sin purificación.

50

CCF: R_f = 0,38, gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 3/2 (v/v)

55 Preparación 6

2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (8)

60 Se disuelve el compuesto 7 (11 g) en ácido acético al 60% (180 ml) y se agita durante 1 hora 30 a 80°C. Se concentra y se coevapora la mezcla con tolueno. Se purifica el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetona 2/1 (v/v)) para dar 8,46 g del compuesto 8.

65

CCF: R_f = 0,36, gel de sílice, tolueno/acetona 1/1 (v/v)

Preparación 7

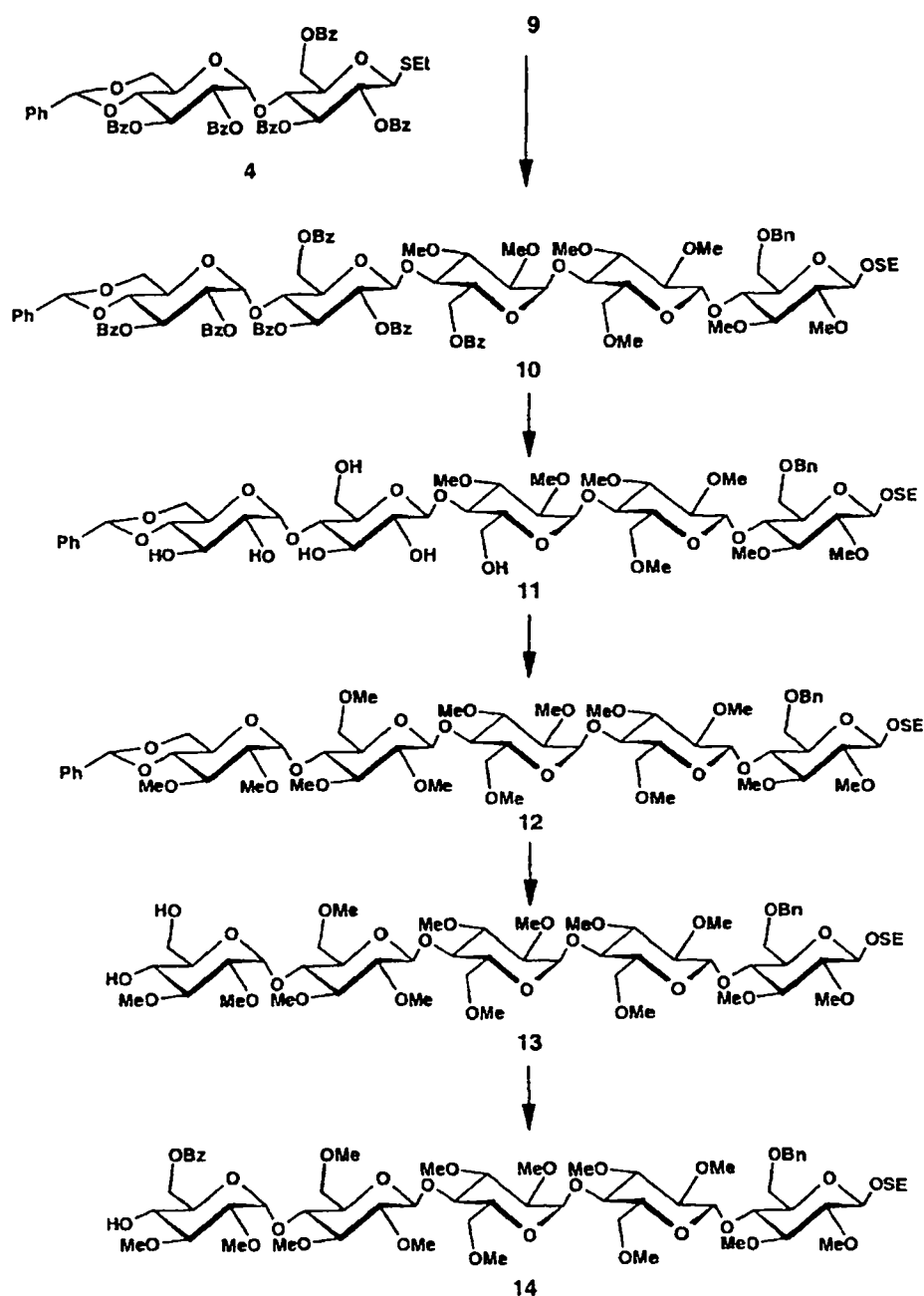
2-(Trimetilsilil)etil(6-O-benzoil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (9)

A una disolución del compuesto 8 (8,41 g; 10,6 mmoles) en diclorometano (110 ml), se añaden 1-benzoiloxi-1H-benzotriazol (5,36 g; 22,4 mmoles) y trietilamina (3,32 ml). Se agita la mezcla durante 20 horas a temperatura ambiente, después se diluye con diclorometano, se lava con una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. Se purifica el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo/etanol 5/0,5/0,25 (v/v/v)) para dar 8,40 g del compuesto 9.

$[\alpha]_D = +15^\circ$ (c = 2, diclorometano).

Esquema 2

Síntesis del pentasacárido 14



ES 2 292 625 T3

Preparación 8

2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-benzoil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-benzoil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (10)

Se transforma el compuesto 9 en compuesto 10 según el modo de operación descrito en la Preparación 3.

$[\alpha]_D = +42^\circ$ (c = 2, diclorometano).

Preparación 9

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (11)

Se transforma el compuesto 10 en compuesto 11 según el modo de operación descrito en la Preparación 4.

CCF: Rf = 0,35, gel de sílice, diclorometano/metanol 10/1 (v/v)

Preparación 10

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (12)

Se transforma el compuesto 11 en compuesto 12 según el modo de operación descrito en la Preparación 5.

CCF: Rf = 0,11, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo 1/2 (v/v)

Preparación 11

2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (13)

Se transforma el compuesto 12 en compuesto 13 según el modo de operación descrito en la Preparación 6.

CCF: Rf = 0,33, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 2/0,5/0,5 (v/v/v)

Preparación 12

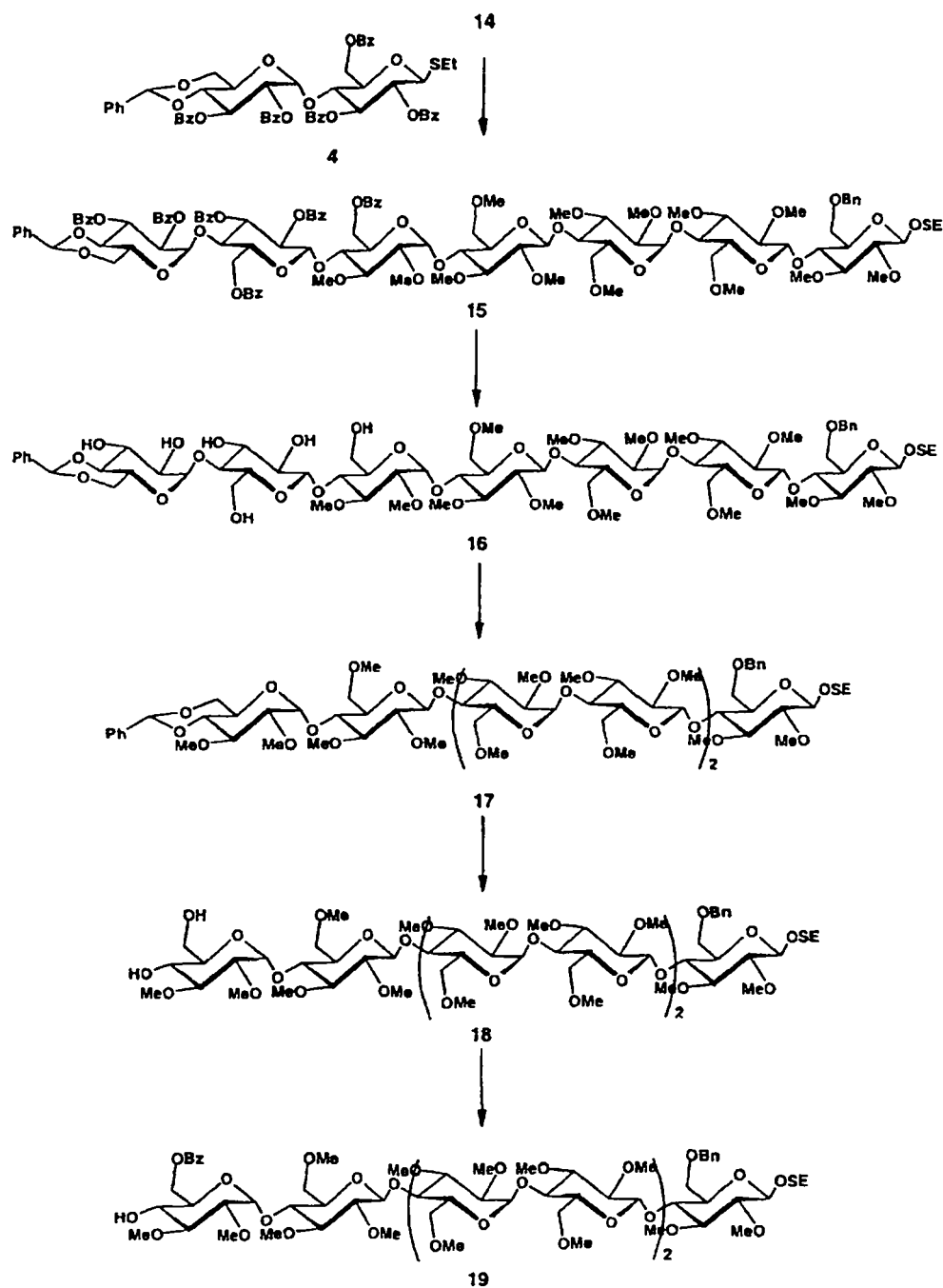
2-(Trimetilsilil)etil(6-O-benzoil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (14)

Se transforma el compuesto 13 en compuesto 14 según el modo de operación descrito en la Preparación 7.

CCF: Rf = 0,16, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 3/0,5/0,5 (v/v/v)

Esquema 3

Síntesis del heptasacárido 19



Preparación 13

2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-benzoil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-benzoil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (15)

La reacción de acoplamiento del compuesto 14 con el disacárido 4 se realiza según el modo de operación descrito en la Preparación 3, para proporcionar el compuesto 15.

$[\alpha]_D = +52^\circ$ ($c = 1,1$, diclorometano).

ES 2 292 625 T3

Preparación 14

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-
5 (2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (16)

Se transforma el compuesto 15 en compuesto 16 según el modo de operación descrito en la Preparación 4.

CCF: Rf = 0,31, gel de sílice, diclorometano/metanol 10/1 (v/v)

10

Preparación 15

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]2-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (17)

Se transforma el compuesto 16 en compuesto 17 según el modo de operación descrito en la Preparación 5.

20 CCF: Rf = 0,46, gel de sílice, diclorometano/metanol 10/1 (v/v)

Preparación 16

25 2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (18)

30 Se transforma el compuesto 17 en compuesto 18 según el modo de operación descrito en la Preparación 6.

CCF: Rf = 0,42, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 1/0,5/0,5 (v/v/v)

35 Preparación 17

2-(Trimetilsilil)etil(6-O-benzoil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (19)

40

Se transforma el compuesto 18 en compuesto 19 según el modo de operación descrito en la Preparación 7.

CCF: Rf = 0,25, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 3/0,5/0,5 (v/v/v)

45

(Esquema pasa a página siguiente)

50

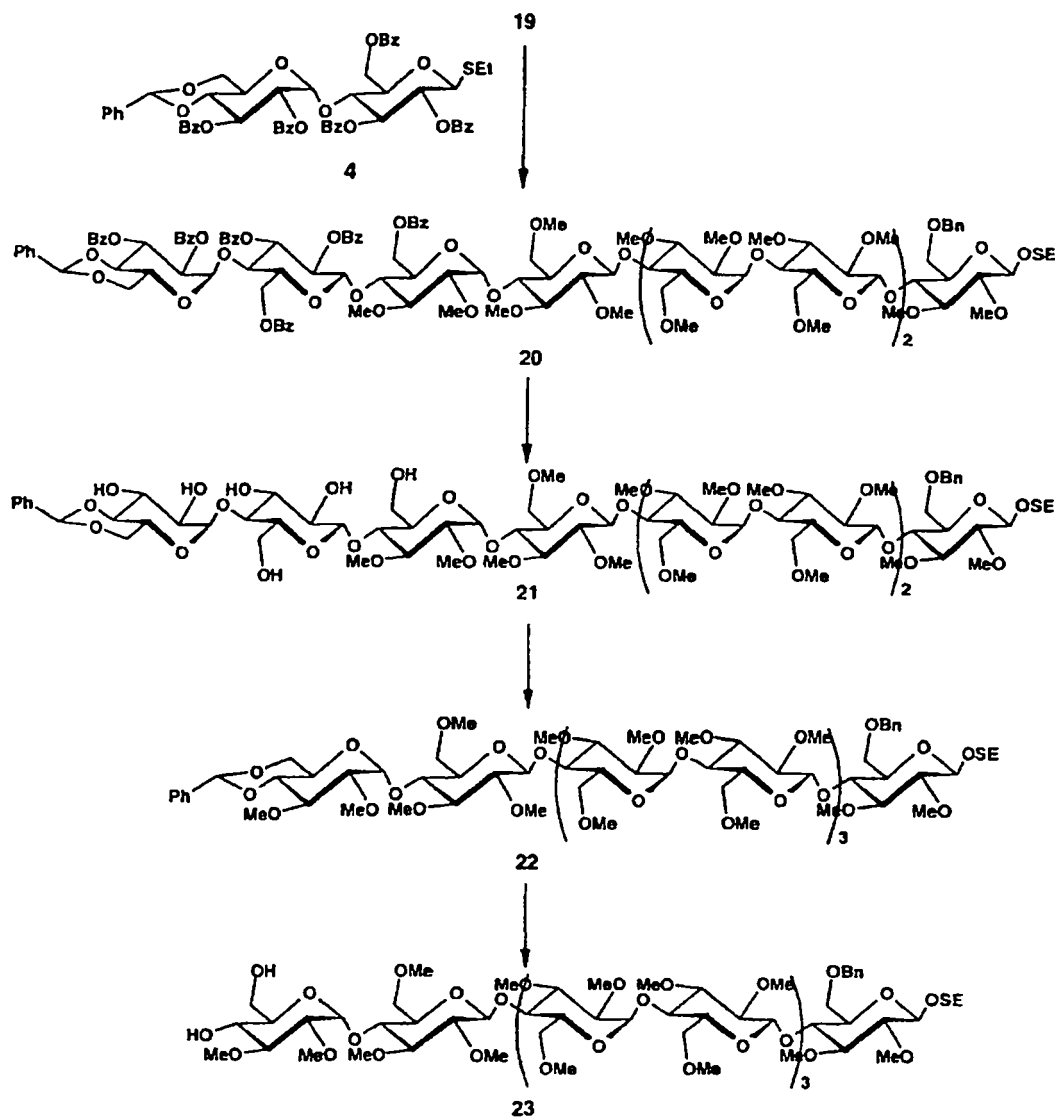
55

60

65

Esquema 4

Síntesis del nonasacárido 23



Preparación 18

2-(Trimetilsilil)etil (2,3-di-O-benzoil-4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-benzoil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-O-benzoil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₂-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (20)

Se agita en atmósfera de argón, durante 1 hora, una mezcla del tioglicósido 4 (5,2 g; 5,23 mmoles), heptasacárido 19 (4,72 g; 2,75 mmoles) y tamiz molecular 4Å en polvo en tolueno. Después se añade gota a gota, a 0°C, una disolución de N-yodosuccinimida (1,36 g; 5,85 mmoles) y ácido trifluorometanosulfónico (0,140 ml; 1,56 mmoles) en diclorometano/dioxano 1/1 (v/v) (32 ml). Después de 15 minutos, se filtra la mezcla de reacción, se diluye con diclorometano, se lava sucesivamente con una disolución de tiosulfato de sodio 1 M, una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 10% y agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. La purificación del residuo se

ES 2 292 625 T3

efectúa por cromatografía de columna sobre gel de sílice (ciclohexano/acetato de etilo/etanol 3/0,5/0,5 (v/v/v)) para dar 7,13 g del compuesto 20.

$[\alpha]_D = +65^\circ$ (c = 1,4, diclorometano).

Preparación 19

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -O-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₂-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -O-glucopiranosido (21)

El compuesto 20 se transforma en compuesto 21 según el modo de operación descrito en la Preparación 4.

CCF: Rf = 0,27, gel de sílice, diclorometano/metanol 10/1 (v/v)

Preparación 20

2-(Trimetilsilil)etil(4,6-O-bencilideno-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (22)

El compuesto 21 se transforma en compuesto 22 según el modo de operación descrito en la Preparación 5.

CCF: Rf = 0,31, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 5/1/1 (v/v/v)

Preparación 21

2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (23)

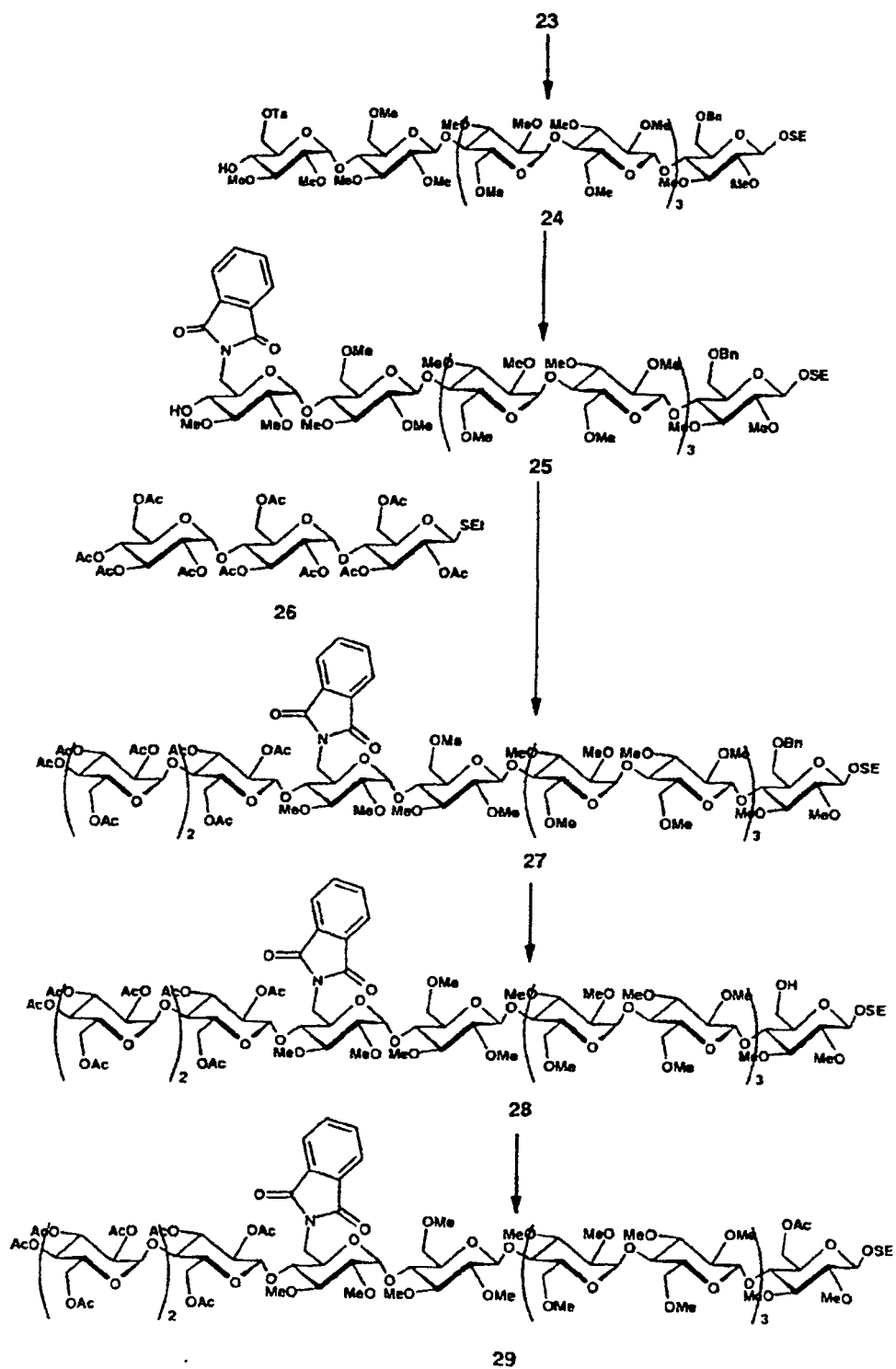
El compuesto 22 se transforma en compuesto 23 según el modo de operación descrito en la Preparación 6.

CCF: Rf = 0,35, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 2/1/1 (v/v/v)

(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 5

Síntesis del nonasacárido 29



ES 2 292 625 T3

Preparación 22

2-(Trimetilsilil)etil(2,3-di-O-metil-6-O-tosil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil-O-D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (24)

Se disuelve en atmósfera de argón el compuesto 23 (1,09 g) en piridina (10 ml), después se añade cloruro de tosilo (1,03 g). Después de 2 horas de agitación, se diluye con diclorometano (100 ml). Se lava la fase orgánica sucesivamente con una disolución de hidrogenosulfato de potasio al 10%, después agua, se seca y se evapora a sequedad. Después de cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetona 2,3/2 (v/v)), se obtienen 1,77 g del compuesto 24.

CCF: Rf = 0,5, gel de sílice, ciclohexano/acetato de etilo/etanol 3/1/1 (v/v/v)

Preparación 23

2-(Trimetilsilil)etil(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (25)

A una disolución del compuesto 24 (500 mg; 0,23 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (11 ml) que contiene tamiz molecular 4Å en polvo, se añade ftalimida de potasio (225 mg; 1,38 mmoles), después éter corona 18-corona-6 (121,5 mg; 0,46 mmoles). Se agita la mezcla a 80°C, durante 4 horas. Después de haber enfriado, se diluye la mezcla de reacción con diclorometano, se filtra sobre Celite y se concentra. Se purifica el residuo por cromatografía sobre gel Sephadex® LH20 (3 x 100 cm) (diclorometano/tanol 1/1 (v/v)) seguido por una cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/etanol 11/2 (v/v)) para dar 417,4 mg del compuesto 25.

CCF: Rf = 0,38, gel de sílice, tolueno/etanol 11/2 (v/v)

Preparación 24

2-(Trimetilsilil)etil(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil-O-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-bencil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (27)

Se agita en atmósfera de argón, durante 1 hora, una mezcla de tioglicósido 26 (1,515 g; 1,564 mmoles) (preparada según el compuesto 41, preparación 36 de la patente internacional WO 99/36443), receptor 25 (840 mg; 0,391 mmoles) y tamiz molecular 4Å en polvo (2,15 g) en tolueno (33 ml). Se enfría la mezcla de reacción a 0°C y se introduce en una disolución de *N*-yodosuccinimida (387 mg) y ácido trifluorometanosulfónico (55,4 μ l) en diclorometano/dioxano 1/1 (v/v) (7 ml). Después de 10 minutos, se filtra la mezcla, se diluye con tolueno, se lava sucesivamente con una disolución de tiosulfato de sodio 1 M, una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 10% y agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. La purificación del residuo se hace por cromatografía sobre gel Sephadex® LH20 (diclorometano/etanol 1/1 (v/v)), seguido por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetona 5/4 (v/v)) y conduce a 887 mg del compuesto 27.

$[\alpha]_D = +70^\circ$ (c = 0,35, diclorometano).

Preparación 25

2-(Trimetilsilil)etil(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (28)

Una disolución del compuesto 27 (750 mg; 0,245 mmoles) en ácido acético (37 ml) se trata bajo presión de hidrógeno [5x10⁵ Pa (5 bar)] en presencia de paladio sobre carbono al 10% (750 mg), durante 2 horas 30. Después de filtración, se concentra la disolución y la purificación del residuo se efectúa por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/etanol 6/1 (v/v)) para dar 728 mg del compuesto 28.

CCF: Rf = 0,32, gel de sílice, tolueno/etanol 6/1 (v/v)

Preparación 26

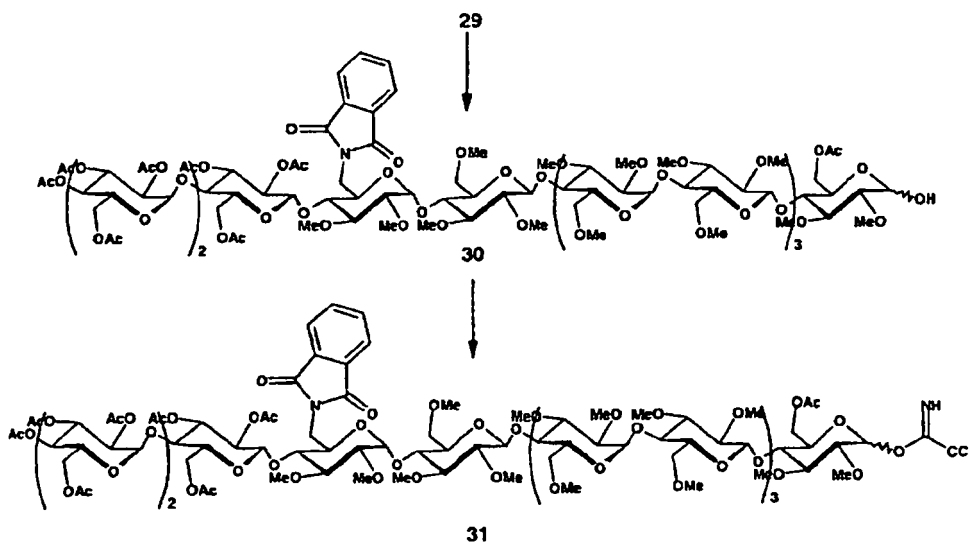
2-(Trimetilsilil)etil(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-acetil-2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosido (29)

A una disolución del compuesto 28 (728 mg; 0,245 mmoles) en diclorometano (10 ml) se añade trietilamina (51,1 μ l; 0,368 mmoles), anhídrido acético (32,5 μ l; 0,344 mmoles) y dimetilaminopiridina (6,0 mg; 0,049 mmoles). Después de 1 hora de agitación, se diluye con diclorometano, se lava sucesivamente con una disolución de hidrogenosulfato de potasio al 10%, agua, una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. La purificación del residuo se efectúa por cromatografía de columna sobre gel de sílice permite obtener 0,618 mg del compuesto 29.

CCF: Rf = 0,37, gel de sílice, tolueno/etanol 6/1 (v/v)

Esquema 6

Síntesis del oligosacárido 31



Preparación 27

(2,3,4,6-Tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucopiranososa (30)

Se agita durante 1 hora una disolución del compuesto 29 (579 mg; 0,192 mmoles) en una mezcla de ácido trifluoroacético/diclorometano 2/1 (v/v) (11,5 ml). Se diluye con una mezcla de tolueno/acetato de *n*-propilo 2/1 (v/v) (69 ml), se concentra y se co-evapora con tolueno. Se purifica el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/etanol 5/1 (v/v)) para obtener 523 mg del compuesto 30.

CCF: Rf = 0,31, gel de sílice, tolueno/etanol 5/1 (v/v)

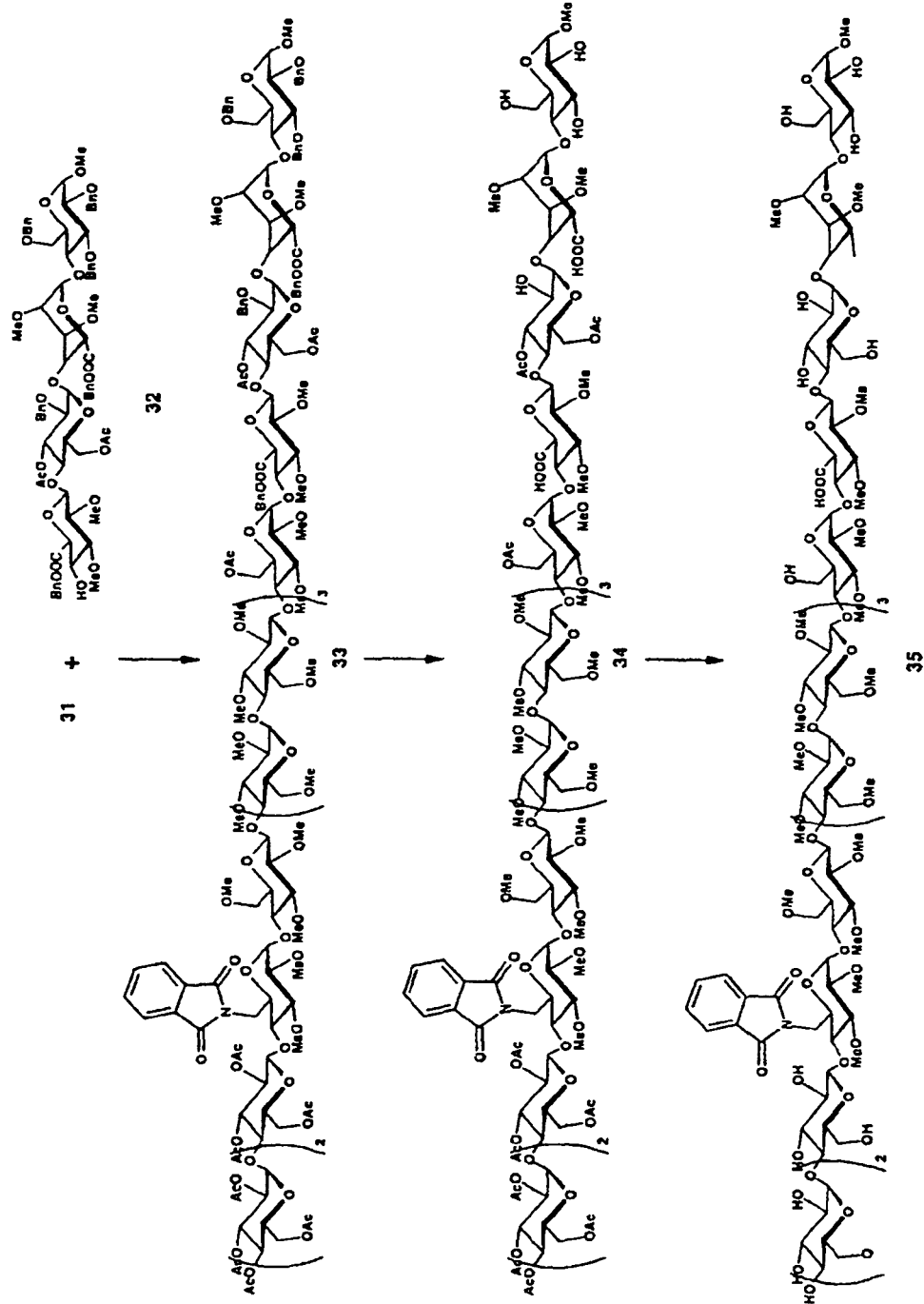
Preparación 28

Tricloroacetimidato de (2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-6-O-acetil-2,3-di-O-metil-D-glucopiranososa (31)

Se añade tricloroacetnitrilo (65,5 μ l; 0,85 mmoles) y carbonato de cesio (88,4 mg; 0,27 mmoles) a una disolución del compuesto 30 en diclorometano (3 ml). Después de agitación durante 2 horas, se filtra la mezcla, se concentra. Se purifica el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/etanol 6/1 (v/v) + 0,1% de trietilamina) para dar 477 mg del compuesto 31.

CCF: Rf = 0,35, gel de sílice, tolueno/etanol 6/1 (v/v)

ESQUEMA 7 – Síntesis del hexadecasácido 35



Preparación 29

Metil(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-acetil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(bencil 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetil-2-O-bencil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(bencil 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-bencil- α -D-glucopiranosido (33)

Se disuelve imidato 31 (370 mg; 0,121 mmoles) y compuesto 32 (336 mg; 0,242 mmoles), (obtenido según P. Westerduin, *et al.* BioOrg. Med. Chem, 1.994, 2, 1.267) en una mezcla de diclorometano/dietil éter 1/2 (v/v) (5,5 ml). Después de adición de tamiz molecular 4Å en polvo, se enfría la mezcla a - 20°C y se añade una disolución 0,1 M de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo en diclorometano (181,5 μ l). Después de 25 minutos, se neutraliza la mezcla por adición de hidrogenocarbonato de sodio sólido. Después de filtración y concentración, se purifica el residuo por cromatografía sobre gel Sephadex® LH20, seguido por una cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetona 6/5 (v/v)) para dar 302 mg del compuesto 33.

$[\alpha]_D = +86^\circ$ (c = 1, diclorometano).

Preparación 30

Metil(2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-acetil-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranosido (34)

Se trata una disolución del compuesto 33 (104 mg; 0,024 mmoles) en ácido acético (5 ml) bajo presión de hidrógeno [4×10^5 Pa (4 bar)] en presencia de paladio sobre carbono al 10% (104 mg), durante 4 horas. Después de filtración, se liofiliza la disolución para dar el compuesto 34 (87 mg), que se utiliza en la etapa siguiente sin purificación.

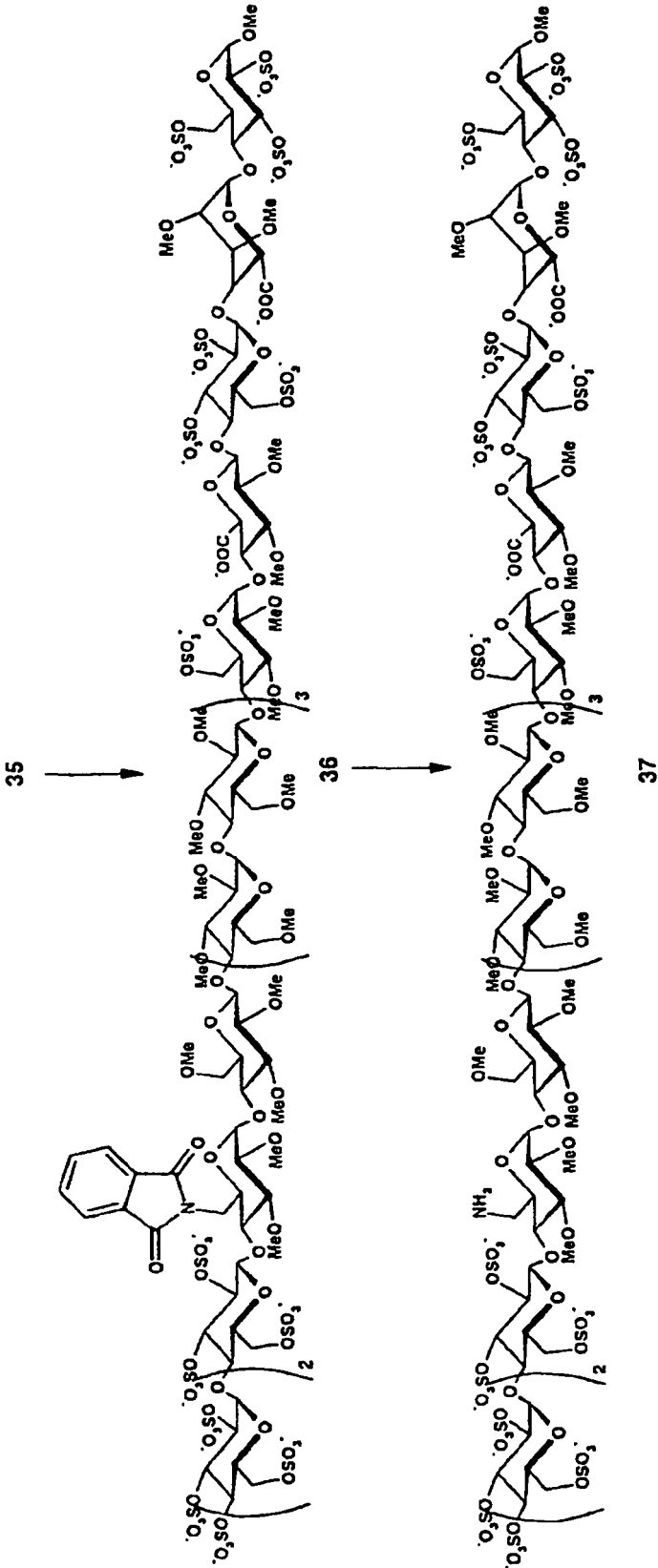
Preparación 31

Metil(α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi-2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranosido (35)

A una disolución del compuesto 34 (80 mg; 0,021 mmoles) en metanol anhidro (6,9 ml) en presencia de tamiz molecular 3Å en polvo (875 mg), se añade una disolución molar de metilato de sodio en metanol (140 μ l). Después de 20 horas a temperatura ambiente, se filtra y se neutraliza con ácido acético. La disolución se concentra de humedad y se deposita sobre columna de Sephadex® G-25 fino (3 x 92 cm). Después de elución por agua y liofilización, se obtiene el compuesto 35 (66 mg).

(Esquema pasa a página siguiente)

ESQUEMA 8 – Síntesis del oligosacárido 37



Preparación 32

Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-O-sulfonat- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-desoxi 2,3-di-O-metil-6-ftalimido- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranósido (36)

Se disuelve el poliol 35 (66,4 mg; 0,021 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida (1,8 ml). Se añade el complejo trióxido de azufre-trietilamina (320 mg; 1,77 mmoles) y se agita la mezcla, durante 20 horas, a 55°C. Se deposita la disolución sobre una columna de Sephadex® G-25 fino (3 x 92 cm), se eluye con cloruro de sodio 0,2 M. Se concentran las fracciones que contienen el producto y se desalan utilizando la misma columna eluida con agua. Después de liofilización, se obtienen 83 mg del compuesto 36.

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 4.968,92; masa experimental= 4.966,52 $\pm$ 0,16 u.m.a.

Preparación 33

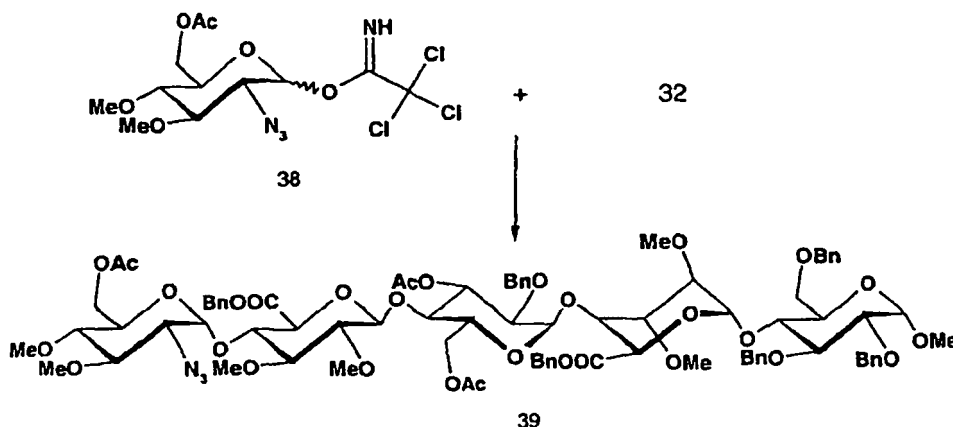
Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-amino-6-desoxi-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranósido (37)

Se disuelve el compuesto 36 (83 mg; 0,017 mmoles) en una mezcla de etanol/agua 2/1 (v/v) (1,67 ml). Se añade hidrato de hidrazina (81,2 μ l; 1,67 mmoles) y se hace hervir la mezcla a reflujo durante 20 horas. Se deposita la disolución sobre una columna de Sephadex® G-25 fino (3 x 92 cm) eluida con agua. Después de concentración de las fracciones que contienen el producto, se disuelve el residuo en etanol/agua 2/1 (v/v) (5,00 ml) y se trata de nuevo como en las condiciones precedentes con hidrato de hidrazina (81,2 μ l) para dar 71 mg del compuesto 37.

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química = 4.838,32; masa experimental = 4.814,6 $\pm$ 0,70 u.m.a.

Esquema 9

Síntesis del pentasacárido 39



Preparación 34

Metil(6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(bencil 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetil-2-O-bencil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(bencil 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-bencil- α -D-glucopiranósido (39)

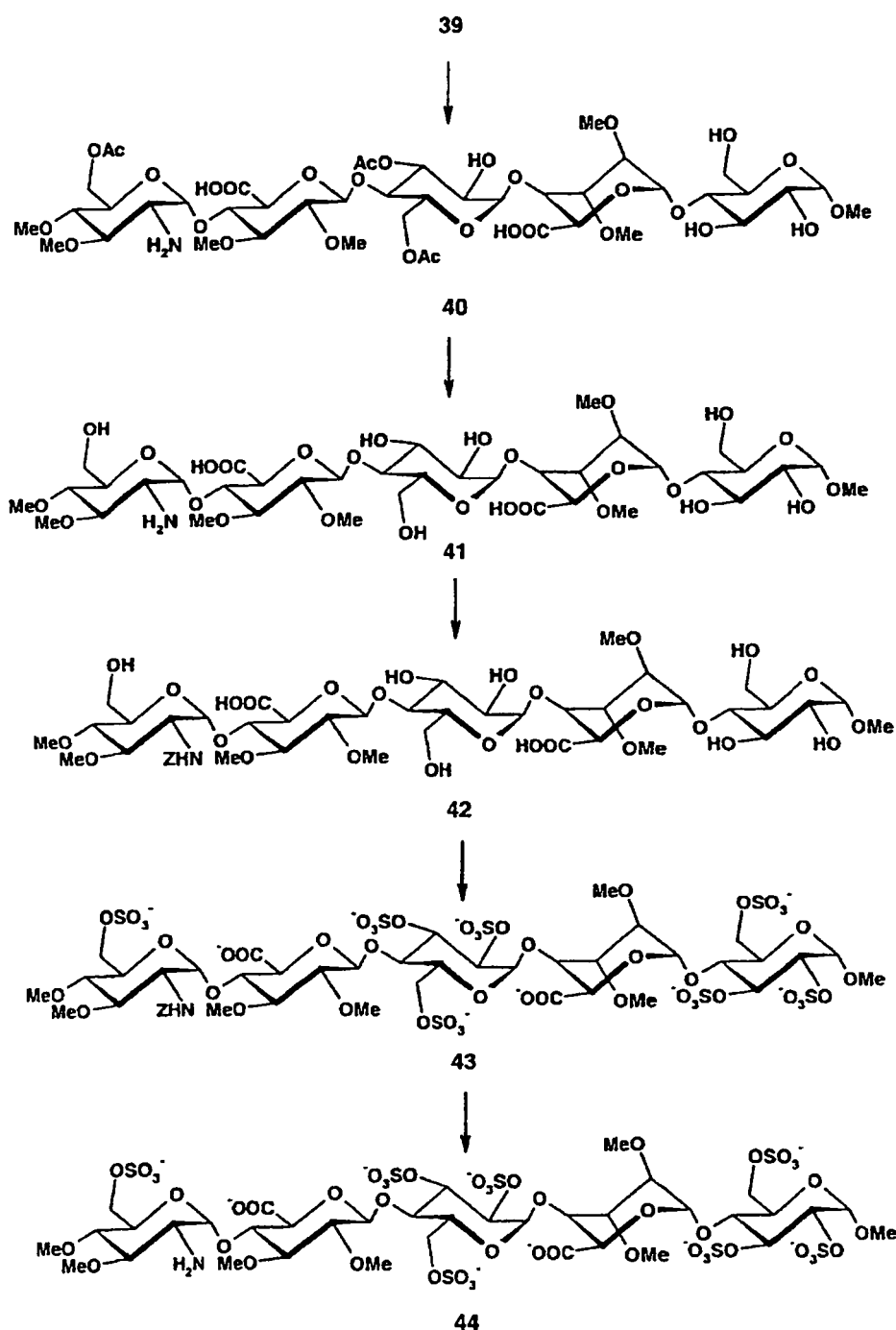
Se disuelve el compuesto trichloroacetimidato de 6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α,β -D-glucopiranososa 38 (265 mg; 0,631 mmoles) (obtenido según J. Basten, *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. (1.992), 2(9), 901) y compuesto 32 (584 mg; 0,420 mmoles) (obtenido según P. Westerduin, *et al.* BioOrg. Med. Chem., 1.994, 2, 1.267) en una

mezcla de diclorometano/dietil éter 1/2 (v/v) (28,5 ml). Después de adición de tamiz molecular 4Å en polvo, se enfría la mezcla a -20°C y se añade una disolución 0,1 M de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo en diclorometano (94,6 μ l). Después de 10 minutos, se añade de nuevo imidato (53,8 mg), después una disolución 0,1 M de trifluorometanosulfonato de trimetilsililo en diclorometano (19,2 μ l). Después de 10 minutos, la mezcla se neutraliza por adición de hidrogenocarbonato de sodio sólido. Después de filtración y concentración, se purifica el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetato de etilo 3/1 (v/v)) para dar 499 mg del compuesto 39.

$[\alpha]_D = +66^\circ$ (c = 1,07, diclorometano).

Esquema 10

Síntesis del pentasacárido 44 (Procedimiento I)



ES 2 292 625 T3

Preparación 35

Metil(6-O-acetil-2-amino-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(3,6-di-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosil-urónico)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranósido (40)

Se trata una disolución del compuesto 39 (552,6 mg; 0,335 mmoles) en una mezcla de *tert*-butanol/acetato de etilo 5/1 (v/v) (16 ml) bajo presión de hidrógeno [1×10^6 Pa (10 bar)] en presencia de paladio sobre carbono al 10% (1,10 g) y ácido clorhídrico 1 M (0,336 ml), durante 4 horas 30. Después de filtración, se concentra la disolución y da el compuesto 40, que se utiliza en la etapa siguiente sin purificación.

Preparación 36

Metil(2-amino-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranósido (41)

Se disuelve el compuesto 40 (324 mg; 0,300 mmoles) en metanol (8,8 ml). Se añade una disolución 5 M de hidróxido de sodio (2,2 ml) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Se neutraliza con una resina Dowex[®] 50 H⁺ y se filtra. Se hace pasar la disolución por una columna de Sephadex[®] G-25 fino eluida con agua. Se concentran las fracciones que contienen el producto y se obtienen 254,2 mg del compuesto 41. En esta fase se verifica por RMN que se han eliminado los grupos protectores (bencilos y acetilos).

CCF: Rf = 0,26, gel de sílice, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 5/5/1/3 (v/v/v/v)

Preparación 37

Metil(2-(benciloxicarbonil)amino-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranósido (42)

Se disuelve el compuesto 41 (241,1 mg; 0,253 mmoles) en agua (12,4 ml) y se añade hidrogenocarbonato de sodio (63,7 mg), después cloroformiato de bencilo (41 μ l) gota a gota. Después de 12 horas de agitación, se hace pasar la mezcla de reacción por una columna de Sephadex[®] G-25 fino eluida con agua. Se concentran las fracciones que contienen el producto. La purificación por cromatografía de columna sobre gel de sílice (acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 21/17/3,6/10 v/v/v/v) da 221 mg del compuesto 42.

CCF: Rf = 0,63, gel de sílice, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 5/5/1/3 (v/v/v/v)

Preparación 38

Sal de sodio del metil(2-(benciloxicarbonil)amino-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranósido (43)

Se disuelve el poliol 42 (19,6 mg; 0,018 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida (1,62 ml). Se añade el complejo trióxido de azufre-trietilamina (114 mg) y se agita la mezcla durante 20 horas, a 55°C, al abrigo de la luz. Se deposita la disolución sobre una columna de Sephadex[®] G-25 fino eluida con cloruro de sodio 0,2 M. Se concentran las fracciones que contienen el producto y se desalan utilizando la misma columna eluida con agua. Después de liofilización, se obtienen 28,5 mg del compuesto 43.

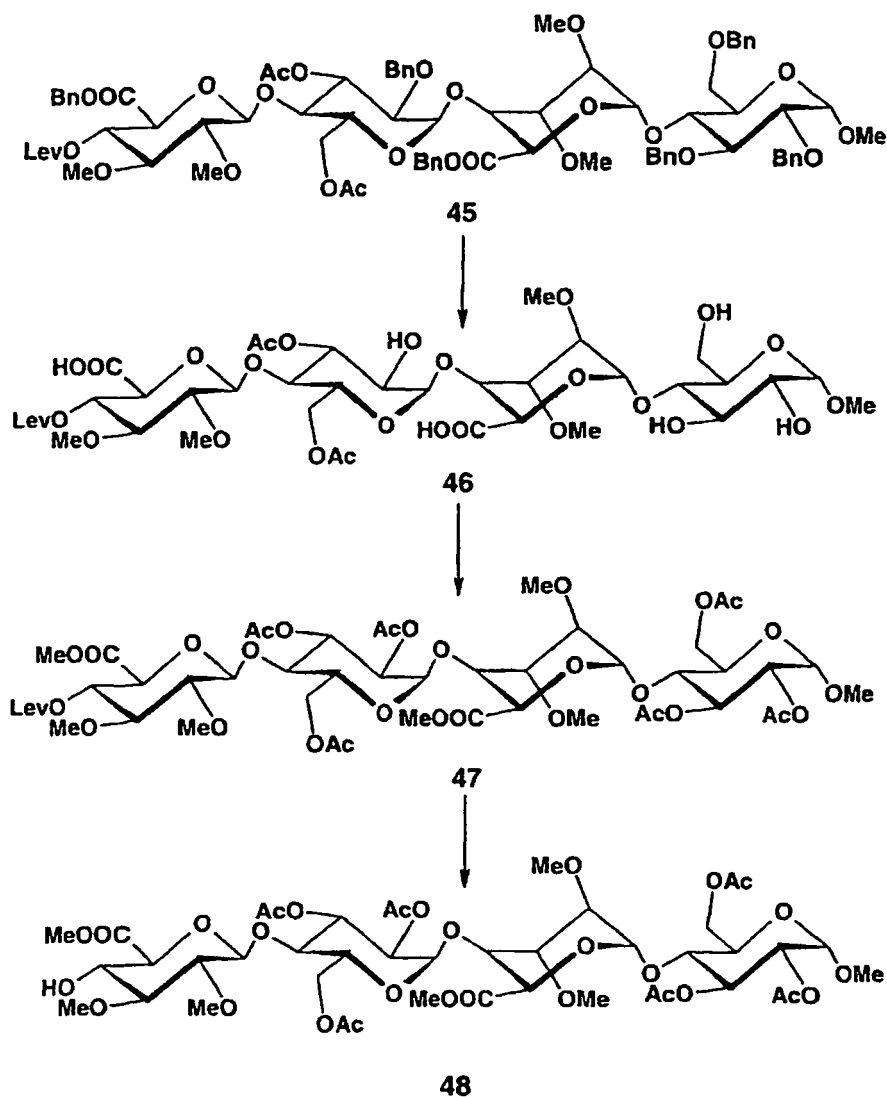
$[\alpha]_D = +48^\circ$ (c = 2,75, agua).

Preparación 39

Sal de sodio del metil(2-amino-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranósido (44)

Se trata una disolución del compuesto 43 (27,5 mg; 0,015 mmoles) en una mezcla de *tert*-butanol (333 μ l)-agua (500 μ l) bajo presión de hidrógeno [5×10^5 Pa (5 bar)] en presencia de paladio sobre carbono al 10% (8,25 mg), durante 16 horas. Después de filtración, se concentra la disolución y se deposita el residuo sobre columna de Sephadex[®] G-25 fino (3 x 92 cm). Después de elución con agua y liofilización, se obtienen 23,7 mg del compuesto 44.

$[\alpha]_D = +58^\circ$ (c = 1, agua).



Preparación 40

Metil(ácido 4-O-levulinil-2,3-di-O-metil-β-D-glucopiranosilurónico)-(1→4)-(3,6-di-O-acetil-α-D-glucopiranosil)-(1→4)-(ácido 2,3-di-O-metil-α-L-idopiranosilurónico)-(1→4)-α-D-glucopiranosido (46)

Se trata una disolución del compuesto 45 (4,50 g; 3,02 mmoles) (obtenido según P. Westerduin, *et al.* BioOrg. Med. Chem. 1.994, 2, 1.267) en una mezcla de acetato de etilo/*tert*-butanol (72 ml; 1/1, v/v) a presión de hidrógeno [4×10^5 Pa (4 bar)] en presencia de paladio sobre carbono al 10% (9,0 g), durante 6 horas. Después de filtración y concentración, el compuesto 46 obtenido se emplea directamente en la etapa siguiente sin purificación.

CCF: R_f = 0,54, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 26/22/4,6/17 v/v/v/v.

Preparación 41

Metil(metil 4-O-levulinil-2,3-di-O-metil-β-D-glucopiranosiluronato)-(1→4)-(2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosil)-(1→4)-(metil 2,3-di-O-metil-α-L-ido-piranosil-uronato)-(1→4)-2,3,6-tri-O-acetil-α-D-glucopiranosido (47)

A una disolución del compuesto 46 (2,57 g; 2,71 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (35 ml) se añade, a 0°C, hidrogenocarbonato de potasio (2,71 g), después de yoduro de metilo (3,4 ml). Después de 16 h de agitación a temperatura ambiente, se enfría el medio de reacción a 0°C. Se añaden entonces sucesivamente dimetilaminopiridina (132 mg), después anhídrido acético 1,5 ml). Se agita la mezcla durante 16 h. Después de neutralización del exceso de anhídrido acético, se diluye con acetato de etilo. Se lava la fase orgánica sucesivamente con una disolución de

hidrogenosulfato de potasio al 10% y agua, después con una disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y agua, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra, después se evapora a sequedad. Se purifica el residuo por cromatografía de columna sobre gel de sílice [ciclohexano/(acetato de etilo/etanol 1/1) 9/5] para dar 2,51 g del compuesto 47.

CCF: $R_f = 0,41$, tolueno/acetona 2/1 v/v.

Preparación 42

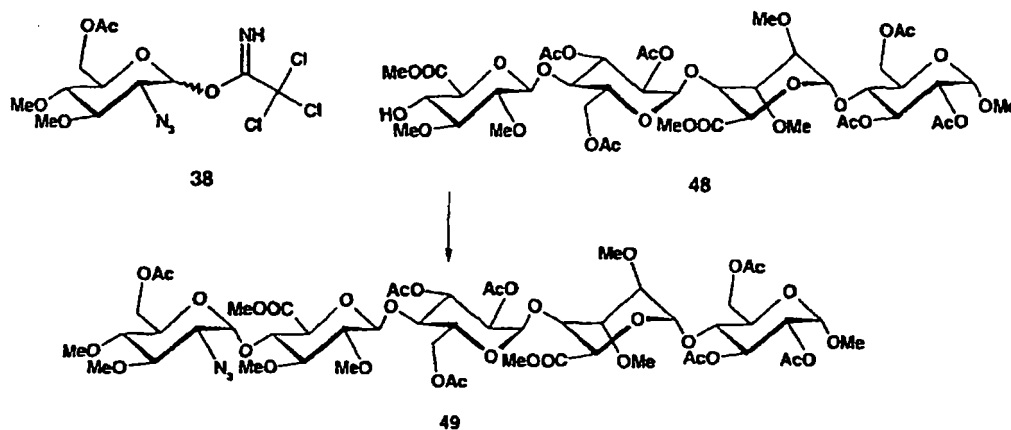
Metil(metil 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(metil 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido (48)

Se disuelve el compuesto 47 (2,5 g; 2,56 mmoles) en una mezcla de tolueno/etanol 1/1 v/v (500 ml). Se añade acetato de hidrazina (1,01 g). Después de 2 h de agitación a temperatura ambiente, se concentra a sequedad el medio de reacción. Se disuelve el residuo en diclorometano. La fase orgánica se lava sucesivamente con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 2% y agua, se seca sobre sulfato de sodio, se filtra, después se evapora a sequedad. Después de cromatografía de columna sobre gel de sílice (tolueno/acetato de etilo 1/4 v/v), se obtienen 2,01 g del compuesto 48.

CCF: $R_f = 0,37$, tolueno/acetona 2/1 v/v.

Esquema 12

Síntesis del pentasacárido 49



Preparación 43

Metil(6-O-acetil-2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(metil 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(metil 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosido (49)

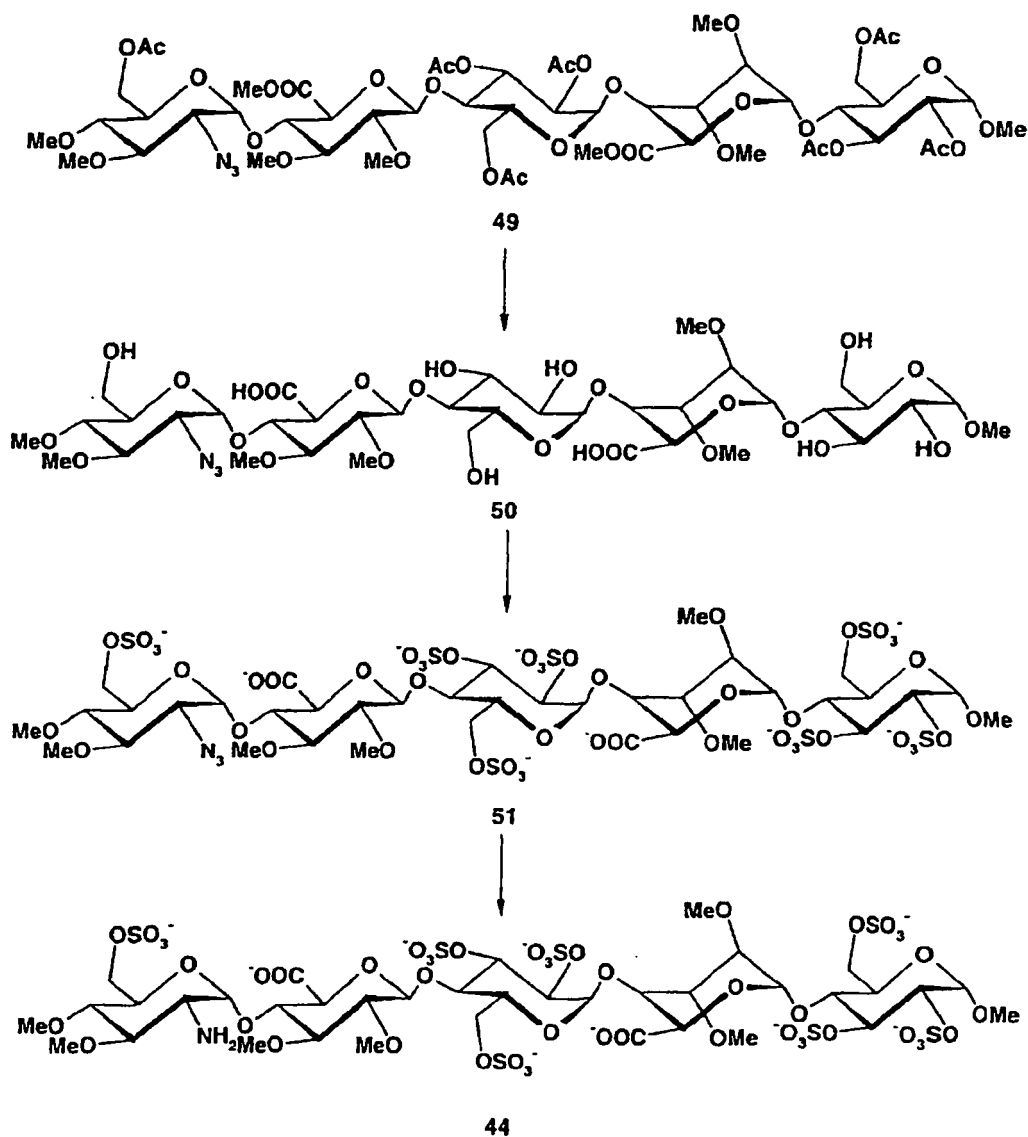
Se disuelve imidato 38 (1,18 g; 2,81 mmoles) (obtenido según J. Basten *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. (1992), 2 (9), 901) y compuesto 48 (1,83 g; 1,75 mmoles) en una mezcla de diclorometano/dietil éter 1/2 (v/v) (126 ml). Después de adición de tamiz molecular 4Å en polvo, se enfría la mezcla a -20°C y se añade una disolución 1 M de trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo en diclorometano (421 μ l). Después de 30 minutos, se añade una nueva cantidad de imidato (266 mg) así como una disolución 1 M de trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo en diclorometano (168 μ l). Después de 10 minutos, la mezcla se neutraliza por adición de hidrogenocarbonato de sodio sólido y se filtra. Se continúa con diclorometano, se lava sucesivamente con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 2% y agua, se seca sobre sulfato de sodio, después se concentra al vacío. Se purifica el residuo obtenido por cromatografía de columna sobre gel de sílice (diclorometano/acetato de etilo 4/3, después 1/1 v/v) para dar 1,814 g del compuesto 49.

CCF: $R_f = 0,57$, tolueno/acetato de etilo 3/1 v/v.

$[\alpha]_D = +93^\circ$ (c = 1,15, diclorometano).

Esquema 13

Síntesis del pentasacárido 44 (Procedimiento II)



50 Preparación 44

Metil(2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-glucopiranosido (50)

Se añade agua oxigenada al 30% (42 ml), a - 5°C, a una disolución del compuesto 49 (845,3 mg) en tetrahidrofurano (104 ml). Después de 5 minutos de agitación, se añade gota a gota una disolución acuosa 0,7 M de hidróxido de litio (19,2 ml).

Se agita la mezcla de reacción durante 1 h, a - 5°C, después durante 4 h, a 0°C y finalmente durante 16 h, a temperatura ambiente. Se neutraliza con una disolución 1 M de ácido clorhídrico.

Se deposita la disolución sobre una columna de Sephadex® G-25 fino (5 x 1.000 cm) eluida con agua. Se reúnen las fracciones que contienen el compuesto esperado, se concentra y se deposita en una columna de resina Dowex AG 50 WX4 H⁺ (50 ml). Se recoge el compuesto a 0°C y se concentra para obtener 618 mg del compuesto 50.

CCF: R_f = 0,56, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 26/22/4,6/17 v/v/v/v.

Preparación 45

Sal de sodio del metil(2-azido-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosiluronato)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido (51)

Justo antes de utilizar el compuesto 50 se codestila con *N,N*-dimetilformamida (3 x 29 ml). A una disolución del compuesto 50 (612 mg; 0,624 mmoles) en *N,N*-dimetilformamida (58 ml), se añade complejo de trióxido de azufre-trietilamina (3,84 g).

Se agita la mezcla durante 16 horas, a 55°C, al abrigo de la luz. Se enfría la mezcla a 0°C, se añade gota a gota a una disolución de hidrogenocarbonato de sodio (5,33 g) en agua (200 ml). Se agita durante 16 h a temperatura ambiente y se concentra a sequedad.

Se disuelve el residuo en agua y se deposita la disolución en una columna de Sephadex® G-25 fino eluida con cloruro de sodio 0,2 M. Se concentran las fracciones que contienen el producto y se desalan utilizando la misma columna eluida con agua. Después de liofilización, se obtienen 1,06 g del compuesto 51.

CCF: Rf = 0,5, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 3/5/1/3 v/v/v/v.

Preparación 46

Sal de sodio del metil(2-amino 2-desoxi 3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido (44)

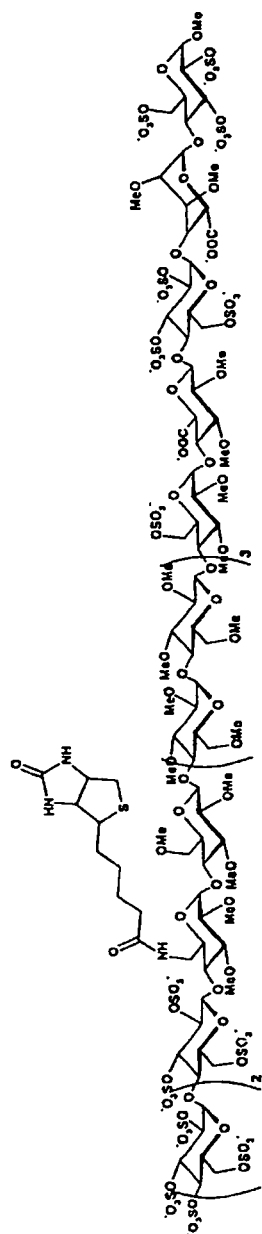
Esta hidrogenolisis se ha realizado dos veces y cada vez sobre 534,4 mg del compuesto 51.

Se trata una disolución del compuesto 51 (534,4 mg) en una mezcla de *tert*-butanol (6,7 ml; 12,6 ml/g)-agua (10 ml; 19 ml/g) bajo presión de hidrógeno [5×10^5 Pa (5 bar)] en presencia de paladio sobre carbono al 10% (160 mg), a 40°C, durante 4 horas. Después de filtración (filtro Millipore® LSWP 5 μ m), se concentra la disolución a sequedad para dar 530 mg del compuesto 44.

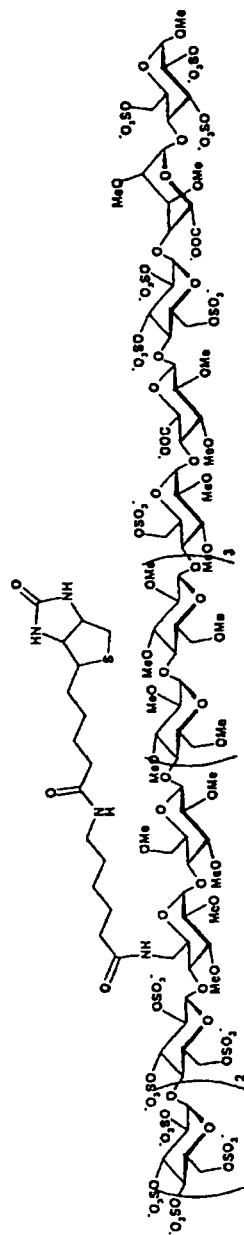
CCF: Rf = 0,49, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 3/5/1/3 v/v/v/v.

(Ejemplos pasan a página siguiente)

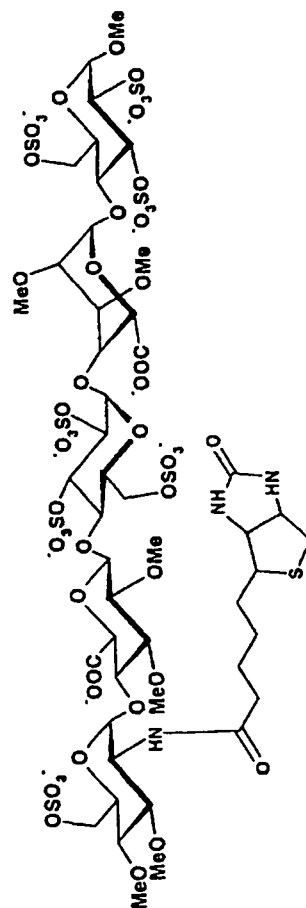
EJEMPLO 1



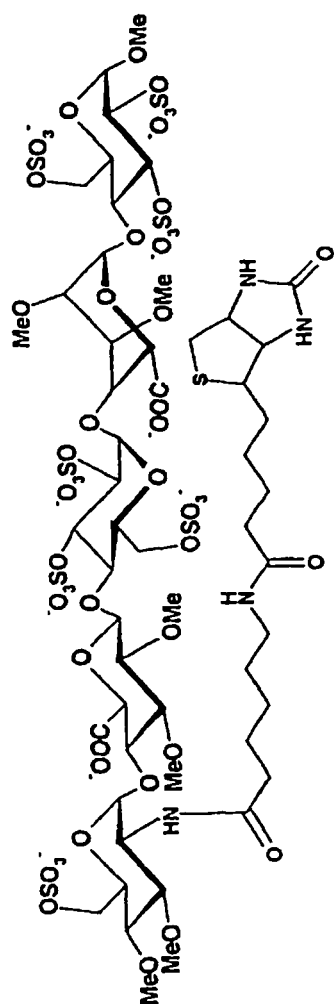
EJEMPLO 2



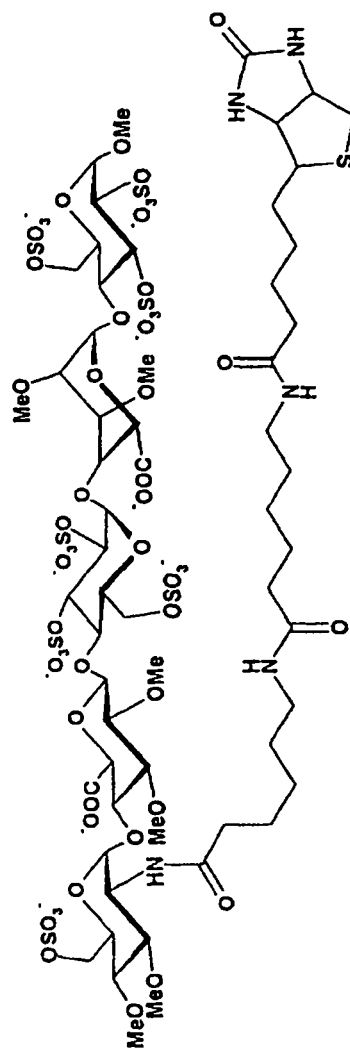
EJEMPLO 4



EJEMPLO 5



EJEMPLO 6



Ejemplo 1

Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-biotinamido-6-desoxi-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido

- 10 A una disolución del compuesto 37 (18 mg; 3,72 μ moles) en hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (1,5 ml), se añade sulfosuccinimida de biotina (16,5 mg).

Después de 16 horas de agitación a temperatura ambiente, se deposita la mezcla de reacción en columna de Sephadex® G-25 fino eluida con cloruro de sodio.

- 15 Se concentran las fracciones que contienen el producto y se desalan en la misma columna eluida con agua.

Después de liofilización, se obtienen 15,9 mg del compuesto del Ejemplo 1.

- 20 $[\alpha]_D = +59^\circ$ (c = 0,78, agua).

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 5.065,12; masa experimental= 5.064,18 $\pm$ 1,04 u.m.a.

Ejemplo 2

Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamido)hexamido]-6-desoxi-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido

- 35 A una disolución del compuesto 37 (18 mg; 3,72 μ moles) en hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (1,5 ml), se añade 6-(biotinamido) hexanoato (16,5 mg). Después de 16 horas de agitación a temperatura ambiente, se deposita la mezcla de reacción sobre columna de Sephadex® G-25 fino eluida con cloruro de sodio.

Se concentran las fracciones que contienen el producto y se desalan en la misma columna eluida con agua.

- 40 Después de liofilización, se obtienen 17,9 mg del compuesto del Ejemplo 2.

$[\alpha]_D = +60^\circ$ (c = 1,0, agua).

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 5.178,28; masa experimental= 5.176,3 $\pm$ 0,77 u.m.a.

45

Ejemplo 3

Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6[6-(6-biotinamidohexamido)hexamido]-6-desoxi-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3,6-tri-O-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-O-sulfonato-2,3-di-O-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido

55

A una disolución del compuesto 37 (17 mg; 3,51 μ moles) en hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (1,4 ml), se añade 6-(6-biotinamidohexamido) hexanoato de sulfosuccinimidilo (23,6 mg).

Después de 16 horas de agitación a temperatura ambiente, se deposita la mezcla de reacción en columna de Sephadex® G-25 fino eluida con cloruro de sodio. Se concentran las fracciones que contienen el producto y se desalan en la misma columna eluida con agua.

- Después de liofilización, se obtienen 17,4 mg del compuesto del Ejemplo 3.

- 65 $[\alpha]_D = +64^\circ$ (c = 1,0, agua).

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 5.291,44; masa experimental= 5.292,1 $\pm$ 0,83 u.m.a.

ES 2 292 625 T3

Ejemplo 4

Sal de sodio del metil(2-biotinamido-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido

A una disolución del compuesto 44 (21,2 mg; 0,012 mmoles) en hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (750 μ l), se añade una disolución de N-hidroxisuccinimida de biotina (42 mg) en N,N-dimetilformamida (750 μ l). Después de 16 horas de agitación a temperatura ambiente, se deposita la mezcla de reacción en columna de Sephadex[®] G-25 fino.

Después de elución con agua y liofilización, se obtienen 22,3 mg del compuesto del Ejemplo 4.

$[\alpha]_D = +38^\circ$ (c = 0,15, agua).

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 1.938,48; masa experimental= 1.937,48 $\pm$ 0,11 u.m.a.

Ejemplo 5

Sal de sodio del metil(2-[N-(6-biotinamido hexanoil)]-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido

Esta reacción se ha realizado dos veces y cada vez sobre 494,5 mg del compuesto 44.

El compuesto 44 (494,5 mg; 0,289 mmoles) se disuelve en una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (116 ml).

Se añade gota a gota una disolución de 6-(biotinamido) hexanoato de sulfosuccinimida (1,46 g; 2,63 mmoles) en una disolución de hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (12 ml). Después de 16 horas de agitación a temperatura ambiente, se añade una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 M y se agita durante 1 h. Se deposita la mezcla de reacción en una columna de Sephadex[®] G-25 fino (5 x 1.000 cm) eluida con cloruro de sodio.

Se reúnen las fracciones que contienen el producto y que proceden de las dos reacciones.

Después de liofilización, se obtienen 999,2 mg del Ejemplo 5.

CCF: Rf = 0,42, acetato de etilo/piridina/ácido acético/agua 3/5/1/3 v/v/v/v.

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 2.051,64; masa experimental: 2.051,60 $\pm$ 0,43 u.m.a.

Ejemplo 6

Sal de sodio del metil(2-[6-(6-biotinamidohexamido)hexamido]-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido

Se disuelve el compuesto 44 (30,1 mg; 17,6 μ moles) en una disolución acuosa de hidrogenocarbonato de sodio al 0,5% (7 ml). Se añade gota a gota una disolución de 6-(6-biotinamidohexamido) de sulfosuccinimidilo (118 mg; 176 μ moles) en una disolución de hidrogenocarbonato de sodio a 0,5% (1 ml). Después de 16 horas de agitación a temperatura ambiente, se añade una disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 M y se agita durante 1 h. Se deposita la mezcla de reacción en una columna de Sephadex[®] G-25 fino (2 x 85 cm) eluida con cloruro de sodio.

Se reúnen las fracciones que contienen el producto, se concentran y se desalan en una columna de Sephadex[®] G-25 fino (2 x 85 cm) eluida con agua.

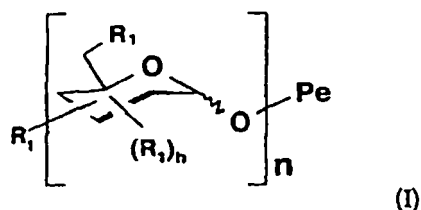
Después de liofilización, se obtienen 26,5 mg del compuesto del Ejemplo 6.

Masa: método "ESI", modo negativo: masa química= 2.164,48; masa experimental: 2.164,29 $\pm$ 0,38 u.m.a.

REIVINDICACIONES

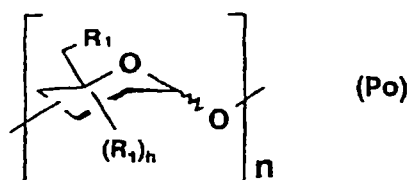
1. Polisacáridos sintéticos con actividad antitrombótica y sus sales farmacéuticamente aceptables **caracterizados** porque presentan al menos un enlace covalente con biotina o un derivado de la biotina.

2. Polisacáridos según la reivindicación 1 de fórmula:

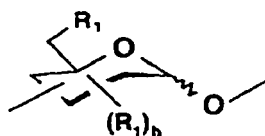


en la que:

- el trazo ondulado representa un enlace situado bien por debajo o por encima del plano del anillo piranósico,

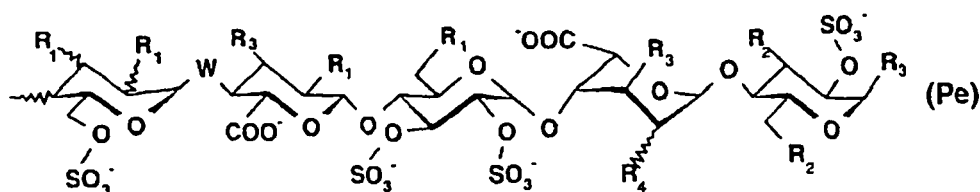


Po representa un polisacárido, que contiene n unidades monosacáridicas idénticas o diferentes, unidas por su carbono anomérico a Pe,



es una representación esquemática de una unidad monosacáridica con estructura piranósica elegida entre: hexosas, pentosas y los desoxiazúcares correspondientes, estando unida esta unidad por su carbono anomérico a otra unidad monosacáridica y estando los grupos hidroxilo de esta unidad sustituidos con grupos R₁ idénticos o diferentes, siendo R₁ tal como se define a continuación,

- Pe representa un pentasacárido de estructura:



- h es igual a 1 ó 2,

- n es un número entero y puede tener cualquier valor de 0 a 25,

- R₁ representa la secuencia -T-Biot, un grupo alcoxi (C₁-C₆) o un grupo

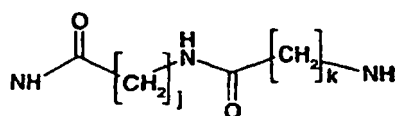
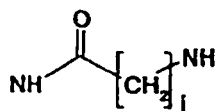
- OSO₃⁻,

- R₂ representa la secuencia -T-Biot, un grupo alcoxi (C₁-C₆) o un grupo

- OSO₃⁻,

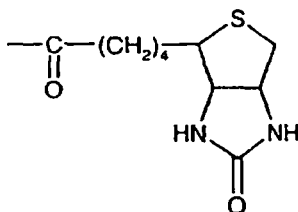
- R₃ representa la secuencia -T-Biot, un grupo alcoxi (C₁-C₆),

- R_4 representa la secuencia -T-Biot, un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo
- OSO_3^- o bien R_4 constituye un puente $-O-CH_2-$, estando unido el grupo $-CH_2-$ al átomo de carbono portador de la función carboxílica en el mismo ciclo; entendiéndose que al menos uno de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 o R_4 representa un grupo -T-Biot,
- W representa un átomo de oxígeno o un grupo metileno,
- T representa una de las secuencias elegidas entre: NH,



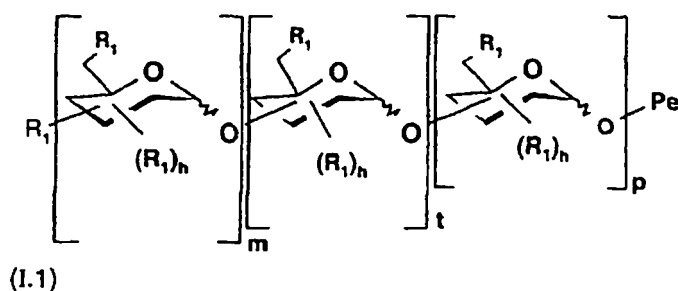
en los que j y k, idénticas o diferentes, son números enteros que pueden ser cualquier valor de 1 a 10;

- Biot representa el grupo:

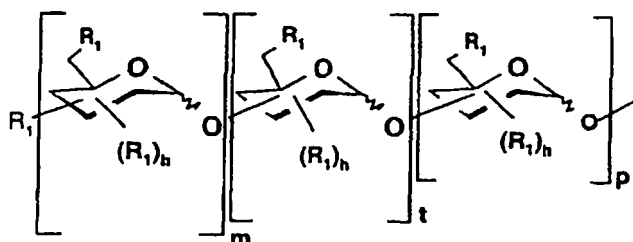


así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

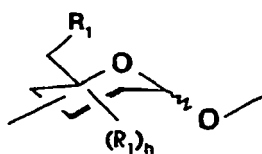
3. Polisacáridos según una de las reivindicaciones 1 ó 2 de fórmula (I.1):



en la que:



representa una familia particular de polisacáridos Po, unidos por su carbono anomérico a Pe tal como se define para (I),



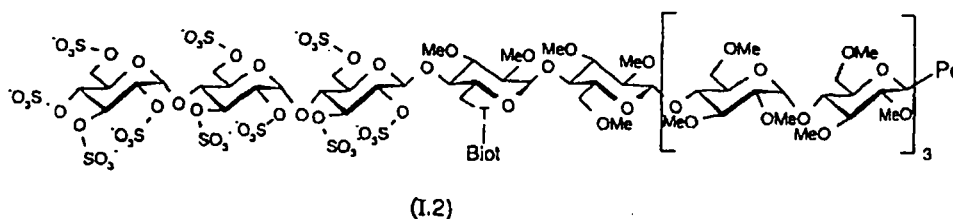
es tal como se define para (I),

- los grupos R_1 son tal como se define para (I) y, para un mismo monosacárido, pueden ser idénticos o diferentes,
- el monosacárido contenido en $[]_m$ se repite m veces, el monosacárido contenido en $[]_t$ se repite t veces, el monosacárido contenido en $[]_p$ se repite p veces,
- m es un número entero que varía de 1 a 5, t es un número entero que varía de 0 a 24 y p es un número entero que varía de 0 a 24, entendiéndose que $1 \leq m+t+p \leq 25$,

así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

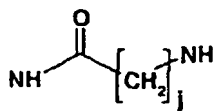
4. Polisacáridos según la reivindicación 3 **caracterizados** porque uno solo de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 o R_4 representa la secuencia -T-Biot siendo T y Biot tal como se define para (I).

5. Hexadecasacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de fórmula (1.2):

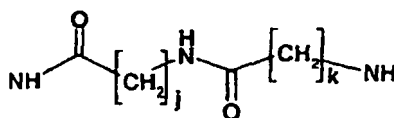


en la que:

- T representa una de las secuencias elegida entre: NH,

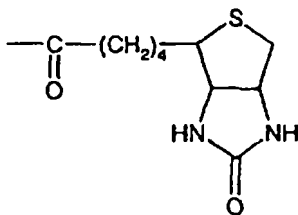


o

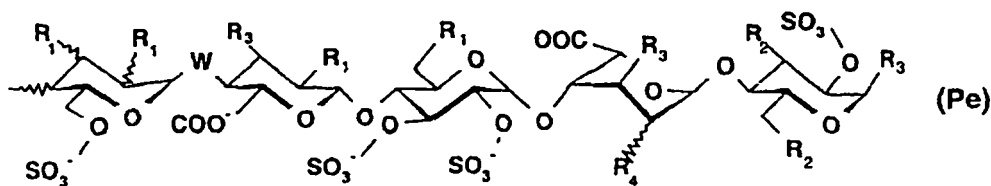


en las que j y k, idénticas o diferentes, son números enteros que pueden ser cualquier valor de 1 a 10;

- Biot representa el grupo:



- Pe representa un pentasacárido de estructura:

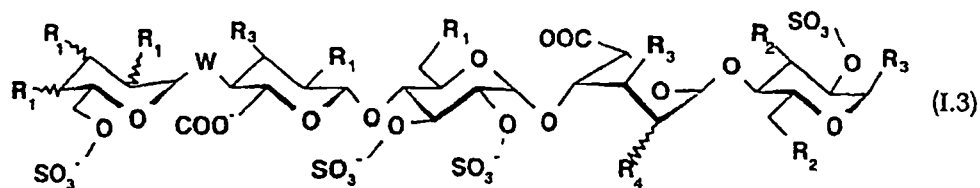


en el que:

- R_1 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
- R_2 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$,
- R_3 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6),
- R_4 representa un grupo alcoxi (C_1-C_6) o un grupo $-OSO_3^-$ o bien R_4 constituye un puente $-O-CH_2-$, estando unido el grupo $-CH_2$ al átomo de carbono portador de la función carboxílica en el mismo ciclo;
- W representa un átomo de oxígeno o un grupo metileno;

así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

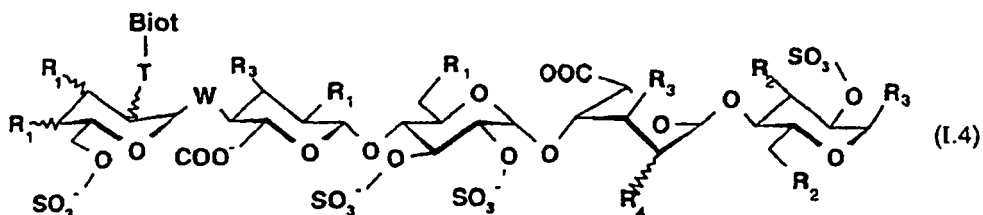
6. Pentasacáridos según una de las reivindicaciones 1 ó 2 de fórmula (I.3):



en los que R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y W son como se define para (I), así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

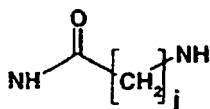
7. Pentasacáridos según la reivindicación 6 **caracterizados** porque uno solo de los sustituyentes R_1 , R_2 , R_3 o R_4 representa la secuencia -T-Biot siendo T y Biot tal como se define para (I).

8. Pentasacáridos según una de las reivindicaciones 6 ó 7 de fórmula (I.3) de fórmula (I.4):

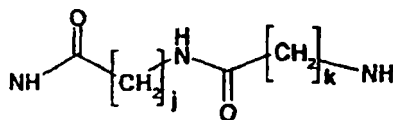


en la que:

- T representa una de las secuencias elegida entre: NH,

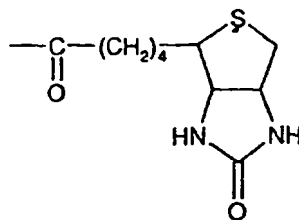


o



en las que j y k, idénticas o diferentes, son números enteros que pueden ser cualquier valor de 1 a 10;

- Biot representa el grupo:



- R₁ representa un grupo alcoxi (C₁-C₆) o un grupo -OSO₃⁻,
- R₂ representa un grupo alcoxi (C₁-C₆) o un grupo -OSO₃⁻,
- R₃ representa un grupo alcoxi (C₁-C₆),
- R₄ representa un grupo alcoxi (C₁-C₆) o un grupo -OSO₃⁻ o bien R₄ constituye un puente -O-CH₂-, estando unido el grupo -CH₂- al átomo de carbono portador de la función carboxílica en el mismo ciclo,
- W representa un átomo de oxígeno o un grupo metileno, así como sus sales farmacéuticamente aceptables.

9. Polisacáridos según una de las reivindicaciones 1 ó 2 elegidos entre:

- Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-biotinamido-6-desoxi-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-*O*-sulfonato-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
- Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamido)hexamido]-6-desoxi-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-*O*-sulfonato-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,
- Sal de sodio del metil(2,3,4,6-tetra-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(6-[6-(biotinamido)hexamido]-6-desoxi-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-[(2,3,6-tri-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2,3,6-tri-*O*-metil- β -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)]₃-(6-*O*-sulfonato-2,3-di-*O*-metil- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-*O*-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-*O*-sulfonato- α -D-glucopiranosido,

- Sal de sodio del metil(2-biotinamido-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido,

- Sal de sodio del metil(2-[6-(6-biotinamidohexamido) hexamido]-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido,

- Sal de sodio del metil(2-[N-(6-biotinamido hexanoil)]-2-desoxi-3,4-di-O-metil-6-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- β -D-glucopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-(2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosil)-(1 $\rightarrow$ 4)-(ácido 2,3-di-O-metil- α -L-idopiranosilurónico)-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3,6-tri-O-sulfonato- α -D-glucopiranosido.

10. Composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, un polisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 eventualmente en asociación con uno o varios excipientes inertes y apropiados.

11. Utilización de las composiciones farmacéuticas según la reivindicación 10 para la fabricación de un medicamento útil para el tratamiento de patologías consecutivas para una modificación de la homeostasis del sistema de la coagulación que aparece durante trastornos del sistema cardiovascular y cerebrovascular como los trastornos tromboembólicos asociados con la aterosclerosis y la diabetes tales como: angina inestable, ataque cerebral, reestenosis después de angioplastia, endarterectomía, colocación de prótesis endovasculares o los trastornos tromboembólicos asociados con la retrombosis después de trombolisis, infarto, demencia de origen isquémico, enfermedades arteriales periféricas, hemodiálisis, fibrilaciones auriculares, durante la utilización de prótesis vasculares de puentes aorto-coronarios, en el tratamiento o la prevención de patologías tromboembólicas de origen venoso tales como embolias pulmonares, para prevenir o para tratar las complicaciones trombóticas observadas después de operaciones quirúrgicas, desarrollos de tumores o desarreglos de la coagulación, inducidos por activadores bacterianos, víricos o enzimáticos.

12. Utilización de un polisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para recubrir prótesis.

13. Utilización de un polisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como adyuvantes durante la endarterectomía realizada con globos porosos.

14. Procedimiento para emplear avidina o estreptavidina **caracterizado** porque permite neutralizar los polisacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

15. Utilización de avidina o estreptavidina para la preparación de medicamentos destinados a neutralizar los polisacáridos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

16. Polisacárido según una de las reivindicaciones 1 ó 2 de fórmula:

