

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 864**

21 Número de solicitud: 201031552

51 Int. Cl.:

C07H 15/10 (2006.01)

C12P 19/26 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **22.10.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.05.2012

71 Solicitante/s:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)** (Titular al 50%)

SERRANO, 117

28006 MADRID, ES y

FUNDACIÓN HOSPITAL NACIONAL DE

**PARAPLÉJICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA
INTEGRACIÓN (FUHNPAIIN)** (Titular al 50%)

72 Inventor/es:

NIETO SAMPEDRO, Manuel y

ROMERO RAMÍREZ, Lorenzo

74 Agente/Representante:

Pons Ariño, Ángel

54 Título: **INHIBIDORES DE LA DIVISIÓN DE CÉLULAS TUMORALES.**

57 Resumen:

Inhibidores de la división de células tumorales.

La presente invención se refiere a nuevos inhibidores de la división de células tumorales. Dichos inhibidores, son derivados semisintéticos de la neurostatina. Además en la presente invención se describe un nuevo procedimiento de síntesis de los inhibidores y de la neurostatina. Además se describe el uso de estos inhibidores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores cerebrales.

ES 2 380 864 A1

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la división de células tumorales.

La presente invención se refiere a nuevos inhibidores de la división de células tumorales. Dichos inhibidores, son derivados semisintéticos de la neurostatina. Además la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de síntesis de los inhibidores y de la neurostatina. Además se refiere al uso de estos inhibidores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de tumores cerebrales. La invención se encuadra en el sector farmacéutico y es aplicable en el sector médico para el tratamiento de tumores cerebrales.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos y también el más mortal. En Estados Unidos, solo 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 17.000 nuevos casos de tumores cerebrales cada año (además, otros tipos de cáncer pueden metastatizar al cerebro), lo que supone unas 14000 muertes. Los tumores cerebrales son 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 de tamaño y la quimioterapia destruye las células tumorales que quedan después de la cirugía y la radioterapia. La quimioterapia más habitual (BCNU, CCNU) no parece tener un efecto significativo, aunque en algunas ocasiones se ha conseguido aumentar algunos meses la supervivencia. Por tanto, el desarrollo de nuevas moléculas capaces de detener la proliferación de gliomas es de gran interés para el tratamiento de esta enfermedad.

Los gangliósidos, son glicolípidos formados por una cadena de ceramida (que se compone de un residuo del aminoalcohol esfingosina unido a un ácido graso) unida a 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. La Neurostatina se caracteriza por ser un gangliósido de la serie b, GD1b, con una modificación en forma de O-acetilación en uno de los hidroxilos de su siálico terminal (Romero-Ramírez L, Nieto-Sampedro M. *Inhibiting human astrocytoma growth: structure-activity relationships in neurostatin related glycolipids. Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47(21):4983-4.). La posición de esta O-acetilación es preferentemente en el hidroxilo del carbono 9, ya que aunque también han sido descritas O-acetilaciones en los carbonos 7 y 8, en condiciones de pH fisiológico los O-acetilos en esos carbonos migran a la posición 9.

La Neurostatina es un gangliósido natural que se expresa en concentración muy baja en el sistema nervioso central de los mamíferos (Abad-Rodríguez J, Bernabe M, Romero-Ramírez L, Vallejo-Cremades M, Fernandez-Mayoralas A, Nieto-Sampedro M. *Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division of mammalian brain. Journal of Neurochemistry* 2000;74(6):2547-56.). El procedimiento de purificación de la neurostatina a partir de cerebros de mamífero es muy laborioso y el rendimiento obtenido hace inviable su uso, tanto en experimentación animal como en clínica.

Recientemente, se han desarrollado una serie de procedimientos para la obtención de gangliósidos O-acetilados mediante diferentes métodos de O-acetilación del gangliósido comercial GD1b (Valle-Argos B, Gomez-Nicola D, Nieto-Sampedro M. *Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth. European Journal of Medicinal Chemistry*;2010, 45(5):2034-43.). Aunque los procedimientos químicos reducen los pasos para la obtención de gangliósidos O-acetilados, son reacciones inespecíficas donde no se controlan ni el número, ni la posición de las O-acetilaciones. En consecuencia, se obtiene una gran variedad de productos que dificultan su purificación a homogeneidad y reducen considerablemente el rendimiento de la reacción. A pesar de que este procedimiento reduce los pasos necesarios para producir neurostatina, el producto obtenido sigue siendo insuficiente para su posible uso clínico.

Por otro lado el procedimiento descrito en la publicación (Houliston RS, Endtz HP, Yuki N, et al. *Identification of a sialate O-acetyltransferase from Campylobacter jejuni: demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminal alpha-2, 8-linked sialic acid. The Journal of Biological Chemistry* 2006;281(17):11480-6) consigue O-acetilar polisacáridos de glicolípidos derivados del éster del ácido hexanoico 6-(5-Fluoresceín-carboxamido)- (FCHASE) y glicoproteínas, pero no gangliósidos.

El procedimiento descrito en la patente (WO 2007016792) es bastante general. Los rangos de pH que describe son bastante amplios (de 5 a 8), habla de un donador de grupos acetilo y un aceptor de los grupos acetilo, donde se prevé el uso de sustancias tampón y la reacción se lleva a cabo entre 0 y 40 °C, preferentemente entre 20 y 37 °C, en medio acuoso. También describe que la mezcla de reacción puede contener cationes metálicos divalentes (tales como magnesio o manganeso) y también puede contener detergentes solubilizantes o disolventes orgánicos, si fuese necesario. Este procedimiento no detalla ningún protocolo específico para O-acetilar gangliósidos y siguiéndolo no se consigue O-acetilar gangliósidos.

En el procedimiento descrito por Houlston, R. et al. (*Houlston RS, Endtz HP, Yuki N, et al. Identification of a sialate O-acetyltransferase from Campylobacter jejuni: demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminalalpha-2, 8-linked sialic acid. The Journal of Biological Chemistry 2006;281(17):11480-6*) que utiliza una O-acetiltransferasa de la bacteria *Campylobacter jejuni*. Este procedimiento fue utilizado para O-acetilar específicamente los ácidos siálicos terminales de las cadenas de polisacáridos de glicolípidos derivados del éster succidimil del ácido hexanoico 6-(5-Fluorescein-carboxamido) (FCHASE) y también glicoproteínas. El uso de este enzima para O-acetilar oligosacáridos se encuentra patentado (WO 2007016792 20070215).

El procedimiento descrito por estos investigadores no pudo O-acetilar con éxito gangliósidos. Los gangliósidos en solución acuosa se agrupan en micelas que impiden el acceso de la O-acetiltransferasa al siálico terminal.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

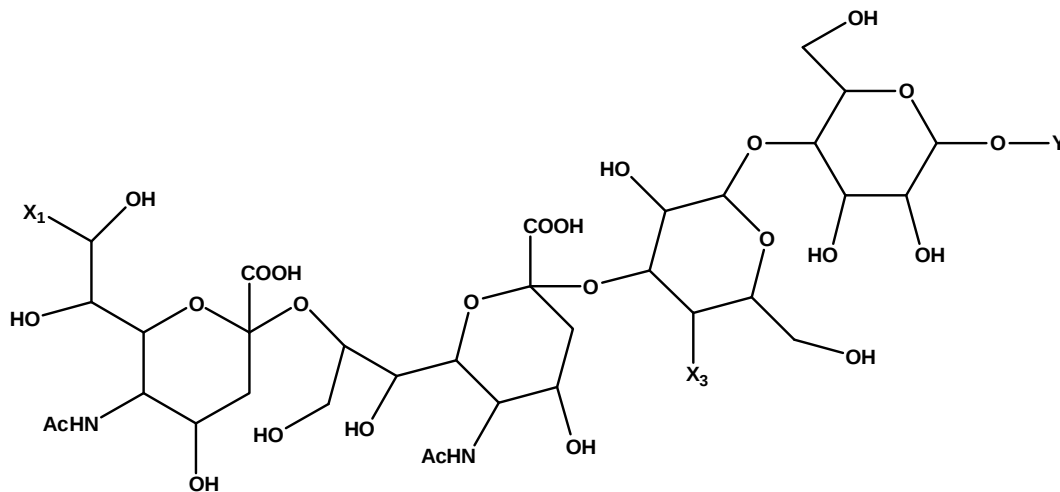
La presente invención describe una nueva serie de gangliósidos con actividad inhibidora (de la familia de la neurostatina) de la división de células tumorales y del crecimiento de gliomas. Además la presente invención describe un novedoso procedimiento de obtención de gangliósidos y de la neurostatina que se caracteriza por su sencillez, especificidad y alto rendimiento.

Utilizando el mismo procedimiento que se describe hemos obtenido nuevos gangliósidos de la familia de la neurostatina O-propionilados, no descritos en la naturaleza y que tienen mayor actividad inhibidora de la proliferación de la línea de glioma C6 (Tabla 1). Estos compuestos podrían ser más resistentes a la hidrólisis por glicosidasas, por lo que su efecto sería más duradero.

Por lo tanto, estos gangliósidos O-propionilados son unos productos muy interesantes para su uso clínico como antitumorales.

Teniendo en cuenta la gravedad de los glioblastomas y la escasa efectividad de los tratamientos disponibles, el desarrollo de nuevas moléculas capaces de detener la proliferación de gliomas es de enorme interés.

Por lo tanto un primer aspecto de la presente invención se refiere a un gangliósido de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

donde;

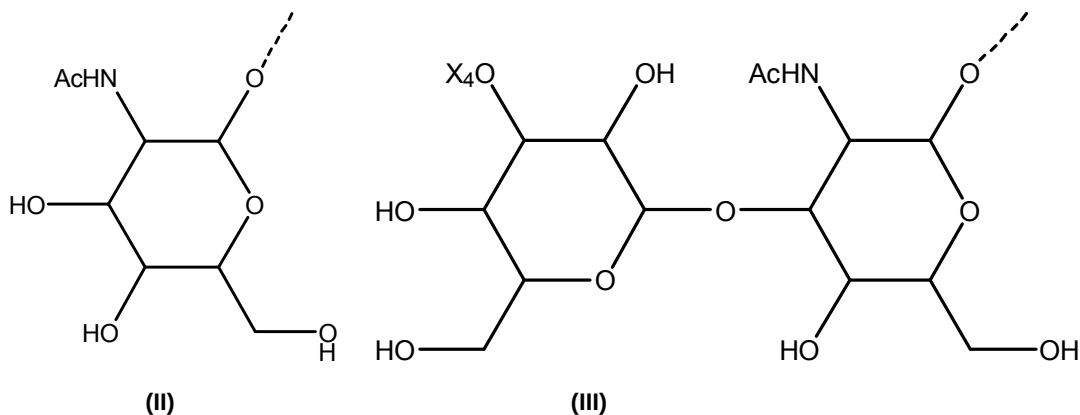
Y es una ceramida;

Ac es un grupo acetilo;

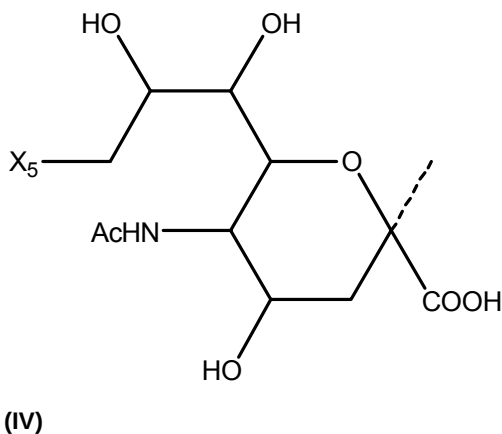
X₁ es un grupo -CH₂-O-CO-X₂

X₂ es un grupo alquilo C₁-C₂;

X₃ se selecciona entre H, OH, un compuesto de fórmula general (II) o un compuesto de fórmula general (III)



X₄ se selecciona entre H y un compuesto de fórmula general (IV):



o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

X₅ se selecciona entre un grupo OH o un grupo -O-COX₆;

X₆ es un grupo alquilo C₁-C₂;

excepto cuando:

- X₁ es -CH₂-O-CO-X₂, X₂ es metilo, X₃ es el compuesto de fórmula general (III) y X₄ es hidrógeno;

- X₁ es -CH₂-O-CO-X₂, X₂ es metilo, y X₃ es el compuesto (II); y

- X₁ es -CH₂-O-CO-X₂, X₂ es metilo, X₃ es el compuesto de fórmula general (III) donde X₄ es el compuesto de fórmula general (IV) donde X₅ es OH.

15 Según una realización preferida, Y es una ceramida que comprende una esfingosina y un ácido graso natural o sintético. De manera preferida la esfingosina comprende de 18 a 20 átomos de carbono y tiene un número de insaturaciones de 0 a 2. De manera preferida el ácido graso comprende de 8 a 24 átomos de carbono y tiene un número de insaturaciones de 0 a 4;

Según otra realización preferida, X₂ es un grupo metilo.

20 Según otra realización preferida, X₂ es un grupo etilo.

Según otra realización preferida, X₃ es H.

Según otra realización preferida, X₃ es OH.

Según otra realización preferida, X₃ es un grupo de fórmula (II).

Según otra realización preferida, X₃ es un compuesto de fórmula general (III).

25 Según otra realización preferida, X₄ es H.

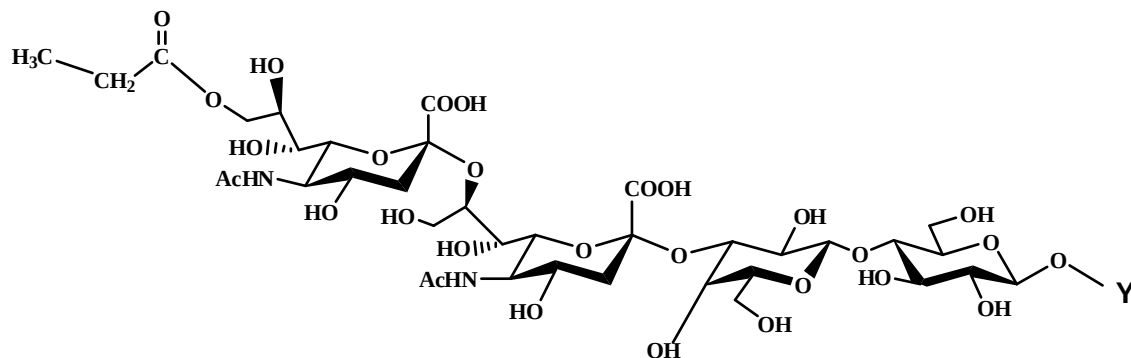
Según otra realización preferida, X_4 es un compuesto de fórmula general (IV).

Según otra realización preferida, X_5 es un grupo OH.

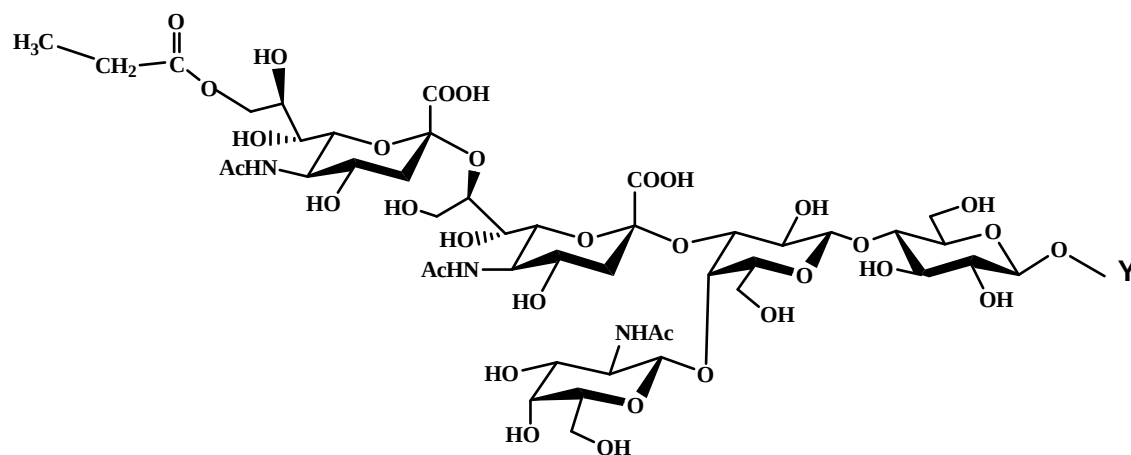
Según otra realización preferida, X_5 es un grupo $-O-CO-X_6$.

Según otra realización preferida, X_6 es un metilo.

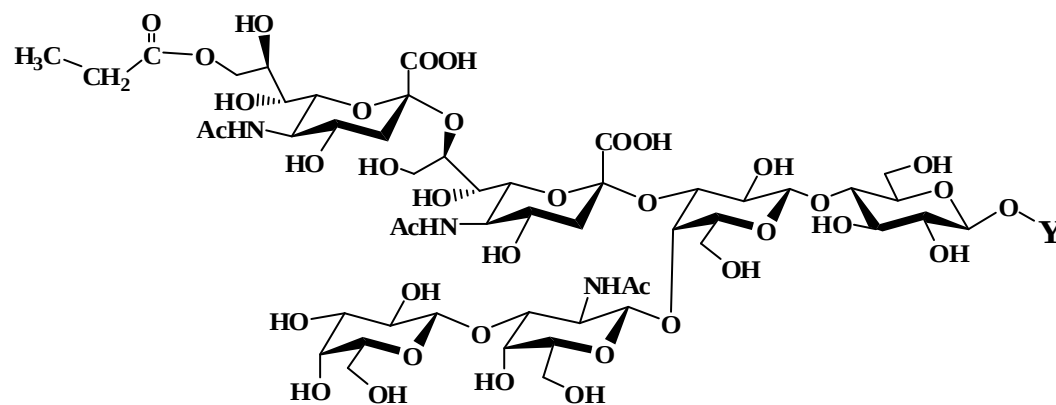
- 5 Según otra realización preferida los compuestos de la presente invención se seleccionan de la siguiente lista:



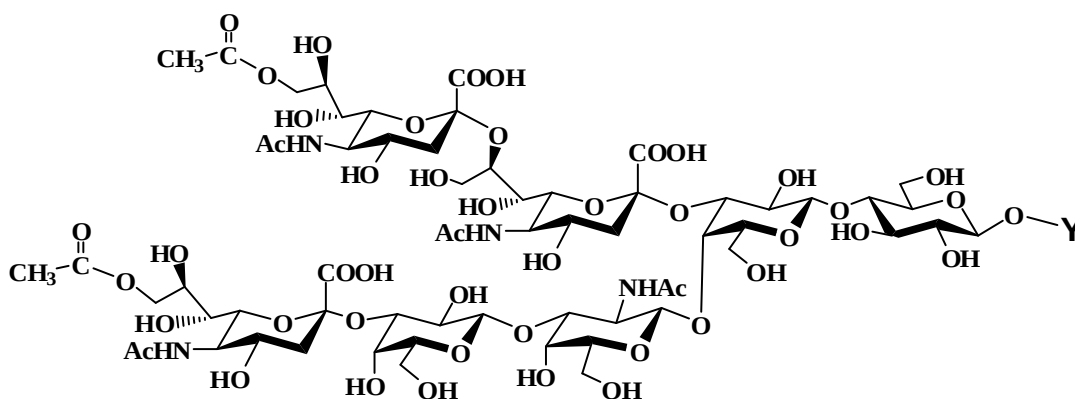
O-propionil-GD3



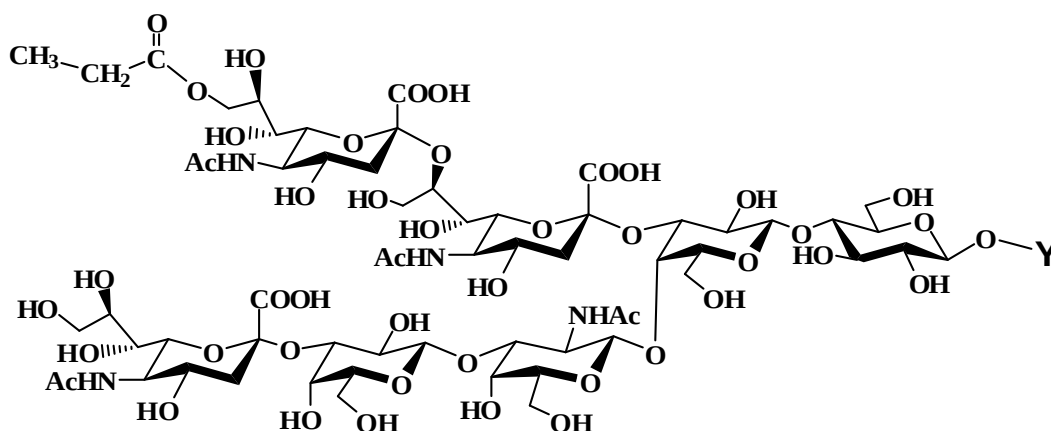
O-propionil-GD2



O-propionil-GD1b



di-O-acetil-GT1b



O-propionil-GT1b

- 5 donde Y es cualquier ceramida, que está compuesta por una esfingosina y un ácido graso. De manera preferida la esfingosina comprende de 18 a 20 átomos de carbono y tiene un número de insaturaciones de 0 a 2. De manera preferida el ácido graso puede contener de 8 a 24 átomos de carbono y con un número de insaturaciones de 0 a 4;

En la presente invención los términos GD1b, GD3, GD2 o GT1b, hacen referencia a gangliosidos del mismo nombre conocidos en el estado de la técnica por cualquier experto en la materia.

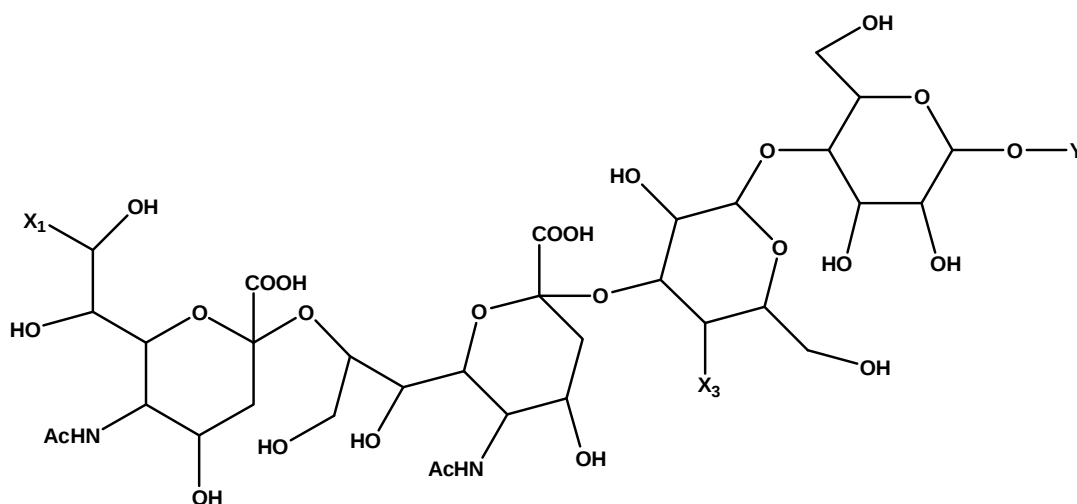
- 10 En este mismo sentido estos gangliósidos comprenden entre otros elementos, una ceramida (Y) que a su vez comprende una esfingosina y un ácido graso. La esfingosina es preferentemente de 18 de átomos de carbono con una insaturación o de 20 átomos de carbono con una insaturación. De manera preferente el ácido graso es de 18 átomos de carbono sin ninguna insaturación o con una insaturación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al compuesto de fórmula general (I) para su uso como medicamento.

- 15 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos al compuesto de fórmula general (I) y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

En una realización preferida, la composición farmacéutica además comprende otro principio activo.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a procedimiento de síntesis de gangliósidos de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

donde;

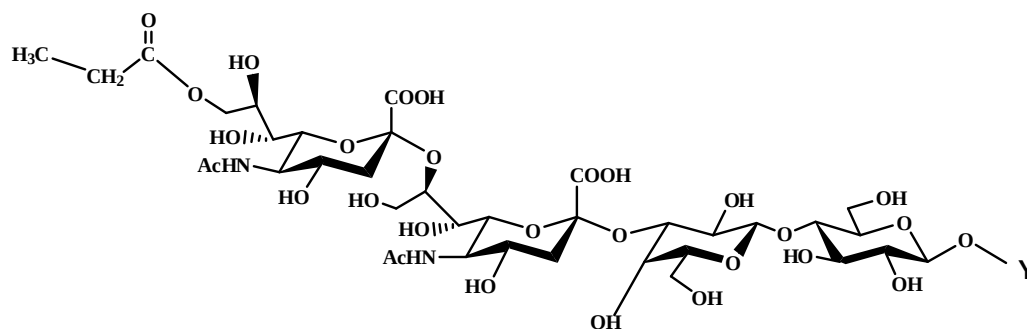
5 Y, Ac, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ se definen como se definieron anteriormente.

que comprende las etapas de:

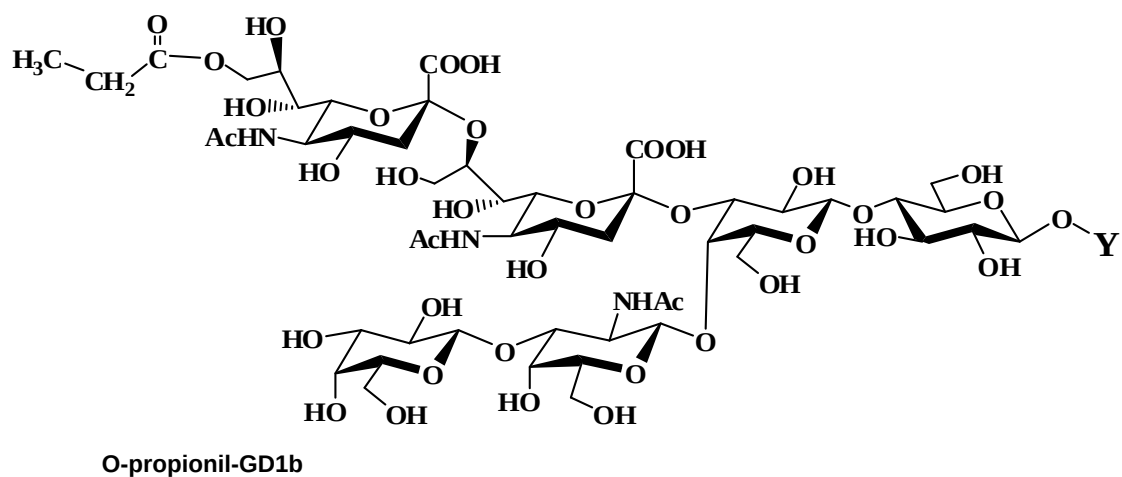
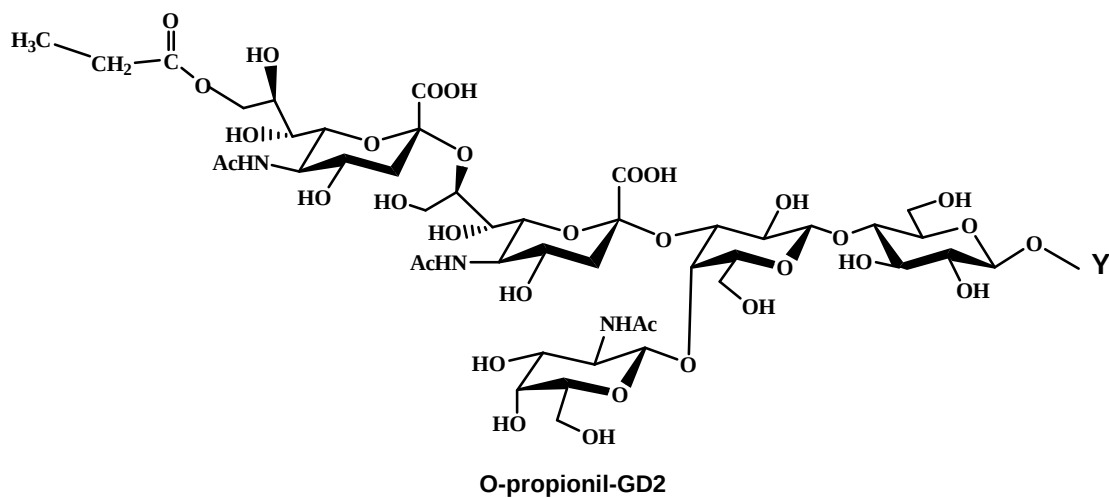
- a) disolver un gangliósido en una solución tampón;
- b) adicionar un emulgente a la mezcla de la etapa a)
- c) adicionar a la mezcla de la etapa b) la enzima o-acetiltransferasa; y

10 d) parar la reacción por adición de metanol a la mezcla obtenida en la etapa c).

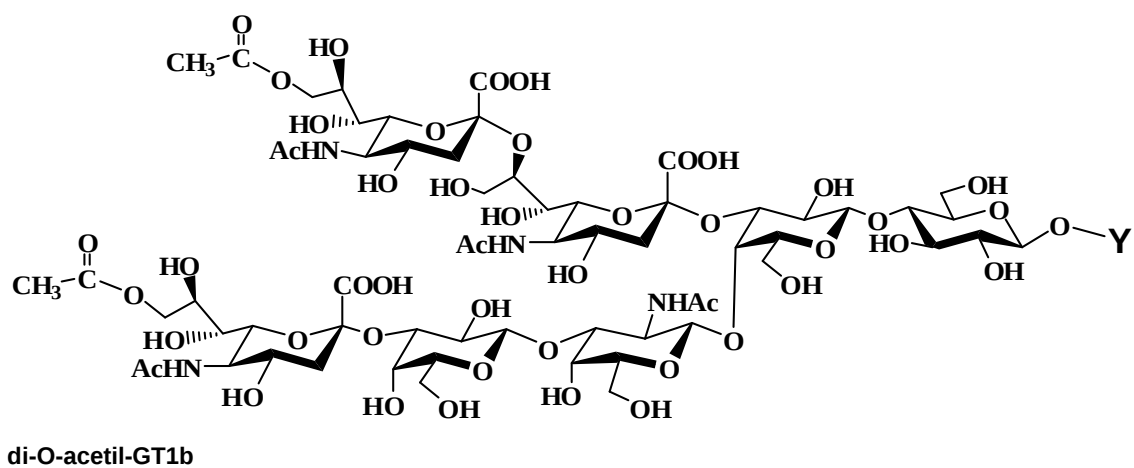
Según una realización preferida, los gangliosidos de fórmula general (I) se seleccionan de la siguiente lista:

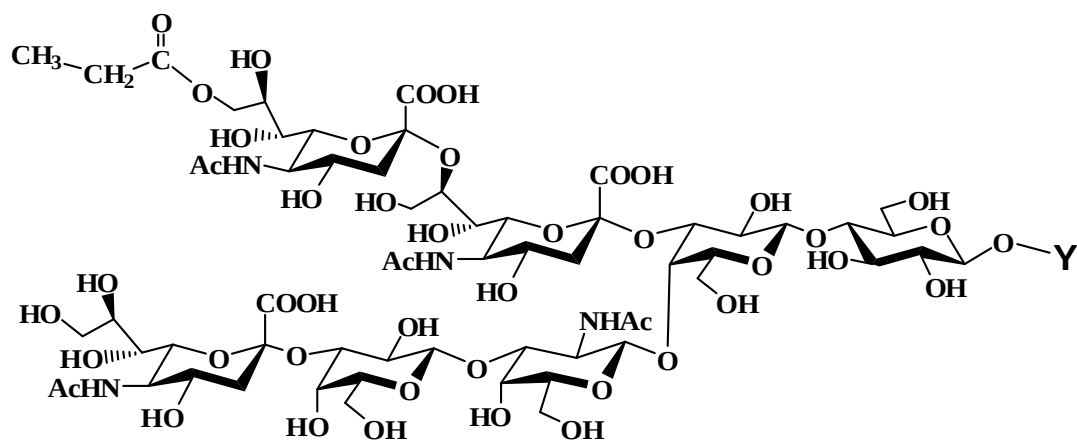


O-propionil-GD3

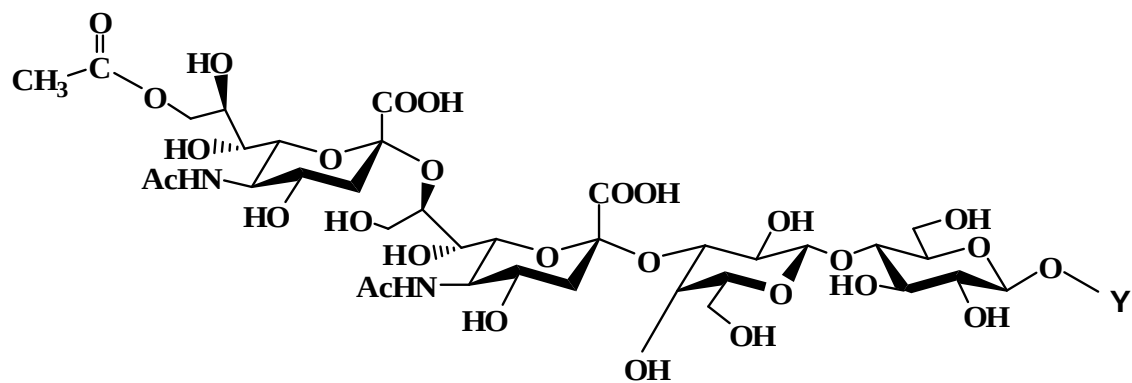


5

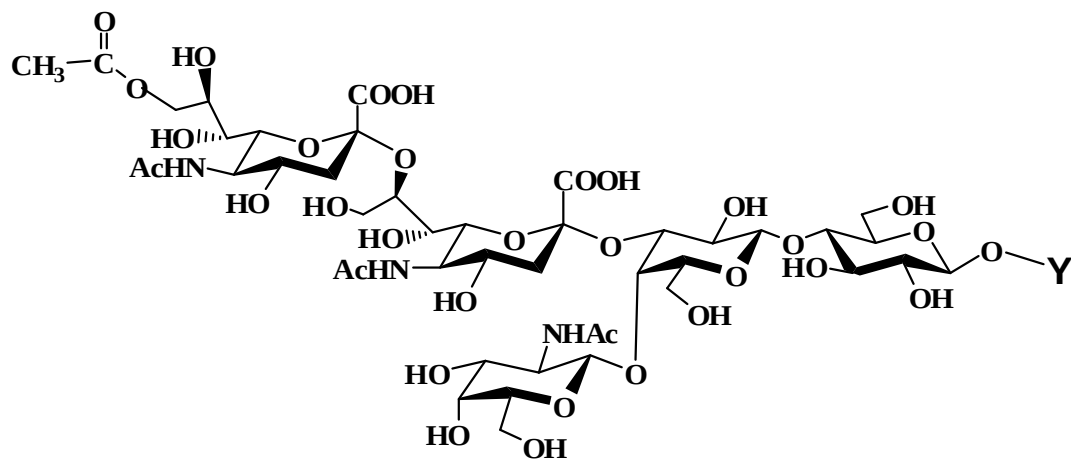




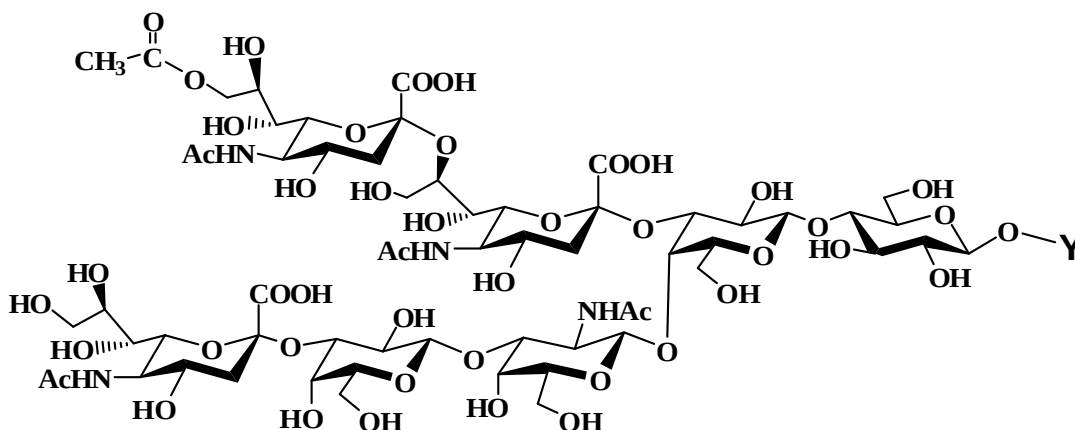
O-propionil-GT1b



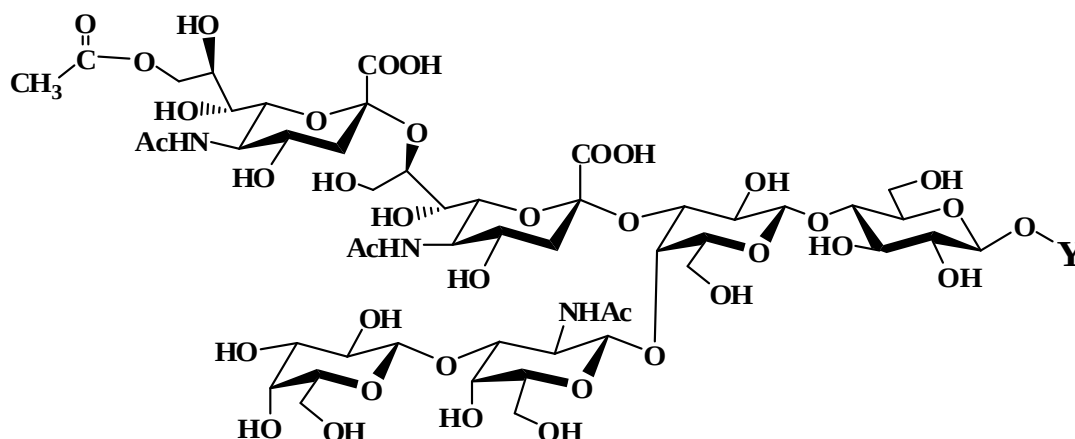
O-acetil-GD3



O-acetil-GD2



O-acetil-GT1b



Neurostatina

- 5 Según una realización preferida, el gangliósido del paso a) se selecciona del grupo formado por GD1b, GD3, GD2 o GT1b.
- Según otra realización preferida, se añade una cantidad de gangliósido del paso a) entre 50 a 600 μM , preferentemente entre 300 y 600 μM , y más preferiblemente de 500 μM .
- 10 Según otra realización preferida, se añade la solución tampón en una concentración desde 1 hasta 250 mM, preferiblemente desde 10 hasta 100 mM, más preferiblemente a una concentración de 50 mM, a un pH desde 6 a 9, preferiblemente a un pH entre 7 y 8, más preferiblemente a un pH de 7.0. De manera preferida la solución tampón es de TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), fosfato, etc, preferiblemente de MES.
- Según otra realización preferida se añade a la solución tampón MgCl_2 (10 mM) y DTT (Ditiotreitol)(1mM),
- 15 Según otra realización preferida se añade a la solución tampón Acetil-Coenzima A o Propionil-Coenzima A a una concentración desde 0,1 a 10 mM, preferiblemente entre 0,5 y 2 mM, más preferiblemente a 1 mM.
- Según otra realización preferida el emulgente es un ácido biliar o sal biliar a una concentración preferible entre 0,05% y 0,2% peso/volumen, más preferiblemente a 0,1% en peso/volumen.
- 20 De manera preferida, el ácido biliar se selecciona del grupo formado por el ácido cólico, ácido desoxicólico, taurocólico, glicocólico, ursodexocólico, litocólico, etc como sus sales sódicas y potásicas, (ejemplo: colato, taurocolato, deoxicolato, ursodeoxicolato, glicocolato, etcetera). De manera preferida el emulgente es la sal biliar colato sódico.
- El emulgente reduce el micelado de los gangliósidos, aumentando la accesibilidad de los siálicos terminales al enzima O-acetiltransferasa.
- En otra realización preferida, en la etapa c), se añade la enzima O-acetiltransferasa a una concentración de entre 2 y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, preferiblemente entre 15 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, más preferiblemente a 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- 25 El procedimiento de la presente invención utiliza como catalizador una O-acetiltransferasa obtenida de la bacteria *Campylobacter jejuni*, cuya clonación, secuenciación y actividad han sido patentadas (WO 2007016792 20070215) y

publicadas por Houlston R. et al (*Houlston RS, Endtz HP, Yuki N, et al. The Journal of Biological Chemistry 2006;281(17):11480-6*).

En otra realización preferida, la reacción de la etapa c) se realizó entre 30-40°C, preferiblemente entre 35-38°C, más preferiblemente a una temperatura de 37°C.

- 5 En otra realización preferida, la reacción de la etapa c) se realizó durante un tiempo de reacción entre 1 hora y 24 horas, preferiblemente entre 5 y 12 horas, más preferiblemente durante 7 horas, y en agitación (600 rpm).

Tras parar la reacción con metanol en la etapa d), se llevaron a cabo las siguientes etapas:

- desalar los productos obtenidos tras la etapa d) utilizando un cartucho de fase reversa Sep-Pak C18 (Waters),
- desecar la muestra en vacío (Speed-Vac).

- 10 - purificar los diferentes productos por TLC preparativa o HPLC preparativa en una columna amino.
- calcular el peso molecular de los productos mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDITOF-MS).
 - caracterización de la posición de las O-acetilaciones u O-propionilaciones mediante secuenciación por espectrometría de masas "electrospray".

- 15 El procedimiento descrito en la presente invención, es un protocolo específico para la O-acetilación de gangliósidos. A diferencia del procedimiento descrito en (*Houlston RS, Endtz HP, Yuki N, et al. Identification of a sialate O-acetyltransferase from Campylobacter jejuni: demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminalalpha-2, 8-linked sialic acid. The Journal of Biological Chemistry 2006;281(17):11480-6*) y en la patente (WO 2007016792), en el procedimiento de la presente invención se añade a la mezcla de reacción un emulgente, que puede ser un ácido biliar o una sal biliar, que en combinación del pH reduce el micelado de los gangliósidos, aumentando la accesibilidad de los
- 20 siálicos terminales al enzima O-acetiltransferasa. El pH de la reacción tiene que ser igual o superior a 6,5 para que el colato sódico sea soluble en el tampón y pueda actuar sobre los gangliósidos.

El procedimiento descrito en la presente invención es específico para los siálicos terminales y no para cualquier grupo hidroxilo O-acetilable, como ocurre en los otros procedimientos del estado de la técnica anterior.

- 25 Por lo tanto, el número de productos de reacción se reduce, favoreciendo la purificación de los productos. Además, el procedimiento tiene un rendimiento muy superior a los descritos anteriormente. En el caso de la reacción para obtener neurostatina (O-acetilGD1b) a partir de GD1b, el rendimiento es del 90%, frente al escaso 10-15% de otros procedimientos descritos en el estado de la técnica anterior. Gracias a este rendimiento, la neurostatina puede considerarse ahora como un producto interesante como antitumoral en pacientes y, por lo tanto, con posible uso
- 30 comercial.

- El procedimiento descrito en la presente invención también permite obtener productos naturales O-acetilados de la familia de la neurostatina, como O-acetil-GD2 y O-acetil-GT1b, que no han sido descritos en la literatura científica como antitumorales; y otros, como el di-O-acetil-GT1b, que no han sido descritos ni en la naturaleza, ni como antitumorales. Además de gangliósidos O-acetilados, el procedimiento descrito en la presente invención, puede ser utilizado para preparar gangliósidos O-propionilados. Estos productos O-propionilados, como O-propionil-GD3, O-propionil-GD2, O-propionil-GD1b y O-propionil-GT1b, nunca han sido descritos en la literatura, ni se encuentran en la naturaleza. Además, estos productos O-propionilados tienen mayor actividad inhibidora de la proliferación de la línea de glioma C6 (Tabla 1) y podrían ser más resistentes a la hidrólisis por glicosidasas, por lo que su efecto sería más duradero.
- 35

- 40 Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere al uso del gangliósido de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos, donde; Y, Ac, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ se definen como se definieron anteriormente para la elaboración de un medicamento.

- Una realización preferida se refiere al uso para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de tumores, preferiblemente para el tratamiento o prevención de astrocitomas, glioblastomas, oligodendrogliomas, neuroblastomas o meningiomas.
- 45

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del gangliósido de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos, donde; Y, Ac, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ se definen como se definieron anteriormente, como reactivo en ensayos biológicos.

- 50 El compuesto descrito en la presente invención, sus sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas, cosméticas y nutricionales que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición

separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende el compuesto anteriormente descrito, o una sal, profármaco o solvato del mismo.

5 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

10 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.

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

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

El término "alquilo" se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 3 átomos de carbono o de 1 a 2 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 2 átomos de carbono o preferiblemente el grupo alquilo es un metilo. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido. alcóxido, tiol, amino, acilamino, ciano, carboxilato, carboxamida, carboxiéster, arilo o heteroarilo o combinaciones de estos grupos. Cuando el grupo alquilo está sustituido, lo está preferentemente por uno o

35 varios grupos amina, amida o éter, que a su vez pueden estar o no sustituidos por grupos alquilo, amida, cicloalquilo o éteres y estos a su vez, pueden estar igualmente sustituidos o no.

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

40

EJEMPLOS

A) Preparación de Neurostatina (O-acetil-GD1b),

45 A una solución del gangliósido GD1b (400 µg) en tampón MES (ácido 2- morfolino etanosulfónico), 50 mM, pH=7.0, se añadió MgCl₂ (10 mM), DTT (1 mM), Acetil-Coenzima A (1 mM) y 0.1% en peso/volumen de colato sódico. Finalmente, se añadió el enzima O-acetiltransferasa a una concentración de 20 µg/ µl, en un volumen de reacción total de 432 µl. La reacción se realizó a 37°C durante 7 horas con agitación (600 rpm). Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo por adición de metanol.

50 La reacción de O-acetilación de GD1b dio lugar a un producto de reacción cuya movilidad en cromatografía en capa fina (TLC) fue diferente a GD1b. Mediante espectrometría de tiempo de vuelo (MALDI TOF-MS) y Electrospray se caracterizó como Neurostatina, por presentar una única O-acetilación en el siálico terminal. El rendimiento de la reacción fue del 90%.

B) Preparación de O-acetil-GT1b y di-O-acetil-GT1b

Siguiendo el mismo procedimiento que para la neurostatina, pero partiendo del gangliósido GT1b se obtuvieron dos

5 productos de reacción cuya movilidad en cromatografía de capa fina (TLC) fue diferente a la de GT1b. Ambos productos fueron caracterizados mediante espectrometría de tiempo de vuelo (MALDITOF-MS) y Electrospray. El compuesto de mayor movilidad en cromatografía en capa fina presentó 2 O-acetilaciones, cada una en uno de los dos siálicos terminales y fue denominado di-O-acetil-GT1b. El segundo producto presentó una sola O-acetilación en el siálico terminal que se encuentra unido a otro siálico y fue denominado O-acetilGT1b. El rendimiento de la reacción fue del 40% para ambos productos de la reacción.

C) Preparación de O-propionil-GD1b

10 El gangliósido GD1b (400 µg) en un tampón 50 mM de MES (ácido 2- morfolino etanosulfónico) pH=7.0, al que se añadió MgCl₂ (10 mM), DTT (1mM), Propionil-Coenzima A (1 mM) y 0.1% en peso/volumen de colato sódico. Finalmente, se añadió la enzima O-acetiltransferasa a una concentración de 20 µg/ µl en un volumen de reacción total de 432 µl. La reacción se realizó a 37°C durante 7 horas con agitación (600 rpm). Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo por adición de metanol.

15 La reacción de O-propionilación de GD1b dio lugar a un producto de reacción cuya movilidad en cromatografía en capa fina fue diferente a la de GD1b. Mediante espectrometría de tiempo de vuelo (MALDITOF-MS) y electrospray se caracterizó como un derivado mono O-propionilado en el siálico terminal que denominamos O-propionil-GD1b. El rendimiento de la reacción fue del 10%.

D) Preparación de O-propionil-GT1b

20 Siguiendo el mismo procedimiento que para el O-propionil-GD1b, pero partiendo del gangliósido GT1b se obtuvo un producto de reacción cuya movilidad en cromatografía de capa fina (TLC) fue diferente a la de GT1b. Dicho producto fue caracterizado mediante espectrometría de tiempo de vuelo (MALDITOF-MS) y Electrospray, como el gangliósido GT1b con una O-propionilación en el siálico terminal que se encuentra unido a otro siálico y fue denominado O-propionil-GT1b. El rendimiento de la reacción fue del 20%.

E) Actividad inhibitoria de los compuestos obtenidos anteriormente

25 La actividad inhibitoria de la división de células tumorales de los gangliósidos y sus derivados O-acetilados y O-propionilados obtenidos fue determinada mediante en ensayo MTT que mide la actividad mitocondrial, en cultivos de la línea tumoral C6 (glioma de rata) durante 48 horas de tratamiento, utilizando 10 ng/ml de FGF básico como mitógeno

	GD1b	Neurost	O-Prop-GD1b	GT1b	O-AcGT1b	di-O-Ac-GT1b	O-Prop-GT1b
C6	-	270	120	550	380	190	150

30 Tabla 1. Inhibición de la división en células C6 (48 h) en valores promedio de ID₅₀ (nM). El símbolo “-” indica que el compuesto inhibió débilmente la proliferación a la concentración máxima ensayada (4 µM), pero no lo suficiente como para calcular el valor de su ID₅₀.

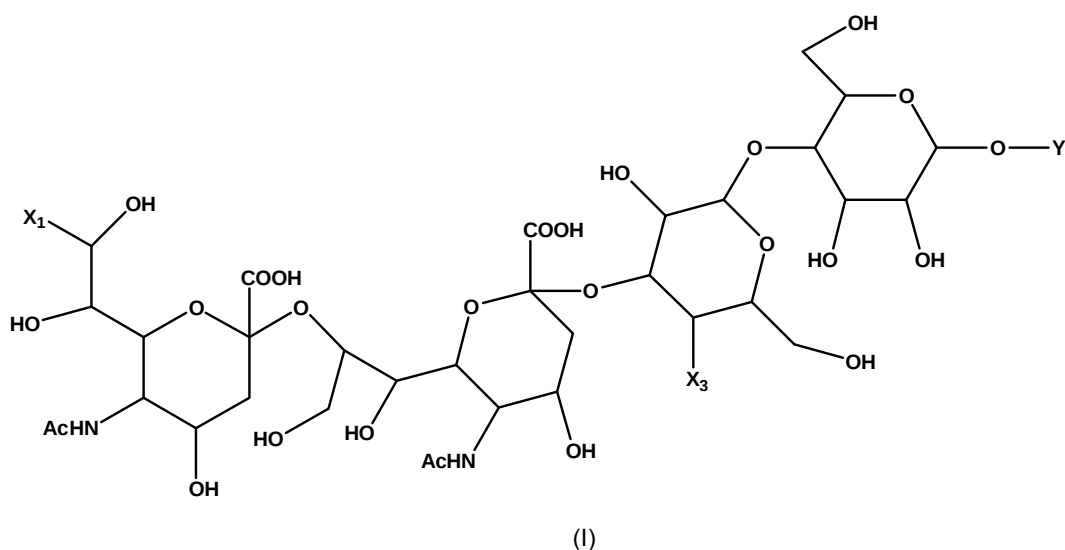
35 En la tabla 1 presentamos la actividad de los gangliósidos GD1b, GT1b, y sus derivados modificados. El gangliósido GD1b no tiene actividad inhibitoria de la proliferación de la línea de glioma C6. Mientras que los compuestos derivados de GD1b, Neurostatina (O-acetil-GD1b), y el O-propionil-GD1b presentan actividad en el rango nanomolar. El gangliósido O-propionil-GD1b es ligeramente más activo que la Neurostatina.

40 El gangliósido GT1b tiene una actividad inhibidora de la proliferación. El compuesto O-acetil-GT1b mejora casi al doble su actividad inhibidora respecto al GT1b. Cuando el gangliósido GT1b se modifica con dos O-acetilaciones (di-O-acetil-GT1b) también mejora su actividad al doble respecto al O-acetil-GT1b y 4 veces respecto al GT1b. La adición de O-acetilos al gangliósido GT1b aumenta progresivamente su actividad inhibidora de la proliferación en las células C6.

Los gangliósidos O-propionilados tienen mayor actividad inhibitoria (O-propionil-GD1b y O-propionil-GT1b) que sus respectivos gangliósidos mono-O-acetilados (O-acetil-GD1b y O-acetil-GT1b). Estos compuestos O-propionilados podrían ser más resistentes a la hidrólisis por glicosidasas, por lo que su efecto sería más duradero.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):



5 o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

donde;

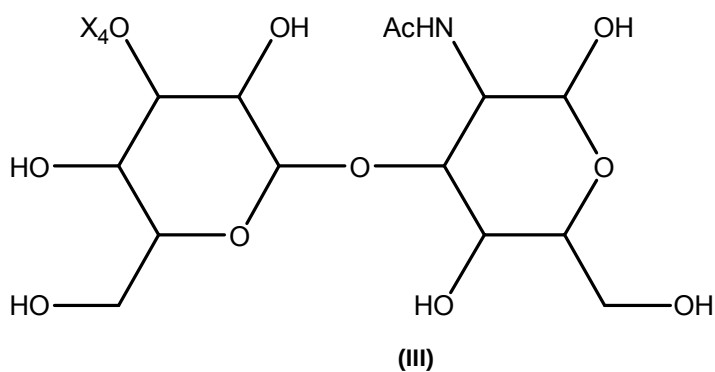
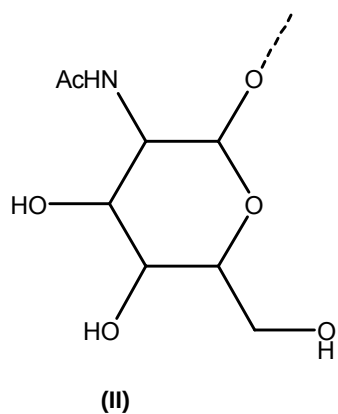
Y es una ceramida,

Ac es un grupo acetilo;

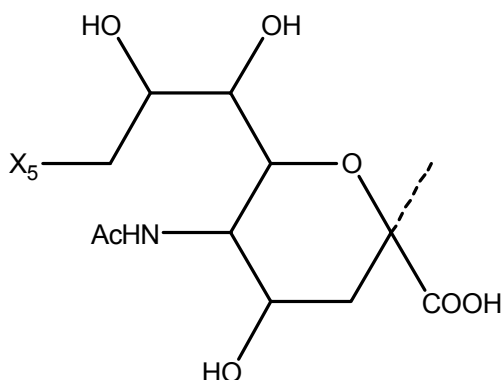
X₁ es un grupo -CH₂-O-CO-X₂;

10 X₂ es un grupo alquilo C₁-C₂;

X₃ se selecciona entre H, OH, un compuesto de fórmula general (II) o un compuesto de fórmula general (III)



donde X₄ se selecciona entre H o un compuesto de fórmula general (IV):



(IV)

donde: X_5 se selecciona entre un grupo OH o un grupo $-O-COX_6$; y

X_6 es un grupo alquilo C_1-C_2 ;

5 excepto cuando:

- X_1 es $-CH_2-O-CO-X_2$, X_2 es metilo, X_3 es el compuesto de fórmula general (III) y X_4 es hidrógeno;

- X_1 es $-CH_2-O-CO-X_2$, X_2 es metilo, y X_3 es el compuesto (II); y

- X_1 es $-CH_2-O-CO-X_2$, X_2 es metilo, X_3 es el compuesto de fórmula general (III) donde X_4 es el compuesto de fórmula general (IV) donde X_5 es OH.

10 2. El compuesto según la reivindicación 1, donde Y es una ceramida que comprende una esfingosina y un ácido graso natural o sintético.

3. El compuesto según la reivindicación 2, donde la esfingosina comprende de 18 a 20 átomos de carbono y de 0 a 2 insaturaciones.

15 4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, donde el ácido graso comprende de 8 a 24 átomos de carbono y con un número de insaturaciones de 0 a 4.

5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde X_2 es un grupo metilo.

6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde X_2 es un grupo etilo.

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde X_3 es H.

8. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde X_3 es OH.

20 9. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde X_3 es un grupo de fórmula (II).

10. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde X_3 es un grupo de fórmula (III).

11. El compuesto según la reivindicación 10, donde X_4 es H.

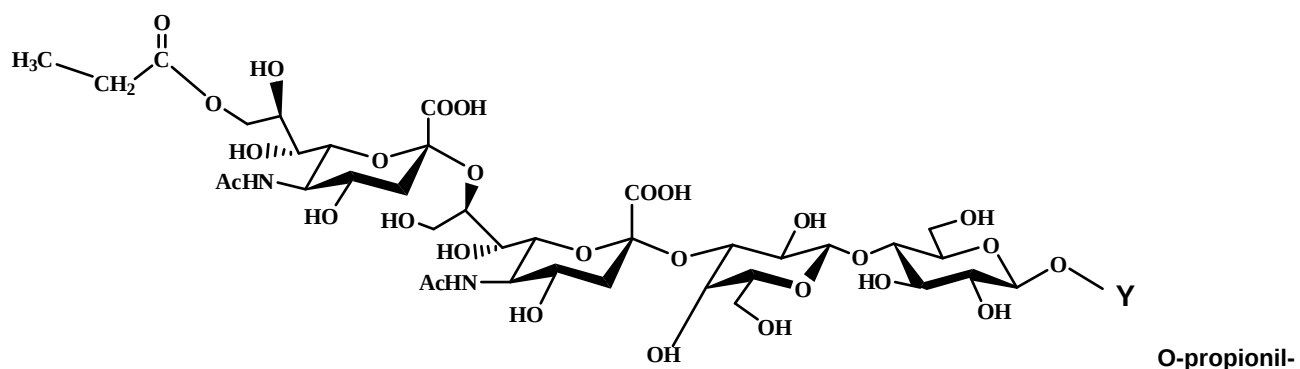
12. El compuesto según la reivindicación 10, donde X_4 es un compuesto de fórmula general (IV).

13. El compuesto según la reivindicación 12, donde X_5 es un grupo OH.

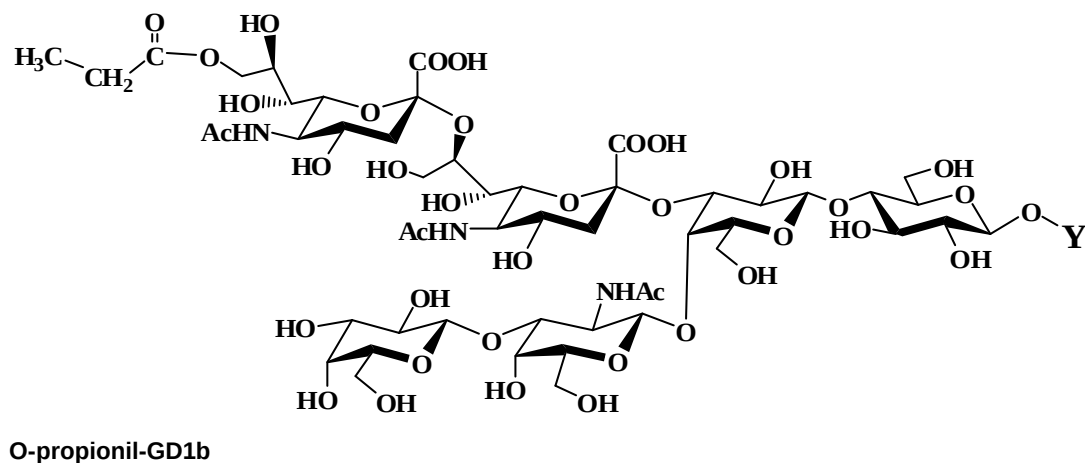
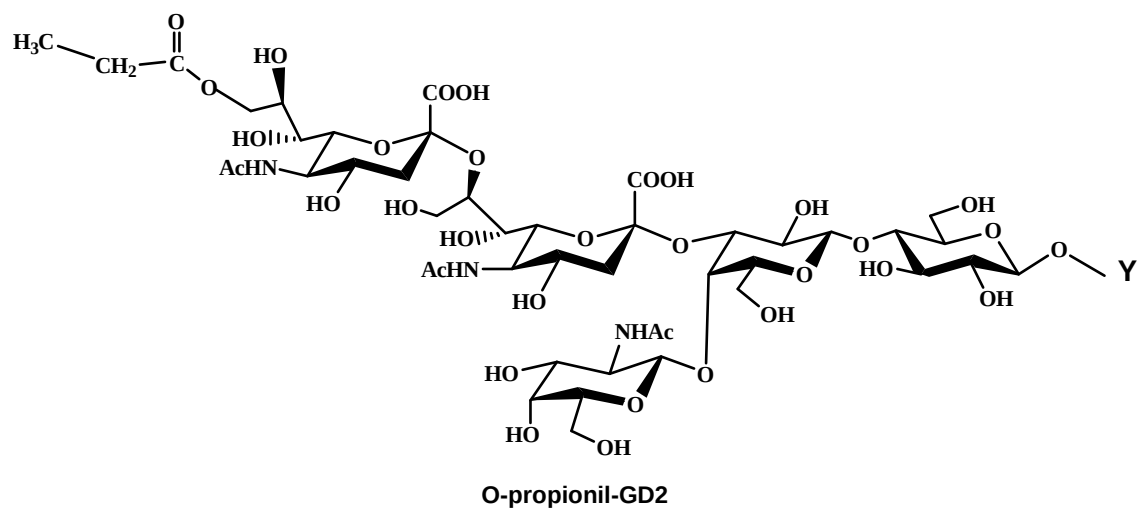
25 14. El compuesto según la reivindicación 12, donde X_5 es un grupo $-O-COX_6$.

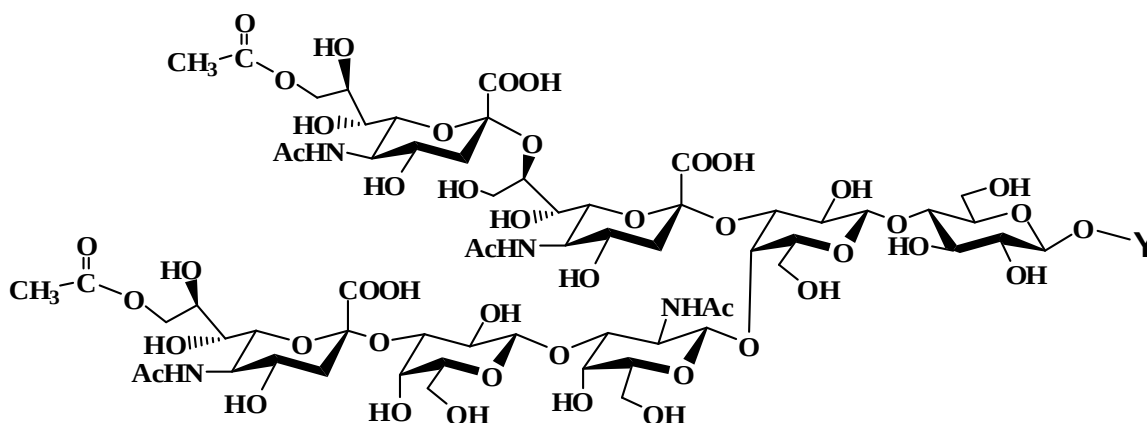
15. El compuesto según la reivindicación 14, donde X_6 es un metilo.

16. El compuesto según la reivindicación 1, que se selecciona de la siguiente lista:

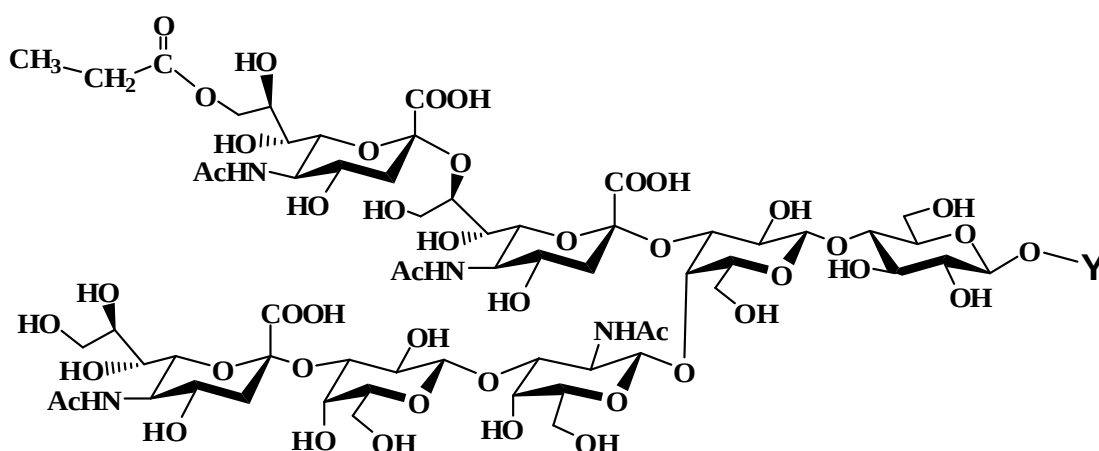


GD3





di-O-acetil-GT1b



O-propionil-GT1b

5

donde Y es una ceramida.

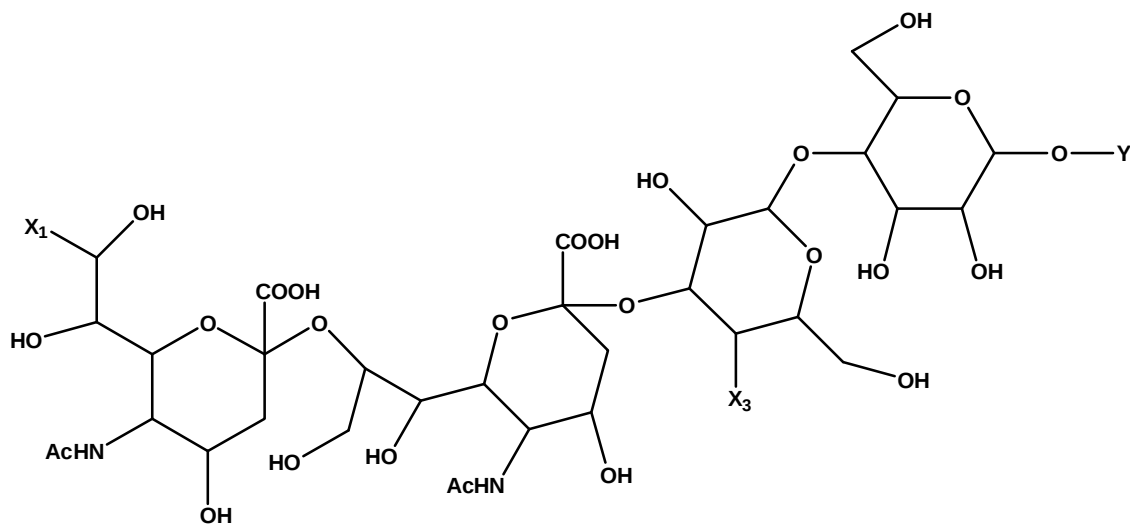
17. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, para su uso como medicamento.

18. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y al menos un transportador farmacéuticamente aceptable, adyuvante y/o vehículo.

19. La composición farmacéutica según la reivindicación 18, donde además comprende otro principio activo.

10

20. Procedimiento de síntesis de un compuesto de fórmula general (I):



(I)

o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

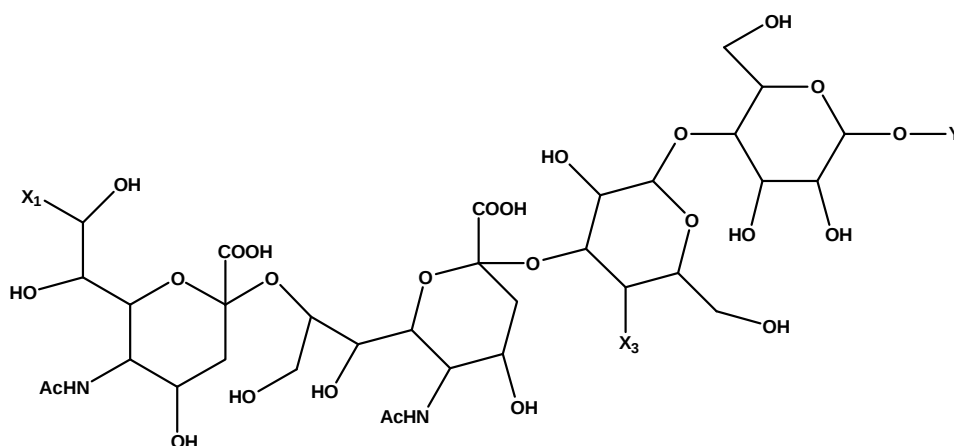
donde;

Y, Ac, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ se definen como en la reivindicación 1,

que comprende las etapas de:

- 5
 - a) disolver un gangliósido en una solución tampón;
 - b) adicionar un emulgente a la mezcla de la etapa a);
 - c) adicionar a la mezcla de la etapa b) la enzima o-acetiltransferasa; y
 - d) parar la reacción por adición de metanol a la mezcla obtenida en la etapa c).
- 10
 21. El procedimiento según la reivindicación 20, donde en la etapa a) el gangliósido se selecciona del grupo formado por GD1b, GD3, GD2 o GT1b.
 22. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21, donde en la etapa a) se añade una cantidad de gangliósido entre 50 a 600 µM.
 23. El procedimiento según la reivindicación 22, donde en la etapa a) se añade una cantidad de gangliósido entre 300 y 600 µM.
- 15
 24. El procedimiento según la reivindicación 23, donde en la etapa a) se añade una cantidad de gangliósido de 500 µM.
 25. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, donde la solución tampón está en una concentración desde 1 hasta 250 mM.
 26. El procedimiento según la reivindicación 25, donde la solución tampón está en una concentración desde 10 hasta 100 mM.
- 20
 27. El procedimiento según la reivindicación 26, donde la solución tampón está en una concentración de 50 mM.
 28. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, donde la solución tampón se selecciona del grupo formado por TRIS, MES, o fosfato.
 29. El procedimiento según la reivindicación 28, donde la solución tampón es MES.
- 25
 30. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, donde la solución tampón tiene un pH desde 6 a 9.
 31. El procedimiento según la reivindicación 30, donde el pH de la solución tampón está entre 7 y 8.
 32. El procedimiento según la reivindicación 31, donde el pH de la solución tampón es de 7.0.
 33. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, donde se añade a la solución tampón MgCl₂ 10 mM y DTT 1mM, Acetil-Coenzima A o Propionil-Coenzima A a una concentración entre 0.1 a 10 mM.
- 30
 34. El procedimiento según la reivindicación 33, donde la Acetil-Coenzima A o la Propionil-Coenzima A están a una concentración entre 0.5 y 2 mM.
 35. El procedimiento según la reivindicación 34, donde la Acetil-Coenzima A o la Propionil-Coenzima A están a una concentración de 1 mM.
- 35
 36. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 35, donde el emulgente es un ácido biliar o sal biliar a una concentración entre 0.05% y 0.2% peso/volumen.
 37. El procedimiento según la reivindicación 36, donde el emulgente tiene una concentración del 0.1% en peso/volumen.
 38. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 36 ó 37, donde el ácido biliar se selecciona del grupo formado por el ácido cólico, ácido desoxicólico, taurocólico, glicocólico, ursodexosicólico, litocólico, o sus sales sódicas y potásicas, dentro del grupo formado por colatos, taurocolatos, deoxicolatos, ursodeoxicolatos o glicocolatos.
- 40
 39. El procedimiento según la reivindicación 38, donde el emulgente es la sal biliar colato sódico.

40. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 39, donde en la etapa c), se añade la enzima O-acetiltransferasa a una concentración de entre 2 y 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
41. El procedimiento según la reivindicación 40, donde la enzima se añade a una concentración entre 15 y 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
42. El procedimiento según la reivindicación 41, donde la enzima se añade a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- 5 43. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 42, donde la reacción de la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura entre 30-40°C.
44. El procedimiento según la reivindicación 43, donde la reacción de la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura entre 35-38°C.
- 10 45. El procedimiento según la reivindicación 44, donde la reacción de la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de 37°C.
46. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 45, donde adicionalmente tras la etapa d) se llevan a cabo las siguientes etapas:
- desalar los productos obtenidos tras la etapa d) utilizando un cartucho de fase reversa Sep-Pak C18,
 - desecar la muestra en vacío;
 - 15 - purificar los diferentes productos por TLC preparativa o HPLC preparativa en una columna amino;
 - calcular el peso molecular de los productos mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo;
 - caracterización de la posición de las O-acetilaciones u O-propionilaciones mediante secuenciación por espectrometría de masas "electrospray".
- 20 47. Uso de un compuesto de fórmula general (I) o de una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, para la elaboración de un medicamento.

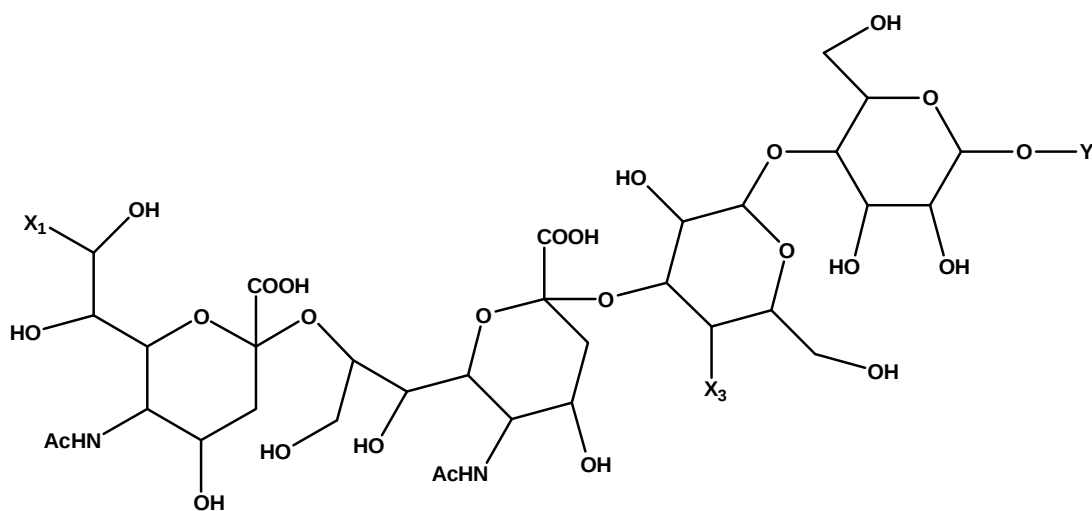


(I)

o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

donde;

- 25 Y, Ac, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ se define como en la reivindicación 1.
48. Uso del compuesto o de la composición según la reivindicación 47, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de tumores.
49. Uso del compuesto o de la composición según la reivindicación 48, donde el tumor se selecciona de la lista que comprende: astrocitoma, glioblastoma, oligodendroglioma, neuroblastoma o meningioma.
- 30 50. Uso del compuesto de fórmula general (I),



(I)

o cualquiera de sus sales, isómeros o solvatos,

donde;

- 5 Y, Ac, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 se definen como en la reivindicación 1, como reactivo en ensayos biológicos.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031552

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.10.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5766887 A (SCRIPPS RESEARCH INST.) 16.06.1998, todo el documento, en especial figuras 2A y 4; columna 3, líneas 31-36.	1-5,8
X	US 5102663 A (SOLAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 07.04.1992, todo el documento, en especial reivindicaciones 1, 2, 6; columna 2, líneas 25-32.	1-5,8,17-19,47,48
X	FR 2662697 A (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO. LTD.) 06.12.1991, reivindicaciones 1-3.	1-5,8
X	IGARASHI, M. y col. Characteristics of gangliosides including O-acetylated species in growth cone membranes at several developmental stages in rat forebrain. Developmental Brain Research. 1994, Vol. 78, Nº 1, páginas 17-24.	1-5,8
X	ROMERO-RAMIREZ, L. y NIETO-SAMPEDRO, M. Inhibiting Human Astrocytoma Growth: Structure-Activity Relationships in Neurostatin Related Glycolipids. J. Med. Chem., 2004, Vol. 47, Nº 21, páginas 4983-4984. Compuesto 6, tabla 2; compuesto 8, Tabla 1.	1-5,8,47-49
X	ABAD-RODRIGUEZ, J. y col. Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division of mammalian brain. Journal of Neurochemistry. 2000, Vol. 74, Nº 6, páginas 2547-2556, ISSN 0022-3042. Todo el documento, en especial página 2551, párrafo "Inhibition of glial cell proliferation". Página 2553, párrafo "Neurostatin biological activity".	47-49
X	Página 2553, párrafo "Neurostatin biological activity", O-acetil-GD3.	1-5,8
X	VALLE-ARGOS. B y col. Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth. European Journal of Medicinal Chemistry. Mayo 2010, Vol. 45, Nº 5, páginas 2034-43. Todo el documento, en especial página 2036, tabla 3; página 2037, tabla 4, compuestos 2 y 6.	47-49
A	HOULISTON, R.S. y col. Identification of a Sialate O-Acetyltransferase from <i>Campylobacter jejuni</i> . Demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminal -2, 8-linked sialic acid. J. Biol. Chem. 2006, Vol. 281, Nº 17, páginas 11480-11486. Todo el documento, en especial página 11481, columna izda, párrafo: "In vitro O-Acetyltransferase Reaction"; página 11483, Figura 3 A y B.	20-46

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
09.02.2012

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07H15/10 (2006.01)

C12P19/26 (2006.01)

C12N9/10 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

C07H, C12P, C12N, 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, REGISTRY, BEILSTEIN, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, PUBMED, MESH

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.02.2012

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

Reivindicaciones 6, 7, 9-16, 20-46, 50

SI

Reivindicaciones 1-5, 8, 17-19, 47-49

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 6, 7, 9-16, 20-46, 50

SI

Reivindicaciones 1-5, 8, 17-19, 47-49

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	US 5766887 A (SCRIPPS RESEARCH INST.)	16.06.1998
D02	US 5102663 A (SOLAN-KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH)	07.04.1992
D03	FR 2662697 A (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO. LTD.)	06.12.1991
D04	IGARASHI, M. y col. Characteristics of gangliosides including O-acetylated species in growth cone membranes at several developmental stages in rat forebrain. Developmental Brain Research. 1994, Vol. 78, Nº 1, páginas 17-24.	
D05	ROMERO-RAMIREZ, L. y NIETO-SAMPEDRO, M. Inhibiting Human Astrocytoma Growth: Structure-Activity Relationships in Neurostatin Related Glycolipids. J. Med. Chem., 2004, Vol. 47, Nº 21, páginas 4983-4984.	
D06	ABAD-RODRIGUEZ, J. y col. Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division of mammalian brain. Journal of Neurochemistry. 2000, Vol. 74, Nº 6, páginas 2547-2556, ISSN 0022-3042.	
D06	Página 2553, párrafo "Neurostatin biological activity", O-acetil-GD3.	
D07	VALLE-ARGOS, B y col. Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth. European Journal of Medicinal Chemistry. Mayo 2010, Vol. 45, Nº 5, páginas 2034-43.	
D08	HOULISTON, R.S. y col. Identification of a Sialate O-Acetyltransferase from Campylobacter jejuni. Demonstration of direct transfer to the C-9 position of terminal -2, 8-linked sialic acid. J. Biol. Chem. 2006, Vol. 281, Nº 17, páginas 11480-11486.	

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 invención se refiere a una serie de gangliósidos de fórmula general (I) de los que se excluyen Neurostatina (9-O-acetil-GD1b), O-acetil-GD2 y O-acetil-GT1b y se describen explícitamente los gangliósidos O-propionil-GD3, O-propionil-GD2, O-propionil-GD1b, O-propionil-GT1b, di-O-acetil-GT1b y las composiciones farmacéuticas de los mismos. También tiene por objeto el procedimiento de obtención de estos compuestos sin excluir los productos del disclaimer que aparecen en la reivindicación 1, procedimiento en el que se utiliza la enzima O-acetiltransferasa para transferir grupos acetilos o propionilos a los gangliósidos base desde los grupos donadores acetil-coenzima A o propionil-coenzima, en presencia de un emulgente.

La invención también se refiere al uso de los compuestos de fórmula general (I) en el tratamiento de tumores cerebrales como astrocitoma, glioblastoma, oligodendroglioma, neuroblastoma o meningioma. Los inventores presentan en la solicitud datos de la actividad inhibitoria de estos compuestos frente a células tumorales, resaltando la mayor actividad inhibitoria de los compuestos propionilados (O-propionil -DG1b y O-propionil-GT1b) frente a los mono-O-acetilados, y atribuyen esta diferencia a que los O-propionilados podrían ser más resistentes a la hidrólisis por glicosidasas, por lo que su efecto sería más duradero.

Se llama a atención del solicitante sobre los siguientes puntos:

- En la definición de la fórmula general (I) X3 no puede ser H.
- La redacción de la reivindicación 47 como "uso de un compuesto de fórmula general (I)..." implica que no se excluyen los productos del disclaimer de la reivindicación 1.

El documento D01 se refiere a un proceso de acetilación regioselectiva en el grupo 9-hidroxi de compuestos que llevan un grupo N-acetilneuramínico, entre ellos los gangliósidos GD3, GD2, GD1a, GD1b, GM1, GT1b, GQ1b con la proteasa subtilisin BPN.

En este documento (figura 2A; columna 3, líneas 31-36) también se describe brevemente la síntesis *in vivo* de 9-O-acetil-GD3 mediante acetilación enzimática de GD3 con O-acetiltransferasa usando acetilcoenzima A.

El documento D02 tiene por objeto una composición farmacéutica para estimular la producción de anticuerpos en pacientes con melanoma contra el gangliósido 9-O-acetil-GD3 que comprende una cantidad efectiva del gangliósido 9-O-acetil-GD3 y los excipientes adecuados.

El documento D03 describe el 9-O-acetil-GD3 y su procedimiento de obtención a partir de leche de vaca u otros productos lácteos.

El documento D04 divulga la presencia de varios gangliósidos acetilados como O-acetil-GD3, O-acetil-GT1b y O-acetil-GQ1b en diferentes estados de desarrollo del cerebro de ratas.

El documento D05 se refiere a un estudio en el que se compara la actividad inhibitoria sobre células de glioma humano U-373 de varios gangliósidos GD1b, GM3, GD3, GM1a y sus correspondientes derivados O-acetilados en el ácido siálico terminal. El compuesto nombrado como 6 corresponde al 9-O-acetil-GD3. Los datos de inhibición correspondiente a este compuesto aparecen en la tabla 2. La síntesis de 9-O-acetil-GD3 se realiza a partir de GD3 por acetilación con la enzima subtilisin y vinil acetato como donador del grupo acetilo.

A la vista de los documentos D01 a D05 del estado de la técnica en los que se describe el compuesto 9-O-acetil-GD3 y su uso como medicamento (D02), se considera que las reivindicaciones 1-5, 8, 17-19, 47 y 48 carecen de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1. y 8.1. LP 11/1986).

En el documento D05 también se divulga que el compuesto nombrado como 8, que corresponde a la Neurostatina (9-O-acetil-GD1b), inhibía la proliferación de líneas celulares de glioma humano U-373 y T98G (página 4983, tabla 1).

El documento D06 divulga un estudio sobre la Neurostatina, su purificación de extractos de cerebros de ratas y ganado bovino, su estructura y su papel como inhibidor de la división de astrocitos en cerebro de mamíferos. Los autores concluyen que este compuesto inhibía la proliferación en cultivo de astroblastos primarios y de gliomas, tanto de ratas como de humanos, a concentraciones nanomolares. En la página 2553, párrafo "Neurostatin biological activity" se hace referencia al gangliósido O-acetil-GD3.

El documento D07 divulga un estudio en el que se sintetizan Neurostatina y diferentes análogos con grupos acetilo o butirilo en una o varias posiciones (página 2036, tabla 3), en particular O-butilil-GD1b mediante síntesis química con trimetil ortoacetato (TMOA) o trimetil ortobutirato (TMOB). En la tabla 4 de la página 2037 se recogen los datos correspondientes a la actividad inhibitoria de estos compuestos en células de astrocitoma humano y glioma de rata, destacando el remarcable efecto de los derivados monosustituídos (O-acetil-GD1b y O-butilil-GD1b), en especial de este último compuesto (Tabla 4, compuesto 6).

Por lo tanto, en base los documentos del estado de la técnica D05 a D07, se considera que las reivindicaciones 47 a 49 de la presente solicitud carecen de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1. y 8.1. LP 11/1986).

El documento D08 divulga un estudio sobre la identificación de una O-acetiltransferasa de *Campylobacter jejuni* y el procedimiento para O-acetilar los ácidos siálicos terminales de polisacáridos derivados del éster succidimil del ácido hexanoico 6-(5-Fluorescein-carboxamido) (FCHASE) (página 11481, columna izquierda, párrafo "In vitro O-Acetyltransferase Reaction"; página 11483, Figura 3 A y B) mediante esta enzima, con acetil-CoA, Mes, MgCl₂ y ditiotretol.

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el contenido de las reivindicaciones 6, 7, 9-16, 20-46, 50, en consecuencia se considera que estas reivindicaciones tienen novedad e implican actividad inventiva (Art. 6.1. y 8.1. LP 11/1986).