



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 314**

21 Número de solicitud: 201030366

51 Int. Cl.:

C07H 5/10 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **12.03.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
29.09.2011

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo
(Titular al 50%)

72 Inventor/es:
Fernández-Mayoralas Álvarez, Alfonso;
Nieto Sampedro, Manuel;
Casas Brugulat, Josefina;
García Álvarez, Isabel y
Romero Ramírez, Lorenzo

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Derivados azufrados de N-acetilhexosaminas y su uso como inhibidores de la división de células tumorales.**

57 Resumen:

Derivados azufrados de N-acetilhexosaminas y su uso como inhibidores de la división de células tumorales.

La presente invención describe una serie de tioglicósidos y sus derivados oxidados sulfóxido y sulfona, que confieren mayor solubilidad en medios acuosos, y su uso como antitumorales, principalmente frente a líneas celulares de glioma y adenocarcinoma de pulmón. Los nuevos tioderivados son resistentes a la hidrólisis catalizada por enzimas N-acetilhexosaminidasas y reducen el contenido de gangliósidos en células tumorales. La invención también se refiere a un procedimiento de obtención de estos compuestos y a su uso para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores.

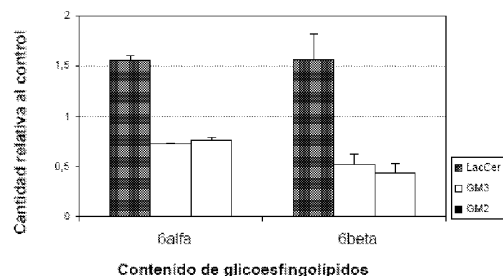


FIG. 1

ES 2 365 314 A1

DESCRIPCIÓN

Derivados azufrados de N-acetilhexosaminas y su uso como inhibidores de la división de células tumorales.

5 La presente invención se refiere a tioglicósidos, glicosilsulfóxidos y glicosilsulfonas derivados de N-acetilhexosaminas, a su procedimiento de obtención y a su uso como inhibidores de la división de células tumorales.

Estado de la técnica anterior

10 El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos y al mismo tiempo es el más mortal. En Estados Unidos, sólo la mitad de los pacientes que reciben el tratamiento estándar sobreviven un año después del diagnóstico. Menos de uno de cada diez sobrevive más de cinco años. Suele presentarse en personas mayores de cuarenta años, con un máximo de incidencia entre los 50 y 55 años y es más frecuente entre los varones. En adultos, hay unos 17000 nuevos casos de tumores cerebrales cada año (además, otros tipos de cáncer pueden generar metástasis en el cerebro) lo que supone unas 14000 muertes. El tumor cerebral es la primera causa de muerte por cáncer en niños y menores de 20 años.

El tratamiento depende de la localización y del grado del tumor; se aplica cirugía cuando el tumor es accesible y no hay peligro de dañar estructuras vitales. La radioterapia se utiliza para detener el crecimiento del tumor o para hacer que disminuya su tamaño y la quimioterapia destruye las células tumorales que quedan después de la cirugía y la radiación. La quimioterapia más habitual (BCNU, CCNU) no parece tener un efecto significativo, aunque en algunas ocasiones se ha conseguido prolongar algunos meses la supervivencia.

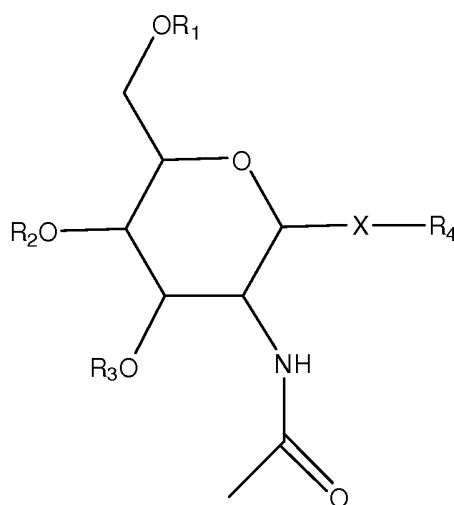
Los gangliósidos son un tipo de glicolípidos formados por un residuo del esfingolípido ceramida y una cadena de oligosacárido. Los gangliósidos tienen como característica estructural la presencia de uno o varios residuos de ácido siálico en la cadena de oligosacárido. Es conocido que cambios dramáticos en la composición de determinados gangliósidos y su metabolismo están asociados con la transformación oncogénica. Así, existen diversos estudios que sugieren que los gangliósidos asociados a tumores juegan un papel importante en su desarrollo y se ha observado que la reducción del contenido de gangliósidos reduce la capacidad de las células para formar tumores (Birkle *et al.*, *Biochemie* 2003, 85, 455-463). La patente española 200000982 describe un procedimiento de obtención de glicósidos derivados del monosacárido N-acetil-D-glucosamina y la investigación sobre su actividad inhibitoria y citotóxica en gliomas.

Teniendo en cuenta la gravedad de este tipo de tumores y la escasa efectividad de los tratamientos, el desarrollo de nuevas moléculas capaces de detener la proliferación de gliomas es de gran interés para el tratamiento de esta enfermedad.

Descripción de la invención

La presente invención describe una serie de tioglicósidos y sus derivados oxidados sulfóxido y sulfona, que confieren mayor solubilidad en medios acuosos, y su uso como antitumorales frente a líneas celulares de glioma y adenocarcinoma de pulmón. Los nuevos tioderivados son resistentes a la hidrólisis catalizada por enzimas N-acetilhexosaminidasas y reducen el contenido de gangliósidos en células tumorales.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I)



Fórmula (I)

ES 2 365 314 A1

donde

X se selecciona entre S, S(O) o S(O)₂

5 R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre H o acilo C₁-C₆,

R₄ es un alquilo C₁₆-C₂₄ o un alquenilo C₈-C₂₄,

o cualquiera de sus isómeros, sales o solvatos.

10

El término "acilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de ácidos carboxílicos lineales o ramificados, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace éster.

15

El término "alquenilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas de 1 a 25 átomos de carbono, preferiblemente de 8 a 24, que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alquenilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcocarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

20

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

25

En una realización preferida, R₁ a R₃ son H.

30

En otra realización preferida, X es S.

En otra realización preferida, X es S(O).

35

En otra realización preferida, X es S(O)₂.

En otra realización preferida, R₄ es un alquenilo C₁₆-C₂₀. En una realización aún más preferida, R₄ es un grupo octadec-9-enilo (oleilo).

40

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) según descrito anteriormente.

En una realización preferida, dicha composición comprende otro principio activo.

45

Algunos ejemplos de las composiciones farmacéuticas son sólidos (tabletas, píldoras, cápsulas, sólido granulado, etc.) o líquidos (disoluciones, suspensiones o emulsiones) preparados para la administración oral, nasal, tópica o parenteral.

50

En una realización preferida de la presente invención, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración oral, en forma sólida o líquida. Las posibles formas para la administración oral son tabletas, cápsulas, siropes o soluciones y pueden contener excipientes convencionales conocidos en el ámbito farmacéutico, como agentes agregantes (p.e. sirope, acacia, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinil pirrolidona), rellenos (p.e. lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina), disgregantes (p.e. almidón, polivinil pirrolidona o celulosa microcristalina) o un surfactante farmacéuticamente aceptable como el lauril sulfato de sodio.

55

Las composiciones para administración oral pueden ser preparadas por métodos los convencionales de Farmacia Galénica, como mezcla y dispersión. Las tabletas se pueden recubrir siguiendo métodos conocidos en la industria farmacéutica.

60

Las composiciones farmacéuticas se pueden adaptar para la administración parenteral, como soluciones estériles, suspensiones, o liofilizados de los productos de la invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia.

65

La administración de los compuestos o composiciones de la presente invención puede ser realizada mediante cualquier método adecuado, como la infusión intravenosa y las vías oral, intraperitoneal o intravenosa. La administración oral es la preferida por la conveniencia de los pacientes y por el carácter crónico de las enfermedades a tratar.

ES 2 365 314 A1

La cantidad administrada de un compuesto de la presente invención dependerá de la relativa eficacia del compuesto elegido, la severidad de la enfermedad a tratar y el peso del paciente. Sin embargo, los compuestos de esta invención serán administrados una o más veces al día, por ejemplo 1, 2, 3 ó 4 veces diarias, con una dosis total entre 0.1 y 1000 mg/Kg/día. Es importante tener en cuenta que puede ser necesario introducir variaciones en la dosis, dependiendo de la edad y de la condición del paciente, así como modificaciones en la vía de administración.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

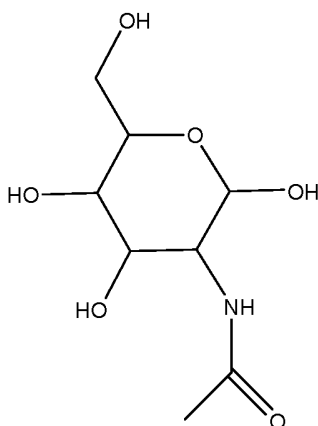
En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores. En una realización preferida, el tumor se selecciona entre cerebral, melanoma, linfoma, adenocarcinoma de pulmón o de útero. entre cerebral o adenocarcinoma de pulmón.

En un quinto aspecto la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) como reactivo en ensayos biológicos.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) que comprende las siguientes etapas:

a. Reacción de un compuesto de fórmula (II)

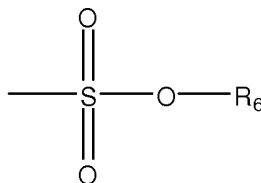


Fórmula (II)

con un cloruro de fórmula Cl-R₅ donde R₅ es un acilo C₁-C₆.

b. Reacción del compuesto obtenido en la etapa anterior con tiourea.

c. Reacción del compuesto obtenido en la etapa anterior con un compuesto de fórmula (III)



Fórmula (III)

donde R₆ es un alquilo C₁₆-C₂₄ o un alquenilo C₈-C₂₄.

ES 2 365 314 A1

En una realización preferida, además se realiza una etapa de oxidación.

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

10 Descripción de las figuras

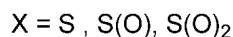
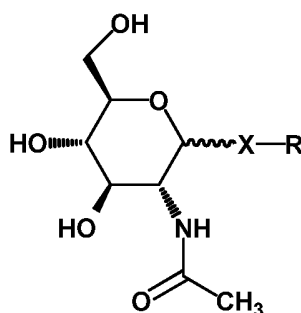
Fig. 1. Cantidad de lactosilceramida (LacCer; barras negras) y gangliósidos GM3 (barras blancas) y GM2 (barras de rayas) presente en extractos de células A549 tratadas con los tioglicósidos 6α y 6β a concentración $15 \mu\text{M}$ durante 48 h, relativa al control (células A549 no tratadas).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos de la presente invención.

Procedimiento general de preparación de los compuestos de fórmula (I)

Se han preparado tioglicósidos, glicosilsulfóxidos y glicosilsulfonas de fórmula general (I) a partir del siguiente monosacárido N-acetil-D-glucosamina:



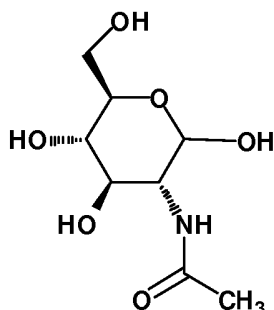
donde el resto R es una cadena hidrocarbonada, con o sin insaturaciones, lineal o ramificada, preferentemente con un resto de oleilo. La configuración del carbono anomérico C-1 en el residuo de glucosamina puede ser alfa (α) o beta (β).

La preparación de los compuestos de fórmula general (I) comienza por la reacción de N-acetil-glucosamina con cloruro de acetilo para dar lugar al cloruro correspondiente. Mediante la reacción de este cloruro con tiourea en acetona a reflujo se obtiene el intermedio clorhidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucosamina isotiouronio. La alquilación de este compuesto con un mesilato de cadena hidrocarbonada, sintetizados previamente por tratamiento del alcohol correspondiente con cloruro de mesilo, da lugar a los tioglicósidos como mezcla de anómeros. Los anómeros se fraccionan por cromatografía en columna de gel de sílice obteniéndose separados el anómero alfa α y el beta β , los cuales son sometidos a una desacetilación para obtener los tioglicósidos objeto de la presente invención. La oxidación de modo controlado de estos tioglicósidos con peróxido de hidrógeno catalizada por tetracloruro de zirconio da lugar a los glicosilsulfóxidos y glicosilsulfonas objeto de esta invención.

ES 2 365 314 A1

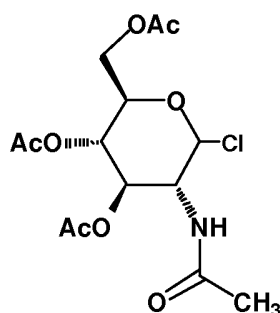
Preparación del clorhidrato de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucosamina isotiuronio (3)

Una mezcla del siguiente compuesto 1:



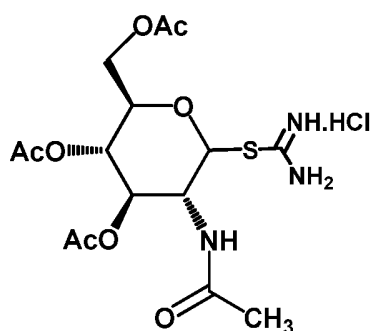
Compuesto 1

(6,25 g, 0,028 mol) y cloruro de acetilo (18,0 ml, 0,253 mol) bajo atmósfera de argón se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Tras diluir con CH_2Cl_2 (40 mL) la fase orgánica se lavó con H_2O fría (20 mL x 2) y con una disolución saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 y el volumen de disolvente se redujo por evaporación a presión reducida a 25 mL. A esta disolución se añadieron 75 mL de Et_2O y se dejó cristalizar a temperatura ambiente durante 12 h, para dar lugar al siguiente compuesto 2 como un sólido blanco (6,8 g, 66%):



Compuesto 2

Una disolución de tiourea (0,44 g, 5,84 mmol) y de este compuesto (2 g, 5,32 mmol) en acetona anhidra (28 mL) se calentó a reflujo (56°C) bajo atmósfera de argón durante 30 min. El compuesto 3:



Compuesto 3

ES 2 365 314 A1

precipitó durante la reacción como un sólido blanco. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con acetona a 0°C y se recrystalizó de acetona-metanol y se obtuvo dicho compuesto 3 como un sólido blanco (1.55 g, 65%).

5 Compuesto 3: (400 MHz, D₂O, COSY): δ 1.99 (s, 3H, NAc), 2.07, 2.09, 2.12 (3 s, 9H, OAc), 4.19 (ddd, 1H, *J* = 10.1, *J* = 3.9, *J* = 1.8 Hz, H-5), 4.27 (dd, 1H, *J* = 12.5, *J* = 1.7 Hz, H-6a), 4.33 (t, 1H, *J* = 10.4 Hz, H-2), 4.39 (dd, 1H, *J* = 12.8, *J* = 4.4 Hz, H-6b), 5.17 (dd, 1H, *J* = 9.9, *J* = 9.7 Hz, H-4), 5.35 (dd, 1H, *J* = 9.9, *J* = 9.7 Hz, H-3), 5.45 (d, 1H, *J* = 10.7 Hz, H-1). ¹³C RMN (100 MHz, D₂O, HSQC): δ 20.1, 20.2, 20.3, 22.0 (NAc), 51.9 (C2), 62.1 (C6), 68.1 (C4), 73.1 (C3), 75.9 (C5), 82.2 (C1), 167.9 (SC(NH₂)₂), 172.8, 173.1, 173.7, 174.8. Análisis calculado para C₁₅H₂₄ClN₃O₃S (%): C, 40.77; H, 5.47; N, 9.51; S, 7.26; Cl, 8.02. Encontrado (%): C, 40.55; H, 5.36; N, 9.43; S, 7.08; Cl, 7.97.

Preparación de (Z)-octadec-9-enil metanosulfonato (4, MsO-oleilo)

15 Se disolvió alcohol oleico (4 ml, 10.8 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (108 ml) y se añadió Et₃N (4.5 ml, x3). A continuación se añadió cloruro de mesilo (2.3ml, x3) y se agitó a temperatura ambiente durante 23 horas. Transcurrido ese tiempo se purificó por cromatografía en gel de sílice (hexano-AcOEt, 3:1) y se obtuvo un líquido amarillo (3.13 g, 83,91%).

20 Compuesto 4: ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 5.3-5.2 (m, 2H, -CH=CH-), 4.19 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz, CH₃SO₂O-CH₂-), 3.0 (s, 3H, CH₃SO₂O-), 2.0-1.9 (m, 4H, -CH₂CH=CHCH₂-), 1.9-1.6 (m, 2H, CH₃SO₂O-CH₂-CH₂-), 1.3-1.1 (m, 22H, CH₃SO₂O-CH₂-CH₂-CH₂-(CH₂)₄-CH₂CH=CHCH₂-(CH₂)₆CH₃), 0.85 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, CH₃SO₂O-(CH₂)₇-CH₂CH=CH(CH₂)₇CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 130.2 (-CH=CH-), 129.9 (-CH=CH-), 70.5 (CH₃SO₂O-CH₂-), 37.5 (CH₃SO₂O-CH₂-), 32.8, 32.1, 30.0, 29.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.3, 29.3, 29.2, 27.4, 27.4, 25.6, 22.9 y 21.2 (-CH₂-), 14.4 (-CH₂-CH₃).

Preparación de oleil 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-1-tio-α-D-glucopiranosido 5α y de oleil 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-1-tio-α-D-glucopiranosido 5β

30 Se disolvió 3 (2,9 g, 6,5 mmol) en DMF anhidra (9 mL) y se añadió Et₃N (2,7 mL). A continuación se añadió 4 (2,3 g, 6,5 mmol) y la mezcla se calentó a 60°C durante 8 h. Se concentró a vacío para eliminar el disolvente y la mezcla se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt 5:1→2:1) para obtener 5α (0,9 g 23%) y 5β (0,6 g, 15%).

40 Producto 5α: [α]_D = +112.4° (C 0.5, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, COSY): δ 5.71 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz, NH), 5.39 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1α), 5.4-5.3 (m, 1H, H-3), 5.1-5.0 (m, 2H, -CH=CH-), 4.5-4.4 (m, 1H, H-5), 4.4-4.3 (m, 2H, H-6a, H-2), 4.2-4.0 (m, 2H, H-4, H-6b), 2.6-2.5 (m, 2H, SCH₂-), 2.1-1.9 (m, 16H, OAc, NHAc, -CH₂CH=CHCH₂-), 1.7-1.4 (m, 2H, -SCH₂CH₂-), 1.4-1.2 (m, 22H, SCH₂CH₂-(CH₂)₅-CH₂CH=CHCH₂-(CH₂)₆CH₃), 0.88 (t, 3H, *J* = 5.7 Hz, -CH₂CH₃). ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 171.6, 170.7, 169.8, 169.3 (CO), 130.0, 129.7 (CH=CH), 84.6 (C1), 71.4, 68.3, 68.1, 62.8, 52.3 (C5, C4, C3, C6, C2), 36.5, 32.5, 31.9, 31.5, 29.7, 28.8, 27.2, 23.2, 22.7, 20.7, 14.6 (NAc, OAc, -CH₂-), 14.1 (-CH₂CH₃). MS (ES) m/z (calcd 613.85): 614.5 (M + 1). Anal. calcd. para C₃₂H₅₅NO₈S (%): C, 62.61; H, 9.03; N, 2.28; S, 5.22. Encontrado: C, 62.48; H, 8.95; N, 2.51; S, 5.36.

45 Producto 5β: [α]_D = -13.1° (C 1.5, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.46 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz, NH), 5.4-5.3 (m, 2H, -CH=CH-), 5.2 5.0 (m, 2H, H-3, H-4), 4.57 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz, H1β), 4.24 (dd, 1H, *J* = 4.9, *J* = 12.3 Hz, H-6a), 4.2-4.0 (m, 2H, H-6b), 4.1-4.0 (m, 1H, H-2), 3.7-3.6 (m, 1H, H-5), 2.7-2.6 (m, 2H, SCH₂-), 2.0-1.9 (m, 16H, OAc, NHAc, -CH₂CH=CHCH₂-), 1.7-1.5 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.4-1.2 (m, 22 H, SCH₂CH₂-(CH₂)₅-CH₂CH=CHCH₂-(CH₂)₆CH₃), 0.88 (t, 3H, *J* = 6.3 Hz, SCH₂-(CH₂)₇-CH=CH(CH₂)₇CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 171.1, 170.7, 170.0, 169.3 (CO), 130.0, 129.8 (-CH=CH-), 84.6 (C1), 76.7 (C5), 75.9 (C3), 73.8 (C4), 68.3 (C6), 62.30 (C2), 53.3 (SCH₂-), 32.6, 31.9, 30.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 28.9, 27.2, 27.1, 23.3, 22.7, 20.8, 20.7, 20.6 (NAc, OAc, -CH₂-), 14.1 (-CH₂CH₃).

55 MS (ES) m/z (calcd 613.85): 614.5 (M + 1).

Preparación de oleil 2-acetamido-2-desoxi-1-tio-α-D-glucopiranosido 6α

60 Se trató 5α con una disolución de MeONa en MeOH 0,1M con agitación durante una hora a temperatura ambiente. La mezcla se neutralizó con Amberlita 120-IR y se concentró. Se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcEt-MeOH) 10:1. Se obtuvo 0,47 g del anómero 6α (73%).

65 [α]_D = +132.0° (C 1.0, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ: 5.45 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz, H-1), 5.4-5.3 (m, 2H, -CH=CH-), 4.00 (dd, 1H, *J* = 5.4, *J* = 11.1 Hz, H-2), 4.0-3.9 (m, 1H, H-5), 3.81 (dd, 1H, *J* = 2.0, *J* = 12.0 Hz, H6a), 3.70 (dd, 1H, *J* = 5.4, *J* = 12.0 Hz, H-6b), 3.60 (t, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-3), 3.3 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz, H-4), 2.6-2.5 (m, 2H, SCH₂-), 2.1-2.0 (m, 4H, -CH₂CH=CHCH₂-), 2.0 (s, 3H, NHAc), 1.6-1.5 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.3-1.2 (m, 22H, SCH₂CH₂-(CH₂)₅-CH₂CH=CHCH₂-(CH₂)₆CH₃), 0.9 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, S(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃) ¹³C RMN

ES 2 365 314 A1

(75 MHz, CD₃OD): δ 173.6 (CO), 130.9 (CH=CH), 130.8 (CH=CH), 85.1 (C-1), 74.2 (C-5), 72.7, 72.6 (C-3, C-4), 62.6 (C-6), 55.9 (C-2), 33.6 (S-CH₂), 33.1, 31.6, 30.9, 30.8, 30.6, 30.6, 30.5, 30.3, 29.9, 28.2, 28.1 (SCH₂(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₆CH₂CH₃), 23.8 (CH₂CH₃), 22.6 (COCH₃), 14.9 ((CH₂)₇CH₃). MS (ES) m/z (calcd 487.5): 488.5 (M+1). Anal. calcd. para C₂₆H₄₉NO₃S (%): C, 64.03; H, 10.13; N, 2.87; S, 6.57. Encontrado: C, 63.99; H, 9.99; N, 3.13; S, 6.54.

Preparación de oleil 2-acetamido-2-desoxi-1-tio- β -D-glucopiranosido 6 β

10 Siguiendo el mismo procedimiento que para la preparación de 6 α , a partir de 5 β se obtuvo 6 β (0,21 g, 54%).

[α]_D = -18.3° (C 1.1, MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H, -CH=CH-), 4.47 (d, 1H, *J* = 10.3 Hz, H-1), 3.86 (dd, 1H, *J* = 2.2, *J* = 12.0 Hz, H-6a), 3.73 (t, 1H, *J* = 10.1 Hz, H-2), 3.67 (dd, 1H, *J* = 5.7, *J* = 12.0 Hz, H-6b), 3.43 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H-3), 3.3-3.2 (m, 2H, H-4, H-5), 2.7-2.6 (m, 2H, SCH₂-), 2.1-2.0 (m, 4H, -CH₂CH=CHCH₂-), 2.00 (s, 3H, NHAc), 1.6-1.5 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.4-1.2 (m, 22H, SCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃), 0.90 (t, 3H, *J* = 6.6 Hz, S(CH₂)₈CH=CH(CH₂)₇CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CD₃OD): δ 173.5 (CO), 130.9 (CH=CH), 130.8 (CH=CH), 85.7 (C-1), 82.1 (C-5), 77.4 (C-3), 71.9 (C-4), 62.9 (C-6), 56.3 (C-2), 33.6, 33.1, 30.9, 30.8, 30.8, 30.6, 30.5, 30.3, 30.2, 30.0, 28.2, 28.1, (SCH₂(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₆CH₂CH₃), 23.8 (CH₂CH₃), 23.0 (COCH₃), 14.5 ((CH₂)₇CH₃). MS (ES) m/z (calcd 487.3341): 488.3415 (M+1).

Preparación de oleil 2-acetamido-2-desoxi-1-sulfinil- α -D-glucopiranosido 7 α

25 Se disolvió 6 α (150 mg, 0,31 mmol) en metanol (3 mL) y se trató con peróxido de hidrógeno al 33% (2,2 mmol, x7) y ZrCl₄ (17,0 mg, 0,77 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH 5:1) para dar 7 α como un sólido blanco (30,9 mg, 20%).

[α]_D = +112.7° (C 1.5, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 5.3 - 5.2 (m, 2H, CH=CH), 4.81 (d, <1H, *J* = 5.4 Hz, H1), 4.77 (d, <1H, *J* = 5.9 Hz, H1), 4.34 (dd, 1H, *J* = 10.8, 5.0 Hz, H2), 4.3.4.2 (m, 1H, H5), 3.95 (dd, 1H, *J* = 10.8, *J* = 8.5 Hz, H3), 3.82 (dd, 1H, *J* = 12.2, *J* = 2.1 Hz, H6a), 3.61 (dd, 1H, *J* = 12.3, *J* = 6.1 Hz, H6b), 3.38 (dd, 1H, *J* = 9.5, *J* = 8.5 Hz, H4), 3.1-3.0 (m, 1H, SCH₂), 2.9-2.8 (m, 1H, SCH₂), 2.1-2.0 (m, 4H, CH₂CH=CH=CH₂), 1.98 (s, 3H, NHAc), 1.8-1.7 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.5-1.3 (m, 22H, SCH₂CH₂(CH₂)₅CH₂CH=CHCH₂(CH₂)₆CH₃), 0.90 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, -CH₂CH₃).

35 ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 174.1 (CO), 131.0 (CH=CH), 130.9 (CH=CH), 91.7, 80.7, 73.0, 72.0, 62.8, 54.8, 50.6 (C1, C2, C3, C4, C5, C6, SCH₂-), 49.7, 49.5, 49.3, 49.1, 48.9, 48.7, 48.5, 33.2, 31.0, 30.7, 30.6, 30.5, 30.4, 29.9, 28.3, 23.9, 23.0, 22.8 (SCH₂(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃, COCH₃), 14.6 (-CH₂CH₃). MS (ES) m/z (calcd 503.74): 504.74 (M+1), 526.32 (M+Na). Anal. calcd. para C₂₆H₄₉NO₆S (%): C, 61.99; H, 9.80; N, 2.78; S, 6.37. Encontrado: C, 59.83; H, 9.65; N, 2.77; S, 6.12.

Preparación de oleil 2-acetamido-2-desoxi-1-sulfinil- β -D-glucopiranosido 7 β

45 Siguiendo el mismo procedimiento que para la preparación de 7 α , a partir de 6 β se obtuvo 7 β (30 mg, 19%). [α]_D = -7.2° (C 1.5, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 5.4 - 5.3 (m, 2H, CH=CH), 4.43 (d, <1H, *J* = 10.8 Hz, H1), 4.27 (d, <1H, *J* = 10.5 Hz, H1), 3.98 (t, 1H, *J* = 10.3 Hz, H2), 3.90 (dd, 1H, *J* = 12.4, *J* = 1.4 Hz, H6a), 3.8 - 3.7 (m, 1H, H6b), 3.7-3.6 (m, 2H, H3, H5), 3.5-3.4 (m, 1H, H4), 3.3 - 3.1 (m, 1H, SOCH₂-), 2.8 - 2.7 (m, 1H, SOCH₂-), 2.1 - 1.9 (m, 7H, -CH₂CH=CHCH₂-, NHAc), 1.7 - 1.6 (m, 2H, SCH₂CH₂-), 1.5-1.2 (m, 22 H), 0.90 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz, -CH₂CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 130.9 (CH=CH), 130.8 (CH=CH), 88.8, 82.6, 78.0, 76.2, 70.8, 62.2, 52.4 (C1, C2, C3, C4, C5, C6, SCH₂-), 37.0, 33.6, 33.1, 30.8, 30.8, 30.6, 30.5, 30.4, 30.3, 30.3, 30.3, 29.9, 28.1, 24.0, 23.8, 22.9 (SCH₂(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃, COCH₃), 14.5 (-CH₂CH₃).

MS (ES) m/z (calcd 503.74): 526.32 (M+Na).

Preparación de oleil 2-acetamido-2-desoxi-1-sulfonyl- α -D-glucopiranosido 8 α

60 Se disolvió 6 α (100 mg, 0.20 mmol) en metanol (1 mL) y se trató con peróxido de hidrógeno al 33% (2.05 mmol, x10) y ZrCl₄ (11.3 mg, 0.51 mmol, x2.5) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH 10:1) para dar 8 α como un sólido blanco (30.9 mg, 29%).

[α]_D = +74.4° (C 3, MeOH). ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 5.3-5.2 (m, 2H, CH₂CH=CH-CH₂-), 5.2-5.1 (m, 1H, H-1), 4.2-4.1 (m, 2H, H-2, H-5), 4.1-4.0 (m, 1H, H-6a), 3.9-3.6 (m, 2H, H-6b, H4), 3.3-3.0 (m, 1H, H-3), 3.2-3.1 (m, 2H, -SO₂-CH₂-), 2.0-1.8 (m, 7H, CH₂CH=CH-CH₂-, CH₃CONH-), 1.7-1.6 (m, 2H, -SO₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.2-1.0 (m, 20H, -CH₂-), 0.88 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, -CH₂-CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 173.5 (CO), 130.3 (CH=CH), 129.7 (CH=CH), 86.3, 77.6, 70.6, 69.9, 61.6, 52.6, 51.2 (C1, C2, C3, C4, C5, C6, SCH₂-), 32.4, 31.9, 29.6, 29.6, 29.4,

ES 2 365 314 A1

29.3, 29.2, 29.1, 29.1, 29.0, 28.9, 28.4, 26.9, 26.9, 22.5, 21.3, 21.2 (SCH₂(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃, COCH₃), 13.3 (-CH₂CH₃). MS (ES) m/z (calcd 519.73): 520.33 (M +1). Anal. calcd. para C₂₆H₄₉NO₇S (%): C, 60.08; H, 9.50; N, 2.69; S, 6.17. Encontrado: C, 59.87; H, 9.44; N, 2.91; S, 6.40.

5

Actividad *In Vitro* de los Compuestos

La inhibición de la división celular por los compuestos sintetizados se comprobó *in vitro* analizando la actividad mitocondrial mediante ensayo MTT en cultivos de células de glioma de rata C6 y adenocarcinoma de pulmón humano A549. Como ejemplo concreto, los valores de IC₅₀ (concentración de inhibidor que produce el 50% de inhibición) encontrados para los compuestos 6 α , 6 β y 8 α en cuatro experimentos independientes a diferentes concentraciones del compuesto (cada una de ellas realizada por triplicado) se muestran en la tabla 1:

15

TABLA 1

Inhibición de la división en células C6 y A549 (48 h)

Los valores promedio de IC₅₀ (μ M) fueron:

20

Línea celular	6 α	8 α	6 β
C6	8	12	3
A549	35	41	30

25

30

Para realizar los ensayos MTT se sembraron las células A549 y C6 en placas de 96 pocillos a una concentración de 2,5x10⁵ y 5x10⁴ células/ml respectivamente y se dejaron 24 horas a 37°C con un 5% de CO₂ para que se adhieran a la placa. Se retiró el medio y se adicionaron 100 μ l de medio fresco junto con las distintas concentraciones de compuestos a probar. Se dejaron incubar los productos durante 2 días, a 37°C con un 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se aspiró el medio y se adicionaron 100 μ l de medio fresco con el sustrato bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT, 1 ml de medio y 200 μ l de MTT cuya concentración inicial es de 5 mg/ml en PBS 10x). Se dejó la placa durante 3 horas en el incubador a 37°C con un 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se aspiró el medio y se adicionaron 100 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazan formado, y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm. El equipo utilizado fue Spectramax Plus (Molecular Devices Corporation) para placas de 96 pocillos.

35

40

Efecto sobre la producción de glicosfingolípidos

Los compuestos de la presente invención se han ensayado sobre la línea celular de cáncer de pulmón A549 (American Type Culture Collection), la cual se mantiene en medio de HAM F12 suplementado con glutamina 2 mM, un 10% de suero de feto bovino y antibiótico (penicilina y estreptomycin), a 37°C en atmósfera de 5% CO₂/95% aire.

50

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 2,5x10⁵ células/ml y después de 24 h, el medio se eliminó y se adicionó medio nuevo (1 mililitro por pocillo), conteniendo los productos a una concentración de 15 micromolar. Después de 2 días de incubación, las células se lavaron con PBS y se transfirieron a viales de vidrio, donde se prepararon los extractos lipídicos siguiendo el procedimiento descrito (Merrill *et al* Methods, 2005, 36, 207). Los análisis se llevaron a cabo por cromatografía líquida de ultrarresolución acoplada a un detector de masas de tiempo de vuelo acelerado, que permite la identificación de los compuestos en base a su masa exacta, mediante ionización en electrospray en modo positivo. Las condiciones cromatográficas y analíticas fueron las descritas en Canals *et al* Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 235.

55

La cantidad de lactosilceramida (LacCer) y gangliósidos GM3 y GM2 presente en extractos de células A549 tratadas con los tioglicósidos 6 α y 6 β se muestran en la Fig. 1.

60

Ensayo de resistencia a la hidrólisis enzimática

65

Los compuestos de la presente invención fueron resistentes a la hidrólisis catalizada por enzimas N-acetilhexosaminidasas. Como ejemplo, el tioglicósido 6 β (7.5 mM) en una mezcla 1:5 de metanol y tampón fosfato sódico (20 mM, pH=6) se incubó en presencia de β -N-acetilglucosaminidasa de jack bean (0.6 unidades) a 37°C. Tras 30 min

ES 2 365 314 A1

de incubación, el análisis por HPLC mostró que el tioglicósido 6β permanece inalterado y no se observa productos de hidrólisis o metanolisis. Por el contrario, el correspondiente glicósido de 6β (con un átomo de oxígeno en lugar del átomo de azufre) bajo las mismas condiciones dio lugar al cabo de 30 min a un 7% de productos de hidrólisis y metanolisis.

5 El análisis por HPLC se realizó en fase reversa, utilizando una columna Licrosorb RP18 ($5\ \mu\text{M}$, $4.6 \times 250\ \text{mm}$) y como fase móvil una mezcla de agua-metanol (95-5 (de 0 a 4 minutos)→0-100 (de 8 a 20 minutos)→95-5 (de 25 a 30 minutos)). La velocidad de flujo fue $1.0\ \text{mL}/\text{min}$ y la longitud de onda de detección de los productos de hidrólisis (tiempo de retención: 2.9 minutos) y metanolisis (tiempo de retención: 4.1 minutos) fue $205\ \text{nm}$.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)

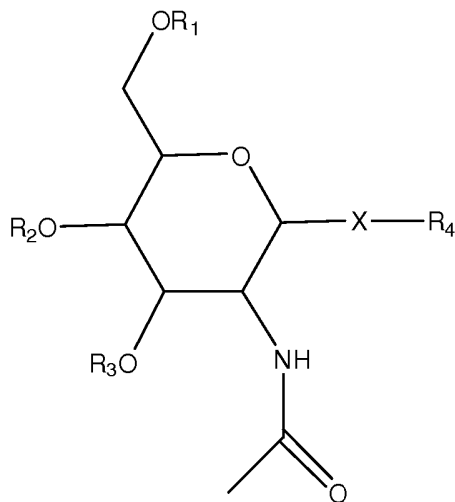
5

10

15

20

25



30

Fórmula (I)

donde

35

X se selecciona entre S, S(O) o S(O)₂

R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente entre H o acilo C₁-C₆,

R₄ es un alquilo C₁₆-C₂₄ o un alquenilo C₈-C₂₄,

40

o cualquiera de sus isómeros, sales o solvatos.

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde R₁ a R₃ son H.

45

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde X es S.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde X es S(O).

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde X es S(O)₂.

50

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde R₄ es un alquenilo C₁₆-C₂₀.

7. Compuesto según la reivindicación donde R₄ es un grupo octadec-9-enilo.

55

8. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Composición según la reivindicación 8 que comprende otro principio activo.

60

10. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento.

11. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores.

65

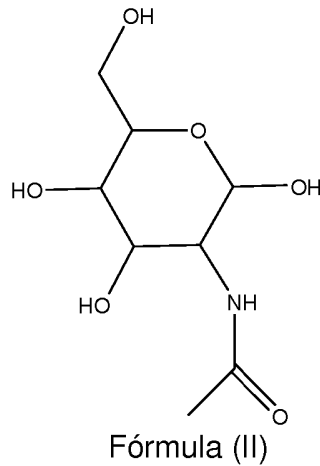
12. Uso según la reivindicación 9 donde el tumor se selecciona entre cerebral, melanoma, linfoma, adenocarcinoma de pulmón o de útero. entre cerebral o adenocarcinoma de pulmón.

13. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como reactivo en ensayos biológicos.

ES 2 365 314 A1

14. Procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las siguientes etapas:

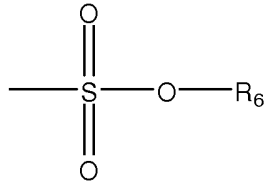
a. Reacción de un compuesto de fórmula (II)



con un cloruro de fórmula Cl-R_5 donde R_5 es un acilo $\text{C}_1\text{-C}_6$.

b. Reacción del compuesto obtenido en la etapa anterior con tiourea.

c. Reacción del compuesto obtenido en la etapa anterior con un compuesto de fórmula (III)



45 donde R_6 es un alquilo $\text{C}_{16}\text{-C}_{24}$ o un alquenilo $\text{C}_8\text{-C}_{24}$.

15. Procedimiento según la reivindicación 14 donde además se realiza una etapa de oxidación.

50

55

60

65

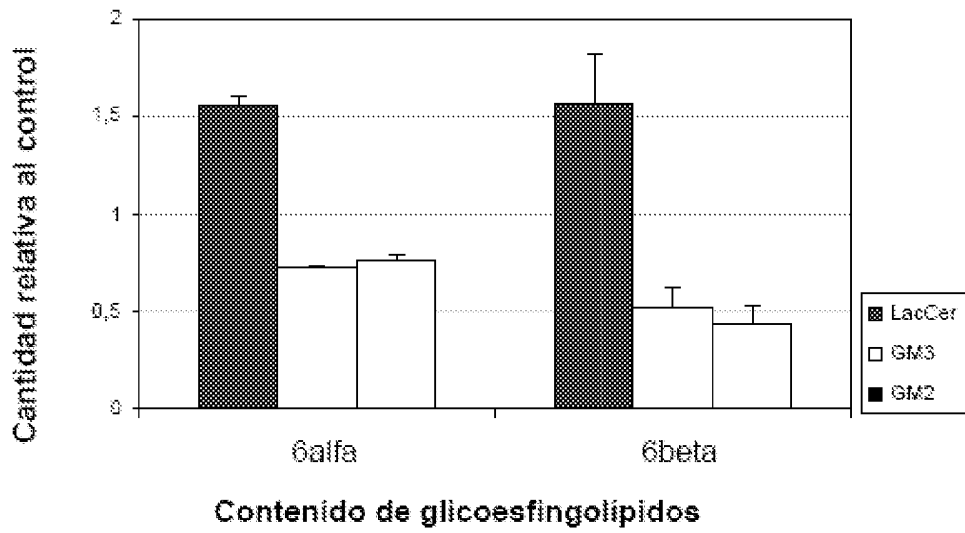


FIG. 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201030366

22 Fecha de presentación de la solicitud: 12.03.2010

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MIETHCHEN, R. et al.: "Amphiphilic and mesogenic carbohydrates. Part 10. Change of the type of the mesophase by variation of the acyl chain of amphiphilic tetradecyl (N-acylamino)-2-deoxy-1-thio-beta-D-glucopyranosides. Journal fuer praktische chemie/chemiker-zeitung, 1998, vol. 340, nº 6, páginas 544-550, página 545, figuras 4a y 5a.	1-3,14,15
A	EP 0411980 A1 (BEGHIN-SAY SOCIETE ANONYME) 06.02.1991, tablas 1 y 2.	1-15
A	EP 0100104 B1 (DAIICHI SEIYAKU CO. LTD) 08.02.1984, página 2, líneas 33-65.	1-15
A	WO 2008007825 A1 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 17.01.2008, reivindicaciones.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.07.2011

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H5/10 (2006.01)

A61K31/7008 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

C07H, A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.07.2011

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 4-13
Reivindicaciones 1-3,14,15

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 4-13
Reivindicaciones 1-3,14,15

SI
NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MIETHCHEN, R. et al.: "Amphiphilic and mesogenic carbohydrates. Part 10. Change of the type of the mesophase by variation of the acyl chain of amphiphilic tetradecyl (N-acylamino)-2-deoxy-1-thio-beta-D-glucopyranosides. Journal fuer praktische chemie/chemiker-zeitung, 1998, vol. 340, nº 6, páginas 544-550, página 545, figuras 4a y 5a.	
D02	EP 0411980 A1 (BEGHIN-SAY SOCIETE ANONYME)	06.02.1991
D03	EP 0100104 B1 (DAIICHI SEIYAKU CO. LTD)	08.02.1984
D04	WO 2008007825 A1 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)	17.01.2008

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

La presente solicitud se refiere a tioglicósidos, glicosilsulfóxidos y glicosilsulfonas derivados de N-acetilhexosaminas, a su procedimiento de obtención y su uso como inhibidores de la división de células tumorales. El tumor se selecciona entre cerebral, melanoma, linfoma, adenocarcinoma de pulmón o de útero.

El documento D1 se refiere a la síntesis de un compuesto que es el tetradecil 2 (N-alcanoil amino- 2 deoxy 1 tio beta- D glucopiranosido (ver compuestos 4a y 5a de la página 545). Estos compuestos entran dentro del ámbito de la fórmula I de la presente solicitud. Por lo tanto los compuestos en que en la fórmula I de la presente solicitud los radicales R1, R2 y R3 son hidrógeno o acetil y cuando X es azufre con conocidos en el estado de la técnica. En consecuencia las reivindicaciones 1-3 de la presente solicitud carecen de novedad y de actividad inventiva. En cuanto al procedimiento de obtención correspondiente a las reivindicaciones 14 y 15 aparece descrito en la página 545 de dicho documento D1.

Por lo tanto, a la vista del documento D1 las reivindicaciones 1-3, 14 y 15 carecen de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

El documento D2 describe el procedimiento de obtención de derivados alquil tioglucosidos.

El documento D3 se refiere a derivados del compuesto muramil dipéptido y su uso como agente para las infecciones microbianas y como agentes antitumorales y el documento D4 describe otros agentes antitumorales que son derivados de la glucosamina amino cuaternario (ver reivindicaciones) .

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados ni ninguna combinación relevante de los mismos revela los compuestos correspondientes a las reivindicaciones 4-13 de la presente solicitud, así como tampoco las composiciones farmacéuticas ni su uso farmacéutico.

En consecuencia, las reivindicaciones 4-13 tienen novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.