(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional

(43) Fecha de publicación internacional
04 de julio de 2019 (04.07.2019)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2019/129909 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C07D 311/72 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
A61K 31/355 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2018/070826

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de diciembre de 2018 (21.12.2018)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201731470 26 de diciembre de 2017 (26.12.2017) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSITAT DE VALÈNCIA** [ES/ES]; Avda. Blasco Ibáñez, 13, 46010 Valencia (ES). **FUNDACIÓN INCLIVA** [ES/ES]; Avenida Menéndez Pelayo 4, accesorio, 46010 Valencia (ES).

(72) Inventores: **CORTÉS MARTÍNEZ, Diego Miguel**; C/ Serra Grossa, 9, Paterna, 46980 Valencia (ES). **SANZ FERRANDO, María Jesús**; C/Burriana nº 20, pta 5, 46005 Valencia (ES). **CABEDO ESCRIG, Nuria**; Avenida Menéndez Pelayo 4 accesorio, 46010 Valencia (ES). **BERMEJO DEL CASTILLO, Almudena**; Avenida Menéndez Pelayo 4 accesorio, 46010 Valencia (ES). **PIQUERAS RUIZ, Laura**; Avenida Menéndez Pelayo 4 accesorio, 46010 Valencia (ES). **COLLADO SÁNCHEZ, Aída**; Avenida Blasco Ibáñez 114, puerta 65, 46022 Valencia (ES). **GOMES MARQUES, Patrice**; Avenida Menéndez Pelayo 4 accesorio, 46010 Valencia (ES). **VILA DASÍ, Laura**; Avenida Menéndez Pelayo 4 accesorio, 46010 Valencia (ES).

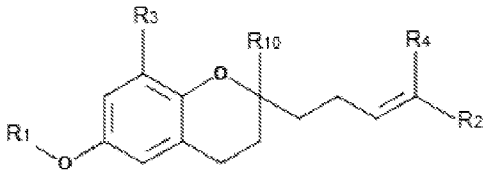
(74) Mandatario: **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Príncipe de Vergara, 197, Oficina 1º A, 28002 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

(54) **Title:** PRENYLATED BENZOPYRANES AS PPAR AGONISTS

(54) **Título:** BENZOPIRANOS PRENILADOS AGONISTAS DE PPAR



(I)

(57) **Abstract:** The present invention describes compounds of formula I comprising a central prenylated benzopyran structure. Said compounds of formula I, stereoisomers and pharmaceutically acceptable salts thereof exhibit activity as PPARα, PPARγ agonists, or dual PPARα and PPARγ agonist activity. Consequently, compounds containing said prenylated benzopyran structure of formula I, pharmaceutical compositions thereof, the first medical use of same, and the use of compounds with a prenylated benzopyran structure to treat diseases which respond to the administration of PPARα and/or PPARγ agonists are described.

(57) **Resumen:** La presente invención describe compuestos de fórmula I que comprenden una estructura central de benzopirano prenilado. Formula (I) Dichos compuestos de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables, presentan actividad como agonistas de PPARα, PPARγ, o actividad dual agonista de PPARα y PPARγ. Se describen por tanto compuestos con dicha estructura benzopirano prenilado de fórmula I, sus composiciones farmacéuticas, su primer uso médico, así como el uso de compuestos de estructura benzopirano prenilado en el tratamiento de enfermedades que responden a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

WO 2019/129909 A1

[Continúa en la página siguiente]

SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

BENZOPIRANOS PRENILADOS AGONISTAS DE PPAR

OBJETO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se relaciona con compuestos que comprenden una estructura central de benzopirano prenilado. Dichos compuestos presentan actividad como agonistas de PPARα, PPARγ, o actividad dual agonista de PPARα y PPARγ. La invención se refiere por tanto compuestos con dicha estructura benzopirano prenilado de fórmula I, sus composiciones farmacéuticas, primer uso médico, así como el uso de compuestos de estructura benzopirano prenilado en el tratamiento de enfermedades que responden a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ. Dichas enfermedades son desórdenes tales como diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, desórdenes cardiovasculares, dislipidemias, tales como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia familiar (grave y moderada), quilomicronemia primaria, la disbetalipoproteinemia familiar o la hiperlipoproteinemia, inflamación y enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) pertenecen a la familia de receptores hormonales nucleares. Existen tres tipos de PPAR: PPARα (NR1C1), PPARβ/δ (NUC1; NR1C2), y PPARγ (NR1C3). Todos actúan como heterodímeros con receptores del ácido 9-cis-retinoico (receptor X retinoide; RXR) y ejercen un papel fundamental en la regulación de diversas vías metabólicas, incluyendo la biosíntesis de lípidos y metabolismo de la glucosa, así como en la diferenciación y proliferación celular y apoptosis (Cheang *et al.*, 2015, Ahmadian *et al.*, 2013 y Tan *et al.*, 2017).

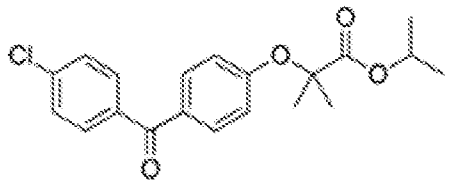
Los PPAR se consideran potentes herramientas terapéuticas en el control de diferentes patologías, tales como la diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, hiperlipidemia, desórdenes cardiovasculares, inflamación y enfermedades neurodegenerativas. Además, los PPAR tienen una importancia adicional ya que están implicados en el control de procesos inflamatorios, por lo que pueden regular la inflamación, función vascular, y el remodelado vascular (Cheang *et al.*, 2015, Ahmadian *et al.*, 2013 y Tan *et al.*, 2017).

Los PPARα se encuentran principalmente en hígado, riñones, corazón, músculo y tejido adiposo, y juegan un papel fundamental en la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de las lipoproteínas.

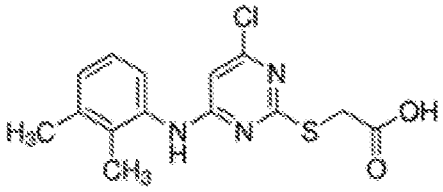
PPARγ predomina fundamentalmente en tejido adiposo, macrófagos, monocitos, células intestinales, músculo esquelético y endotelio. Están relacionados con el metabolismo lipídico, adipogénesis, homeostasis de la glucosa, y sensibilización a la insulina.

Los ligandos PPAR y en particular los agonistas PPARα y PPARγ, inhiben la activación de la expresión de genes de la inflamación y pueden interferir negativamente con vías de señalización de factores de transcripción proinflamatorios en células vasculares e inflamatorias.

Los PPARα son activados por los compuestos de estructura fibrato: fenofibrato, clorfibrato, benzafibrato, y compuestos similares tales como WY-14643:



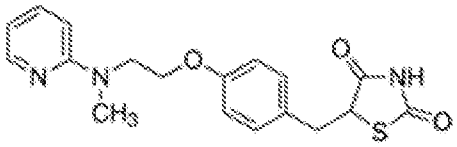
Fenofibrato (agonista PPARα)



WY-14643 (agonista PPARα)

Los agonistas de PPARα son capaces de disminuir los niveles de triglicéridos y aumentar HDL-c, siendo muy efectivos en el tratamiento de hipertrigliceridemia.[1]

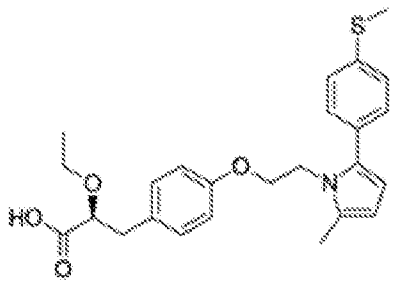
Entre los ligandos de PPARγ conocidos de estos receptores destacan los agonistas de tipo tiazolidinedionas (TZD), entre los que se encuentra rosiglitazona y pioglitazona, que se han utilizado en clínica para el tratamiento de DT2 debido a su capacidad de disminuir los niveles de glucosa en sangre y mejorar la sensibilidad a la insulina (Ahmadian *et al.*, 2013).



Rosiglitazona (agonista PPARγ)

El desarrollo de agonistas de PPARα o de PPARγ, o de agonistas duales de PPARα/PPARγ, ha llevado a la síntesis de una nueva clase de candidatos con potencial terapéutico (Cheang *et al.*, 2015 y Tan *et al.*, 2017). De hecho, los agonistas duales PPARα/γ se consideran compuestos más potentes para corregir la homeostasis de lípidos y de glucosa en DT2 y síndrome metabólico, que los agonistas selectivos (Tan *et al.*, 2017). A pesar de la eficacia clínica de los agonistas PPARα y PPARγ en el tratamiento de las dislipemias y DT2, respectivamente, la aparición de numerosos efectos adversos ha limitado el uso de estos

agonistas selectivos, obligando la retirada de numerosos fármacos. En particular, los agonistas PPARα pueden producir un aumento en los niveles de creatinina y transaminasas, y más raramente miopatía, mientras que los agonistas PPARγ están relacionados con aumento de peso, edema e infarto de miocardio (Cheang *et al.*, 2015). La posibilidad de encontrar un único compuesto capaz de activar los dos receptores PPARα y PPARγ, agonista dual, se presenta como una alternativa potencial en el tratamiento de la DT2 y el síndrome metabólico, con menores efectos secundarios (Cheang *et al.*, 2015 y Tan *et al.*, 2017). Recientemente se ha aprobado el uso de dos agonistas duales PPARα/γ pertenecientes al grupo de los glitazares, saroglitazar en la India (Lipaglyn™, por el centro de investigación Zydus Cadila) y lobeglitazona en Corea (Duvie™, por Chong Kun Dang), para el control lipídico y glucémico (Tan *et al.*, 2017).



Saroglitazar (agonista dual PPARα/γ)

Sin embargo, otros agonistas duales como farglitazar y muraglitazar se han retirado del mercado debido a sus efectos secundarios de edema, infarto de miocardio, ictus y fallo cardiaco, así como aleglitazar (en fase clínica II), ragaglitazar y tesaglitazar ya que han mostrado carcinogeneicidad en modelos de roedores y un aumento de la creatinina en plasma (Tan *et al.*, 2017).

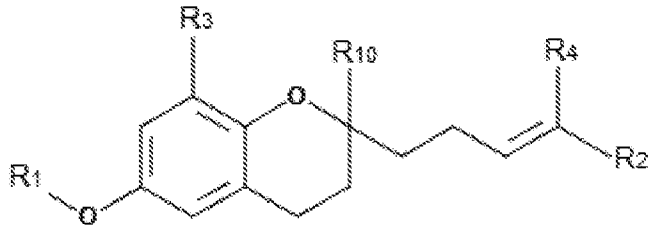
El desarrollo de agonistas duales hPPARα y hPPARγ permite combinar las propiedades de los agonistas del PPARα (fibratos) sobre la regulación del metabolismo lipídico incluyendo disminución de triglicéridos (TG), con el efecto adicional de mejorar la sensibilidad a la insulina que producen los agonistas del PPARγ (TZD). Generalmente, estos ligandos duales hPPARα/γ han mostrado en modelos animales mayor eficacia y menor toxicidad en el tratamiento de disfunciones del metabolismo, que la utilización de compuestos selectivos para cada uno de los receptores. De hecho, estudios clínicos muestran que agonistas duales PPARα/γ disminuyen la resistencia a la insulina en diabetes tipo 2, los valores de glucemia y TG en plasma, y participan en el control de la inflamación vascular. Por lo tanto, la búsqueda de agonistas duales PPARα/γ es importante para el tratamiento de diversas disfunciones metabólicas como es síndrome metabólico, DT2 y enfermedades cardiovasculares.

Por todo ello, existe la necesidad de desarrollar agonistas de PPARα y/o γ que muestren mayor eficacia que los actuales, y/o que además muestren menor toxicidad.

DESCRIPCIÓN

La presente invención describe compuestos agonistas de PPARα y/o PPARγ y composiciones farmacéuticas que los comprenden. Dichos compuestos, y las composiciones que los comprenden son útiles, en el tratamiento de enfermedades que responden a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ. Dichos compuestos son, por tanto, útiles en el tratamiento de desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). La presente invención describe, asimismo, los usos de dichos compuestos agonistas de PPARα y/o PPARγ y de las composiciones farmacéuticas que los comprenden, en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

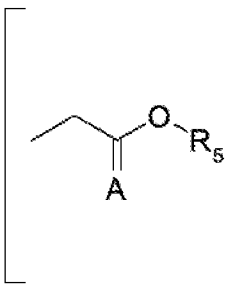
Una realización de los compuestos agonistas de PPARα y/o PPARγ descritos se refiere a un compuesto de formula general I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

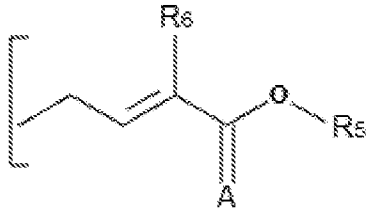
donde

- R_1 se selecciona independientemente entre H o un grupo protector de un fenol;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -C(O)OR^b, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H o un grupo protector de ácido carboxílico;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

y donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido.;
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona.

En una realización de la presente invención cuando R_1 es H y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo, y cuando R_1 es metilo y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo.

Una realización se refiere a un compuesto de formula general I, descrito anteriormente, a sus enantiómeros, isómeros E,Z y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

A efectos de la presente invención se define el término “grupo protector de un fenol” como grupos que sustituyen al H del grupo fenol OH para evitar que éste sea reactivo o bien grupos que favorecen la farmacodinamia y farmacocinética de la molécula. Son ejemplos no limitantes de grupos protectores de fenol, entre otros: C_{1-6} alquilo (p.ej. metilo, etilo, propilo, etc.); alilo; alquilamina (ej. metil- isoquinoleína); alquilamida (p.ej. acetamida); alquilarilo (p.ej. bencilo, *p*-fluorobencilo, *p*-metoxibencilo); alquil-éter (p.ej. 2-metoxietoximetil); halo-alquilo (p. ej. trifluorometilo, fluoroetilo, cloroetilo); sililo (p.ej. alquiltrimetilsilano, aliltrimetilsilano); carbamato $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo

o arilo; un grupo acilo (p.ej. benzoílo), una alquilsulfona o una halo-alquilsulfona (p.ej. trifluorometilsulfona).

En una realización de la presente invención el grupo R_1 es un grupo protector de un fenol que se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo $C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona.

En una realización R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamida, alquilarilo, alquil-éter, alquilbenzoilo, halo-alquilo, sililo, halo-alquilsulfona o un grupo acilo -$C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo.

En otra realización R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, C_{1-6} alquilo, alquilamida, alquilarilo, o un grupo acilo -$C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo.

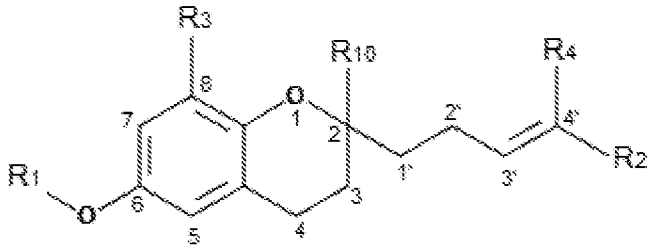
El término “grupo protector de un ácido carboxílico” se define, a efectos de la presente invención, como grupos que sustituyen al H del grupo ácido carboxílico -COOH para evitar que éste sea reactivo o bien grupos que favorecen la farmacodinamia y farmacocinética de la molécula. Son ejemplos no limitantes de grupos protectores de ácido carboxílico, entre otros: C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamida, alquilamina, alquilarilo, alquil-éter, alquil-éster, halo-alquilo, sililo, carbamato $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo, acilo $C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo, alquilsulfona o halo-alquilsulfona.

En una realización R_5 se selecciona independientemente entre H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona.

En una realización R_5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, C_{1-6} alquilo, alquilarilo o alquil-éster.

En otra realización R_5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H, C_{1-6} alquilo, arilo, alquilarilo, alquil-éter, alquil-éster, alquilsulfona, halo-alquilo, sililo, halo-alquilsulfona.

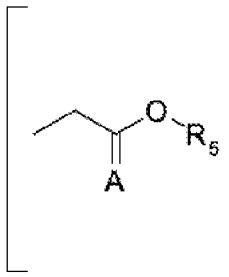
Una realización de la invención se refiere a un compuesto de formula general I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

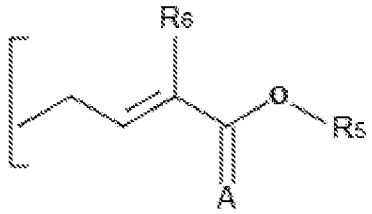
donde

- R_1 se selecciona independientemente entre H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo $C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -$C(O)OR^b$, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo; y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p

son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona;

- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

y donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido.;
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona.

En una realización de la presente invención cuando R_1 es H y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo, y cuando R_1 es metilo y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo.

A efectos de la presente invención, un compuesto de fórmula I incluye todos los estereoisómeros de dicha fórmula I.

El término “estereoisómero” se refiere, a efectos de la presente invención a moléculas que tienen la misma fórmula molecular y la misma secuencia de átomos unidos (misma constitución), con los mismos enlaces entre sus átomos, pero que difieren en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. Enantiómeros y diasterómeros son dos tipos diferentes de estereoisómeros.

El término “enantiómero” se refiere, a efectos de la presente invención, a dos estereoisómeros que son imágenes especulares y no superponibles entre sí.

En particular, una realización de la presente invención comprende los enantiómeros *R* y *S* de los compuestos de fórmula I, en los que dichos enantiómeros son los 2 enantiómeros posibles respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano, incluyendo, por tanto, la configuración *R* y *S* del radical R_{10}.

El término “diasterómero” se refiere, a efectos de la presente invención, a dos estereoisómeros que no son imágenes especulares. Los diasterómeros incluyen compuestos meso, isómeros E/Z e isómeros ópticos no enantioméricos.

Los isómeros E/Z se refieren a compuestos que comprenden enlaces doble C=C, es decir alquenos o cicloalquenos. Si en un enlace doble C=C los dos sustituyentes de mayor prioridad, de acuerdo con las reglas de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), están en el mismo lado, la disposición es Z. En cambio, si están en lados opuestos la disposición es E.

Una realización se refiere a un compuesto de formula general I, descrito anteriormente, a sus enantiómeros, isómeros E,Z y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Una realización comprende el enantiómero R respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Otra realización comprende el enantiómero S respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Una realización comprende el isómero E respecto al doble enlace de la posición C-‘3 de la cadena lateral prenilada.

Una realización comprende el isómero Z respecto al doble enlace de la posición C-‘3 de la cadena lateral prenilada.

El término sales farmacéuticamente aceptables, a efectos de la presente invención, se refiere a cualquier sal que administrada a un paciente es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el compuesto en cuestión. Dichas sales son preferentemente sales de adición de ácidos orgánicos o inorgánicos, o de bases orgánicas o inorgánicas. Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, nitrato, fosfato, o sales de adición de ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acetato, trifluoroacetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato o tartrato. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, calcio o amonio, o sales de adición de bases orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, N,N-dialquiletanolamina, trietanolamina y sales básicas de aminoácidos. Los procedimientos de formación de sales son procedimientos convencionales en el estado del arte.

El término “C_{1-6} alquilo” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada de 1 a 6 átomos de carbono, completamente saturada, que puede ser lineal o ramificada.

El término “halo-alquilo” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada, que puede ser lineal o ramificada, en la que al menos un H se encuentra sustituido por un átomo de un halógeno.

El término “alilo” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada, que puede ser lineal o ramificada, que comprende al menos un grupo -CH=CH-CH_2-.

El término “alquilamida” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada, que puede ser lineal o ramificada, sustituida con un grupo amida.

El término “alquilamina” se refiere a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada, que puede ser lineal o ramificada, sustituida con un grupo amino.

El término “arilo” se refiere, a efectos de la presente invención, a grupo derivado de un hidrocarburo aromático que se forma al extraer un átomo de hidrógeno de un anillo aromático en dicho hidrocarburo aromático. A efectos de la presente invención dichos grupos arilo pueden encontrarse opcionalmente sustituidos. Ejemplos de sustituciones no limitantes son OH, alcóxido, alquilo, halógeno, alquilo halogenado, ciano, tiol, amina o alquilamina.

El término “alquilarilo” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada sustituida con un grupo arilo, que a su vez se define tal como se describe anteriormente.

El término “alcóxido” se refiere, a efectos de la presente invención, a un átomo de oxígeno unido a una cadena hidrocarbonada, donde dicha cadena hidrocarbonada puede comprender un grupo alquilo y/o un grupo arilo, tal como se definen anteriormente.

El término “alquil-éter” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada saturada sustituida con un grupo alcóxido, tal como se define anteriormente.

El término “acilo” se refiere, a efectos de la presente invención, a un grupo carbonilo unido a una cadena hidrocarbonada, donde dicha cadena hidrocarbonada puede comprender un grupo alquilo y/o un grupo arilo, tal como se definen anteriormente.

El término “éster”, a efectos de la presente invención, se refiere a un grupo derivado de un ácido carboxílico -COOH, en el que el grupo hidroxilo -OH se encuentra sustituido por un grupo alcóxido, tal como se define de acuerdo con la presente invención.

El término “alquil-éster” se refiere, a efectos de la presente invención, a una cadena hidrocarbonada saturada sustituida con un grupo éster, tal como se define anteriormente.

En una realización preferente A es un átomo de O.

En otra realización preferente A es un átomo de S.

En otra realización preferente A es un grupo un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, $-OR_8$ o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_7 es H, -OH o $-OCH_3$.

En una realización preferente R_1 es H.

En otra realización preferente R_1 es un grupo C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_1 es un grupo metilo o propilo.

En otra realización preferente R_1 es un grupo alquilarilo. Más preferentemente R_1 es un grupo bencilo o 4-fluorobencilo.

En otra realización preferente R_1 es un grupo alquilamida. Más preferentemente R_1 es un grupo acetamida.

En otra realización preferente R_1 es un grupo acilo -C(O)R^a. Más preferentemente R1 es un grupo acilo -C(O)R^a, donde R^a es un grupo arilo. Aún más preferentemente R^a es un grupo fenilo.

En una realización preferente R_3 es H.

En otra realización preferente R_3 es metilo.

En una realización preferente R_4 es C_{1-6} alquilo o un grupo alcóxido. En una realización preferente el grupo alcóxido es un grupo alcóxido halogenado.

En una realización más preferente R_4 es metilo.

En una realización más preferente R_4 es -OCH_2CF_3.

En una realización preferente R_5 es H.

En otra realización preferente R_5 es C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_5 es metilo, etilo, propilo, butilo o tert-butilo. Aún más preferentemente R_5 es metilo, etilo o propilo.

En otra realización preferente R_5 es alquilarilo. Más preferentemente R_5 es bencilo.

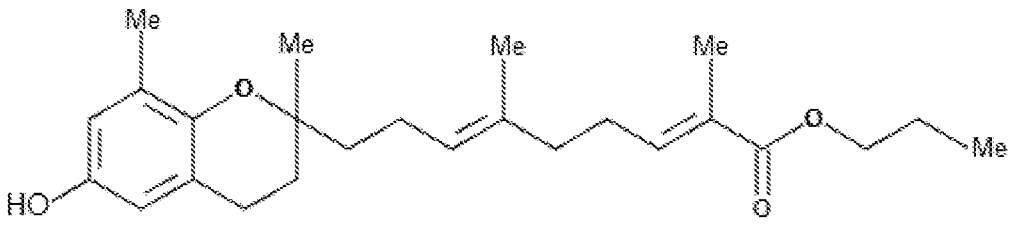
En otra realización preferente R_5 es alquil éster. Más preferentemente R_5 es -CH_2COOCH_3 o -$CH(COOCH_3)_2$.

En una realización preferente R_6 es metilo.

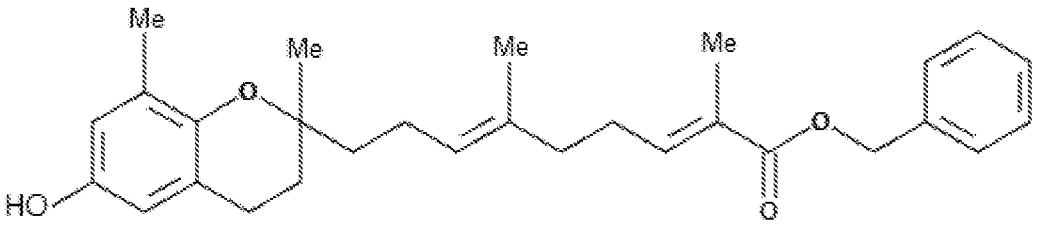
En otra realización preferente R_6 es OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_9 es etilo.

En una realización preferente R_{10} es C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_{10} es metilo.

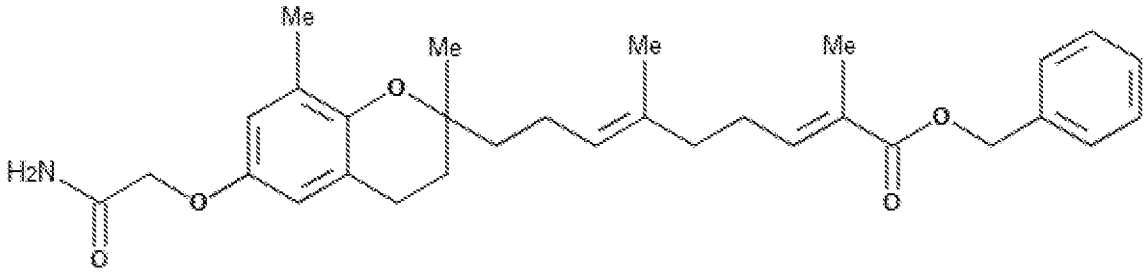
Una realización preferente de la invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 8, 9,10, 11, 12 y 13:



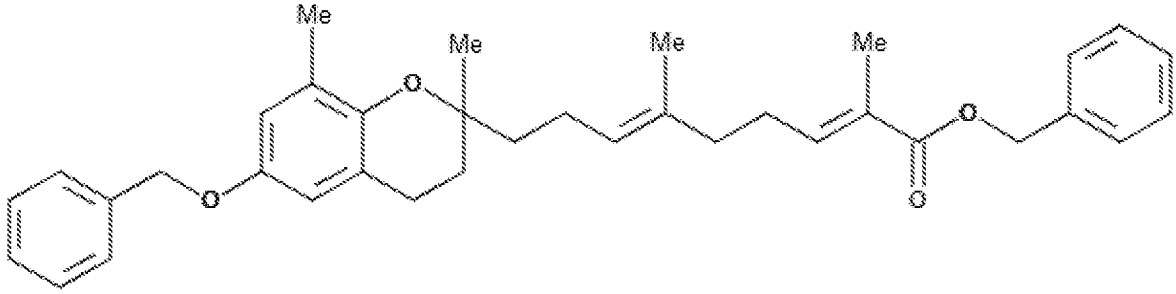
(3)


Me
Me
Me
Me
O
HO
O
O

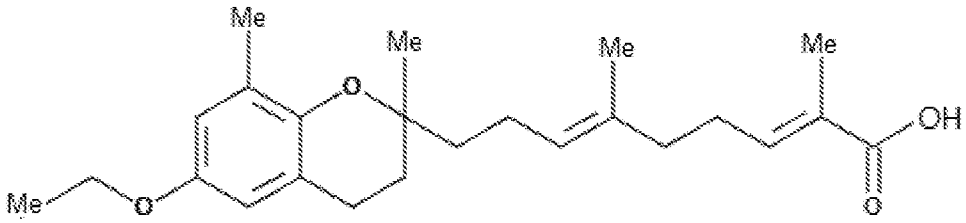
(4)


Me
Me
Me
Me
O
H2N
O
O
O
O

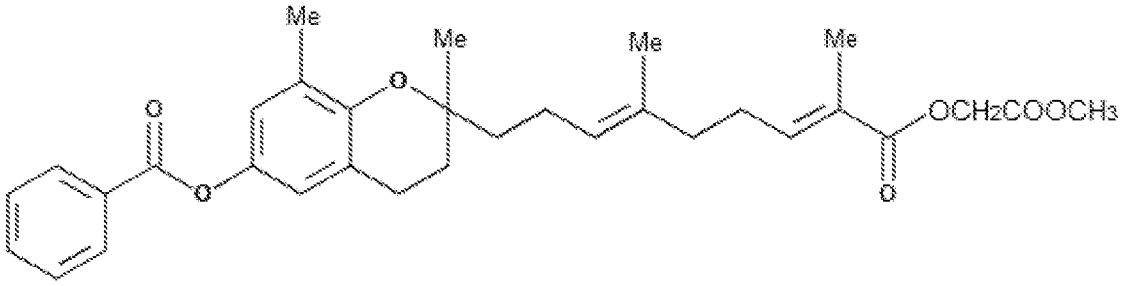
(4a)


Me
Me
Me
Me
O
O
O
O

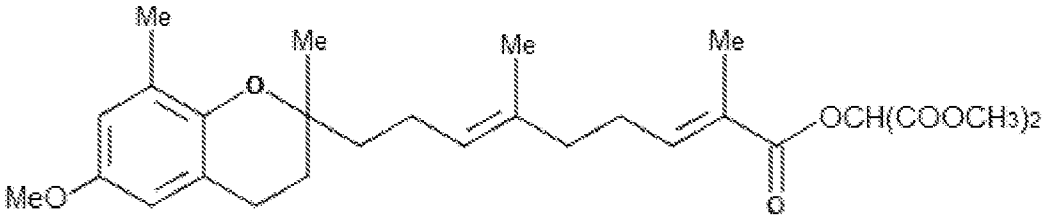
(4b)


Me
Me
Me
Me
O
OH
Me
O
O

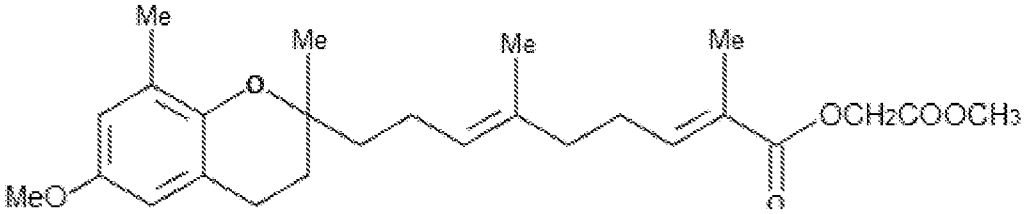
(4c)


Me
Me
Me
Me
O
O
O
OCH2COOCH3
O

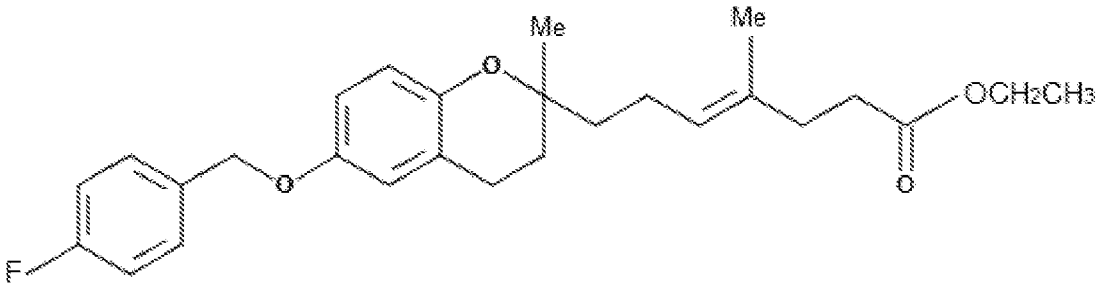
(6)


Me
Me
Me
Me
O
OCH(COOCH3)2
MeO
O

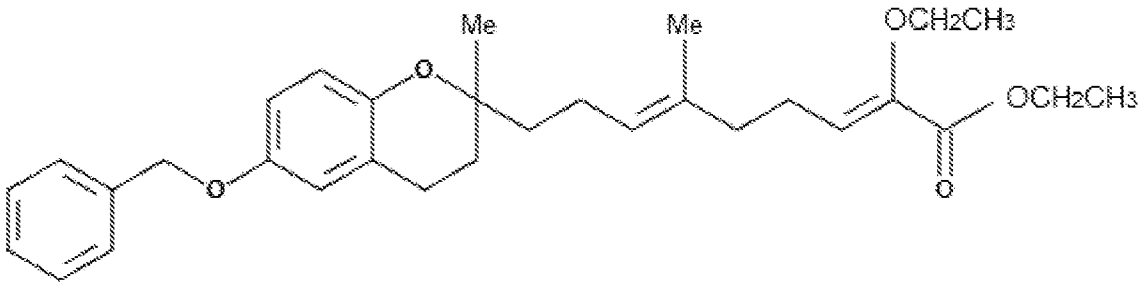
(7)


Me
Me
Me
Me
O
OCH2COOCH3
MeO
O

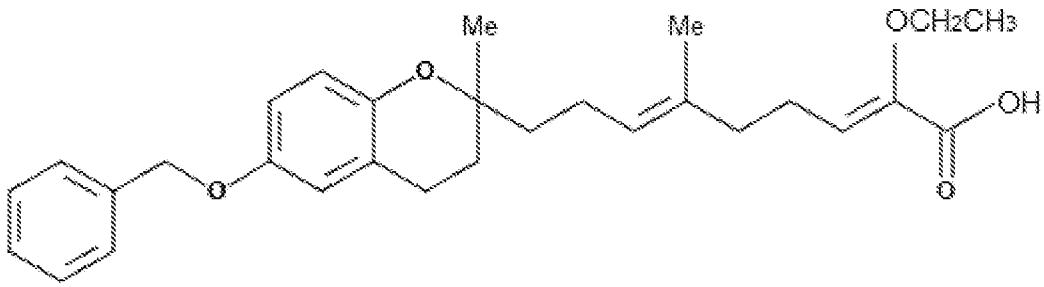
(8)


Me
Me
O
OCH2CH3
O
O
F

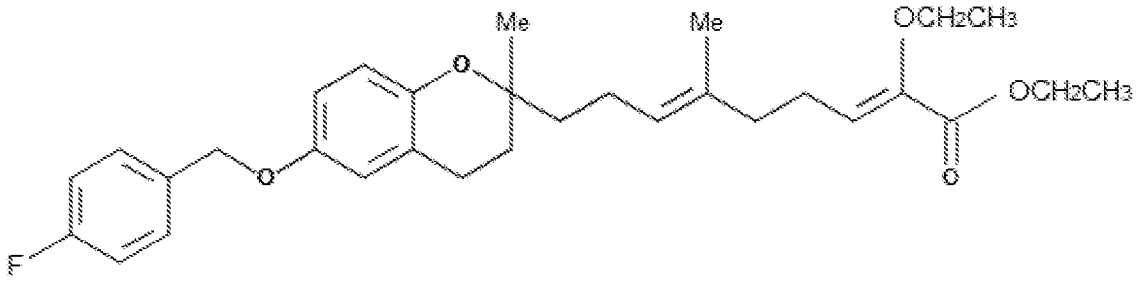
(9)


Me
Me
OCH2CH3
OCH2CH3
O
O
O

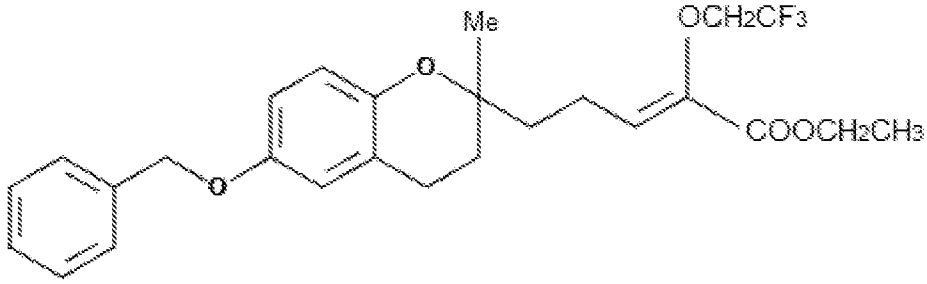
(10)


Me
Me
OCH2CH3
OH
O
O
O

(11)



(12)



(13)

Una realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Otra realización comprende el enantiómero *S* de los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Una realización comprende el isómero (*E,Z*) de los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*E,E*) de los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8,10, 11 y 12, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

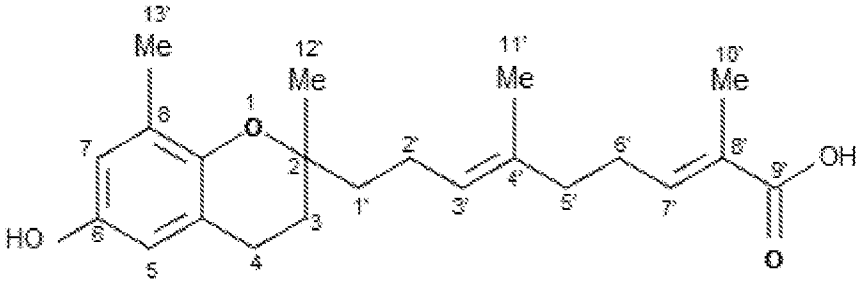
Una realización comprende el isómero (*Z,Z*) de los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*Z,E*) de los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

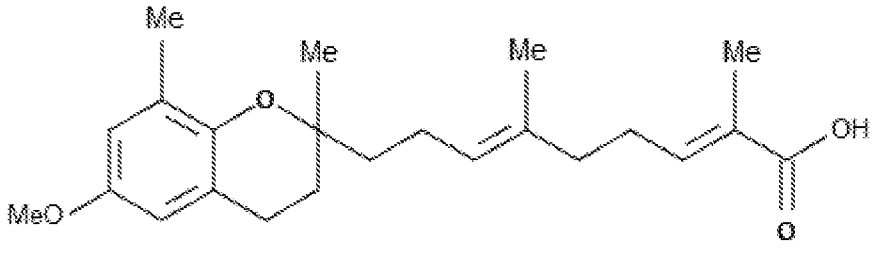
Una realización comprende el isómero *E* de los compuestos 9 y 13, respecto a la posición C-‘3 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero *Z* de los compuestos 9 y 13, respecto a la posición C-‘3 de la cadena lateral prenilada.

Los compuestos de fórmula I, sus estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables, con actividad agonista PPAR comprenden una estructura común derivada de los benzopiranos prenilados naturales policerasoidol y policerasoidin (Gonzalez *et al*., 1995 y 1996), isómeros naturales de los compuestos 1 y 2 aquí descritos: El isómero (3*E,7Z*) del compuesto 1 se corresponde al compuesto natural policerasoidol, mientras que el isómero (3*E,7E*) es el compuesto natural isopolicerasoidol, y el policerasoidin se corresponde al isómero (3E,7Z) del compuesto 2:



(1)



(2)

Dichos documentos de Gonzalez et al (1995 y 1996) describen el aislamiento de los compuestos naturales policerasoidol y policerasoidin de la corteza de árboles del género *Polyalthia*, indicando que alguno de los compuestos de la familia de las hidroquinonas preniladas, a la que pertenecen, son conocidos por tener propiedades citotóxicas o antioxidantes, sin referirse o dar pistas sobre una posible actividad como agonistas de PPAR. En el mismo sentido, otros documentos divulgan dichos compuestos, o compuestos de estructura similar, si bien dichos compuestos tampoco presentan actividad como agonistas de PPAR. En particular, el documento Taha et al, 2015 y Karimian et al. (2015) describe el uso de policerasoidol, de su éster metílico, y de policerasoidin como inductores de apoptosis en células tumorales de cáncer de mama. Zhao et al. (2010) analiza diferentes metabolitos derivados de tocoferol y tocotrienoles detectados en orina, suero o hígado en muestras humanas y de ratones, entre los cuales se describe el policerasoidol. Zafra-Polo et al. (1996) describe el polyalthidin, relacionado con la estructura básica de los compuestos de la invención, pero que sin embargo se describe solamente con relación a su actividad como inhibidor de la cadena respiratoria mitocondrial. Finalmente, el documento EP0421419A describe compuestos de núcleo benzopirano con tres cadenas preniladas haciendo referencia a su uso para disminuir los niveles séricos del colesterol. Ninguno de estos documentos

describe, o da pistas sobre la posible utilidad de compuestos similares, con un núcleo benzopirano prenilado, como agonistas de PPAR.

Una realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos 1 y 2, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Otra realización comprende el enantiómero *S* de los compuestos 1 y 2, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

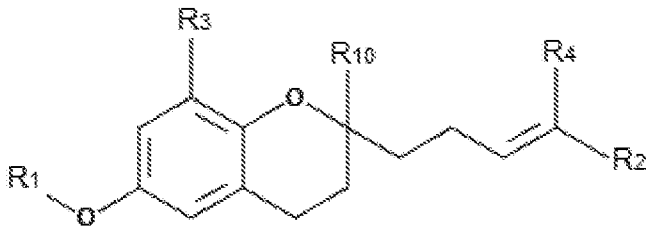
Una realización comprende el isómero (*E,E*) de los compuestos 1 y 2, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*E,Z*) de los compuestos 1 y 2, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Una realización comprende el isómero (*Z,Z*) de los compuestos 1 y 2, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

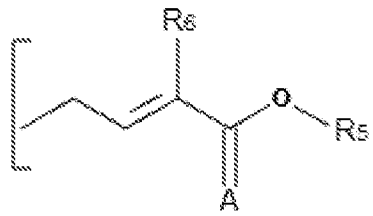
Otra realización comprende el isómero (*Z,E*) de los compuestos 1 y 2, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Una realización preferente se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



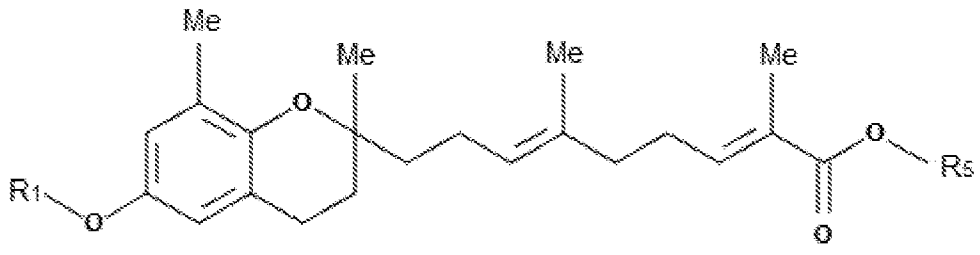
(I)

en el que R_3, R_{10} y R_4 son metilo y R_2 es un derivado de un grupo prenilo de estructura:



, donde A es un átomo de O, y R_6 es metilo,

y donde dicho compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula II, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(II)

en donde R_1 y R_5 se definen de acuerdo a las realizaciones de la presente invención descritas anteriormente.

Dichos compuestos de fórmula II incluyen, por tanto, los compuestos 1, 2 y compuestos derivados con diferentes grupos R_1 y R_5.

En una realización preferente, cuando R_1 es H, R_5 es distinto de H o metilo, y cuando R_1 es Me, R_5 es distinto de H o metilo.

Una realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos de fórmula II, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Otra realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos de fórmula II, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Una realización comprende el isómero (*E,Z*) de los compuestos de fórmula II, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*E,E*) de los compuestos de fórmula II, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Una realización comprende el isómero (*Z,Z*) de los compuestos de fórmula II, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*Z,E*) de los compuestos de fórmula II, respecto a las posiciones C-‘3 y C-‘7 de la cadena lateral prenilada.

En una realización preferente, R_1 es H y R_5 es H.

En otra realización preferente, R_1 es C_{1-6} alquilo y R_5 es H. Más preferentemente R_1 es metilo y R_5 es H.

En otra realización preferente, R_1 es H y R_5 es C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_1 es H y R_5 es metilo o propilo.

En una realización preferente, R_1 es H y R_5 es alquilarilo. Más preferentemente R_1 es H y R_5 es bencilo.

En otra realización preferente, R_1 es alquilamida y R_5 es alquilarilo. Más preferentemente R_1 es acetamida, y R_5 es bencilo.

En otra realización preferente, R_1 y R_5 son alquilarilo. Más preferentemente R_1 y R_5 son bencilo.

En otra realización preferente, R_1 es C_{1-6} alquilo y R_5 es H. Más preferentemente R_1 es propilo es R_5 es H.

En otra realización preferente, R_1 es un grupo acilo -C(O)R^a, donde R^a es un grupo arilo, y R_5 es un grupo alquil éster. Más preferentemente R_1 es un grupo benzoilo y R_5 es un grupo -CH_2COOCH_3.

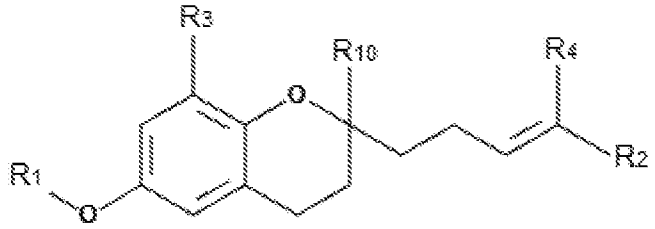
En otra realización preferente, R_1 es un grupo C_{1-6} alquilo y R_5 es un grupo alquil éster. Más preferentemente R_1 es un grupo metilo y R_5 es un grupo -CH_2COOCH_3 o un grupo -$CH(COOCH_3)_2$.

Ambos compuestos 1 y 2 muestran una estructura similar y solo difieren en el grupo funcional de la posición C-6, un hidroxilo en el compuesto 1 y un metoxilo en el compuesto 2. A partir de los compuestos 1 y 2 se pueden sintetizar los compuestos 3, 4, 4a,4b, 4c, 6, 7 u 8 de fórmula I, mediante sustitución de las posiciones C-9' y C-6, tal como se describe en el Ejemplo 1, más adelante.

Una realización del compuesto de fórmula II, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se describe anteriormente, es un compuesto que se selecciona independientemente entre compuesto 1, 2, 3, 4, 4a, 4, b, 4c, 6, 7 u 8.

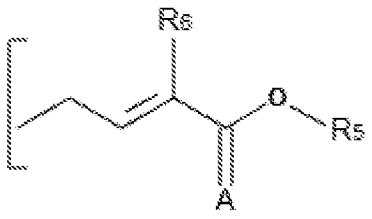
Una realización preferente de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula II, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7 y 8. En una realización preferente los compuestos 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7 y 8 son isómeros (*E,Z*), en relación a los dobles enlaces de la cadena lateral prenilada en posiciones C-3' y C-7'.

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



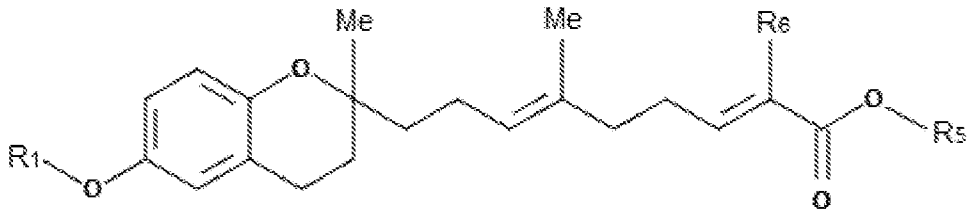
(I)

en el que R_3 es H, R_4 y R_{10} son metilo y R_2 es un derivado de un grupo prenilo de estructura:



, donde A es un átomo de O,

y donde dicho compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula III, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(III)

en donde R_1, R_5, y R_6 se definen de acuerdo a las realizaciones de la presente invención descritas anteriormente.

Dichos compuestos de fórmula III presentan igualmente una estructura derivada de los compuestos 1 y 2, pero a diferencia de los compuestos de fórmula II, presentan H en lugar de metilo como grupo R_3, y además de las modificaciones en las posiciones C-6 ($-OR_1$) y C-9' ($-COOR_5$), también presentan modificaciones en la posición C-8' (R_6).

Una realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos de fórmula III, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Otra realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos de fórmula III, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Una realización comprende el isómero (*E,Z*) de los compuestos de fórmula III, respecto a las posiciones C-'3 y C-'7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*E,E*) de los compuestos de fórmula III, respecto a las posiciones C-'3 y C-'7 de la cadena lateral prenilada.

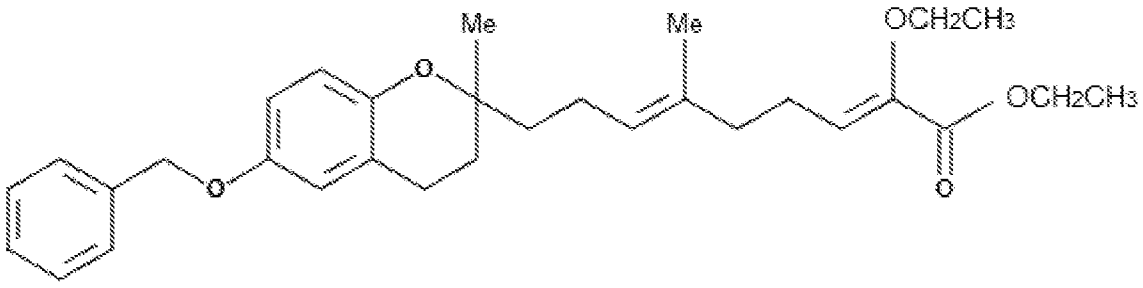
Una realización comprende el isómero (*Z,Z*) de los compuestos de fórmula III, respecto a las posiciones C-'3 y C-'7 de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero (*Z,E*) de los compuestos de fórmula III, respecto a las posiciones C-'3 y C-'7 de la cadena lateral prenilada.

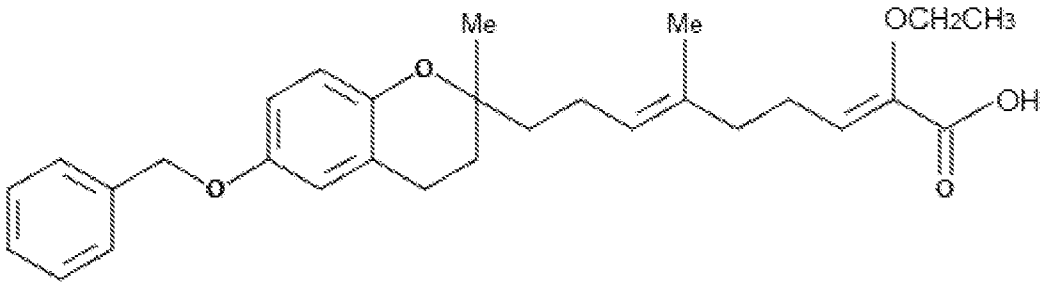
En una realización preferente, R_1 es un grupo alquilarilo, R_6 es un grupo $-OR_9$, donde R_9 es C_{1-6} alquilo, y R_5 es H o un grupo C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_1 es un grupo bencilo, R_6 es un grupo $-OCH_2CH_3$, y R_5 es H o etilo.

Mas preferentemente R_1 es un grupo 4-fluorobencilo, R_6 es un grupo $-OCH_2CH_3$, y R_5 es etilo.

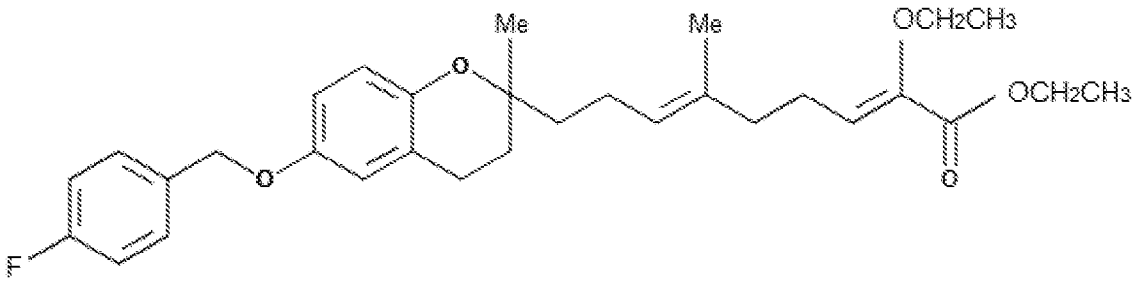
Una realización del compuesto de fórmula III, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se describe anteriormente, es un compuesto que se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en compuesto 10, 11 y 12:



(10)

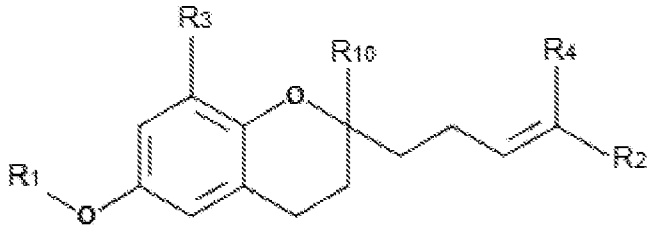


(11)



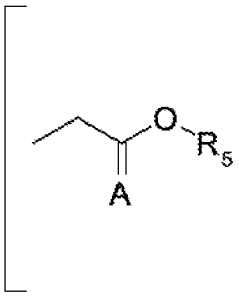
(12)

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



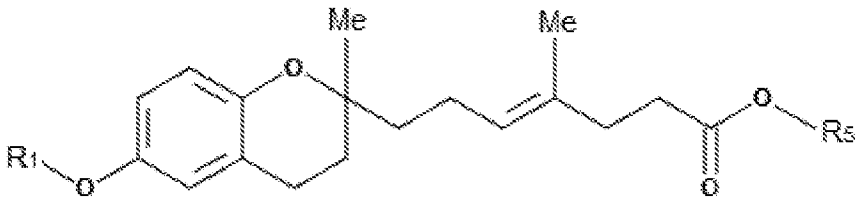
(I)

en el que R_3 es H, R_4 y R_{10} son metilo y R_2 es un grupo alquil-éster de estructura:



, donde A es un átomo de O,

y donde dicho compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula IV, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(IV)

en donde R_1 y R_5 se definen de acuerdo a las realizaciones de la presente invención descritas anteriormente.

Dichos compuestos de fórmula IV presentan igualmente una estructura derivada de los compuestos de fórmula I 1 y 2. Sin embargo, los compuestos de fórmula IV son compuestos de fórmula I donde el radical R_3 es H, y no metilo tal como presentan los compuestos 1 y 2, y el radical R_2 es un grupo alquil-éster que, a diferencia de los compuestos 1 y 2, no presenta un segundo grupo prenilo.

Una realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos de fórmula IV, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

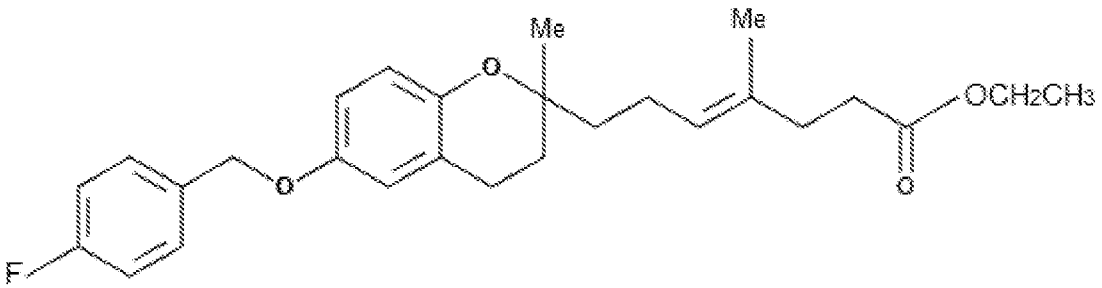
Otra realización comprende el enantiómero *S* de los compuestos de fórmula IV, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Una realización comprende el isómero *E* de los compuestos de fórmula IV, respecto al doble enlace de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero *Z* de los compuestos de fórmula IV, respecto al doble enlace de la cadena lateral prenilada.

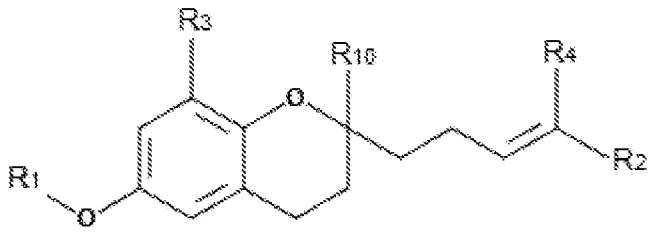
En una realización preferente R_1 es alquilarilo y R_5 es C_{1-6} alquilo. Más preferentemente R_1 es 4-fluorobencilo y R_5 es etilo.

Una realización del compuesto de fórmula IV, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se describe anteriormente, es el compuesto 9:



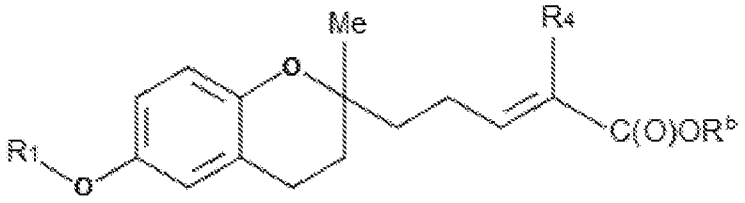
(9)

Otra realización preferente de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

en el que R_3 es H, R_{10} es metilo y R_2 es -C(O)OR^b, y donde dicho compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula V, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(V)

en donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo y, R_1 y R_4 se definen de acuerdo a las realizaciones de la presente invención descritas anteriormente.

Dichos compuestos de fórmula V presentan igualmente una estructura derivada de los compuestos de fórmula I1 y 2, pero donde en dicha fórmula I el radical R_2 es un grupo éster en lugar de un grupo alquil-éster prenilado que presentan los compuestos 1 y 2.

Una realización comprende el enantiómero *R* de los compuestos de fórmula V, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

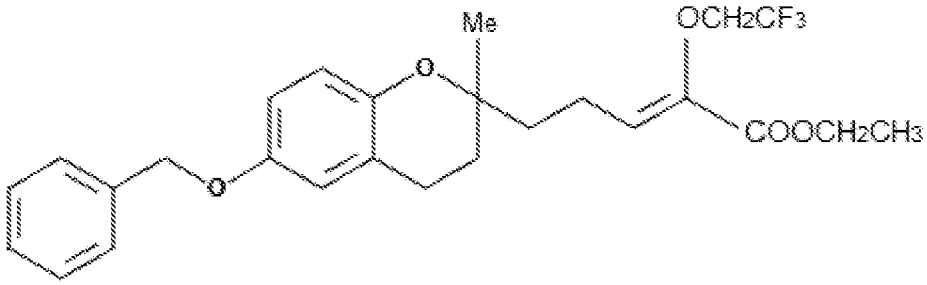
Otra realización comprende el enantiómero *S* de los compuestos de fórmula V, respecto a la posición C-2 del núcleo benzopirano.

Una realización comprende el isómero *E* de los compuestos de fórmula V, respecto al doble enlace de la cadena lateral prenilada.

Otra realización comprende el isómero *Z* de los compuestos de fórmula V, respecto al doble enlace de la cadena lateral prenilada.

En una realización preferente R_1 es alquilarilo, R^b es C_{1-6} alquilo y R_4 es un grupo alcóxido. Más preferentemente R_1 es bencilo, R^b es etilo y R_4 es $-OCH_2CF_3$.

Una realización del compuesto de fórmula V, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se describe anteriormente, es el compuesto 13:



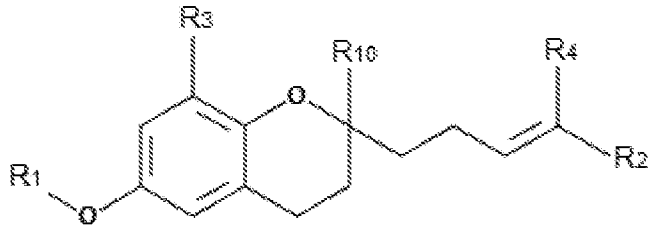
(13)

Una realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, tal como se ha descrito anteriormente, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se define como cantidad efectiva, a efectos de la presente invención, aquella cantidad del compuesto que proporciona una mejora objetivamente identificable en el estado del paciente, reconocida por un observador cualificado, y donde dicho paciente es tratado con una composición farmacéutica que comprende dicha cantidad del compuesto.

Son excipientes farmacéuticamente aceptables, a efectos de la presente invención, ingredientes inertes tales como, pero no limitados a, codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizadores y antioxidantes.

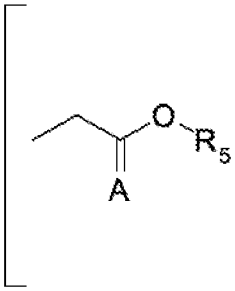
Una realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

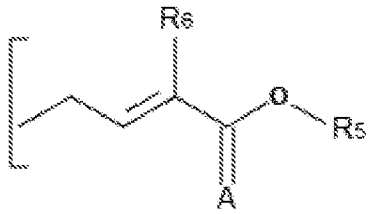
donde

- R_1 es H o un grupo protector de un fenol;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -C(O)OR^b, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

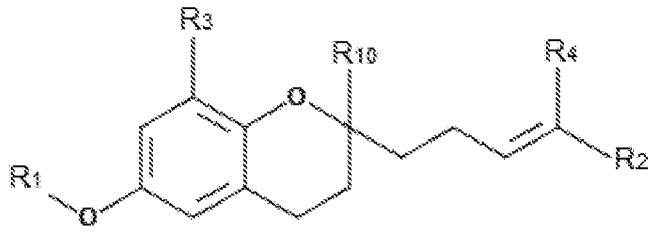
- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H o un grupo protector de ácido carboxílico;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo; y
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido;
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona; y

donde cuando R_1 es H y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo, y cuando R_1 es metilo y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo; o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso como medicamento.

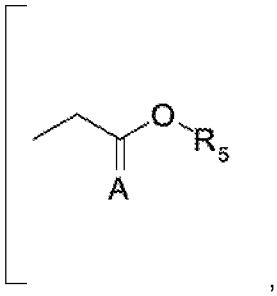
Otra realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

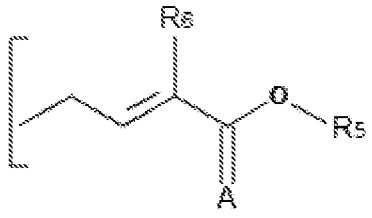
donde

- R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo $C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -C(O)OR^b, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; C(O)NR_mR_p, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo C(O)R^a, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo; y
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido;
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona; y

donde cuando R_1 es H y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo, y cuando R_1 es metilo y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo; o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso como medicamento.

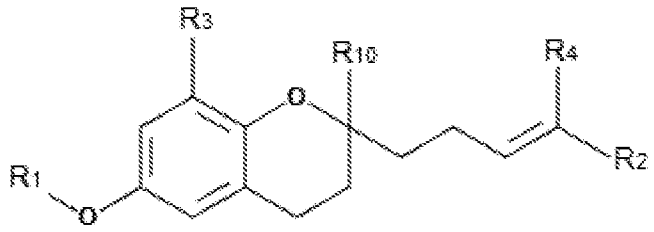
Una realización del compuesto de fórmula I, o de una composición que lo comprende, para uso como medicamento, tal como se describe anteriormente, comprende cualquiera de sus enantiómeros o mezclas de estos, y cualquiera de sus isómeros E/Z y mezclas de ellos, y sus sales farmacéuticamente aceptables. Una realización comprende el enantiómero R. Otra realización comprende el enantiómero S. Una realización comprende el isómero E. Otra realización comprende el isómero Z.

Otra realización preferente se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso como medicamento.

Los compuestos de fórmula I descritos, son agonistas de PPARα y/o PPARγ. Por tanto, dichos compuestos son útiles en el tratamiento de enfermedades que responden a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, es decir, en enfermedades mediadas por agonistas de PPARα y/o PPARγ, que equivale a enfermedades cuyo tratamiento se beneficia de la administración de agonistas de PPARα y PPARγ.

Tal como se ha indicado anteriormente, los PPAR se consideran potentes herramientas terapéuticas en el control de desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Ahmadian *et al*., 2013). Además, los PPAR tienen una importancia adicional ya que están implicados en el control de procesos inflamatorios, por lo que pueden regular la inflamación, función vascular, y el remodelado vascular.

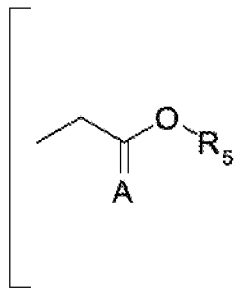
Una realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

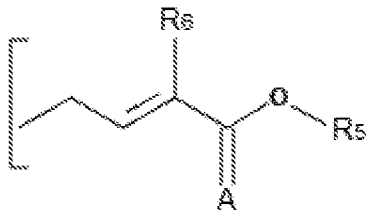
donde

- R_1 es H o un grupo protector de un fenol;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -C(O)OR^b, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 es H o un grupo protector de un ácido carboxílico;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

y donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo; y
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido; y
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona;

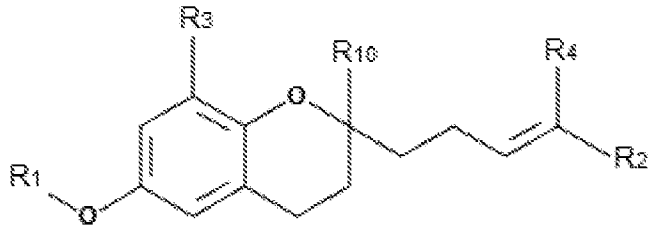
o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

En una realización la enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ se selecciona independientemente entre desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

En una realización los desórdenes cardiovasculares se refieren a la aterosclerosis.

En una realización las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan independientemente entre Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Una realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:

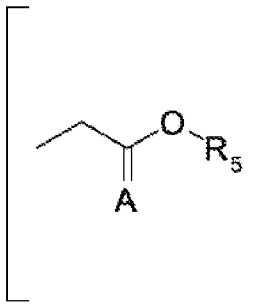


(I)

donde

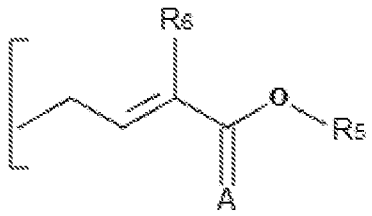
- R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo $C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona;

- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -C(O)OR^b, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; C(O)NR_mR_p, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo C(O)R^a, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona o halo-alquilsulfona;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

y donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo; y
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido; y
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona;

o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

En una realización la enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ se selecciona independientemente entre desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

En una realización las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan independientemente entre Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Una realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, tales como la diabetes tipo 2 (DT2).

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de la aterosclerosis. Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de la aterogénesis.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de la inflamación y de enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de hipercolesterolemia.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de hipertrigliceridemia.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento del síndrome metabólico.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de la obesidad.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de quilomicronemia primaria.

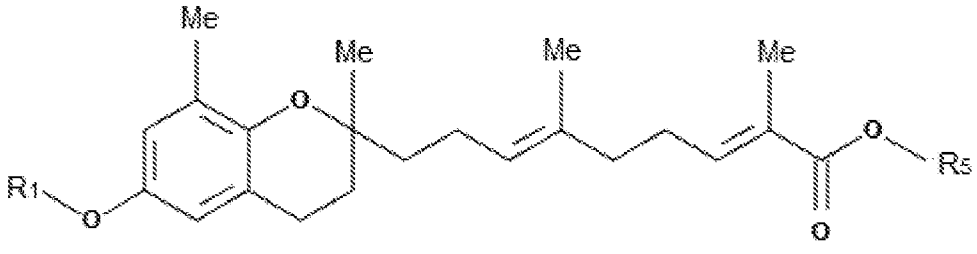
Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de hiperlipoproteinemia.

Otra realización se refiere a un compuesto de fórmula I o una composición farmacéutica que lo comprende, tal como se describe anteriormente, para uso en el tratamiento de disbetalipoproteinemia.

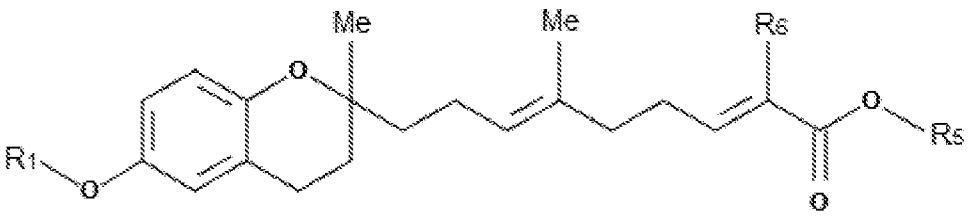
En una realización de la presente invención cuando R_1 es H y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo, y cuando R_1 es metilo y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo.

Una realización del compuesto de fórmula I, o de una composición que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, tal como se describe anteriormente, comprende cualquiera de sus enantiómeros o mezclas de estos, y cualquiera de sus isómeros E/Z y mezclas de ellos, y sus sales farmacéuticamente aceptables. Una realización comprende el enantiómero R. Otra realización comprende el enantiómero S. Una realización comprende el isómero E. Otra realización comprende el isómero Z.

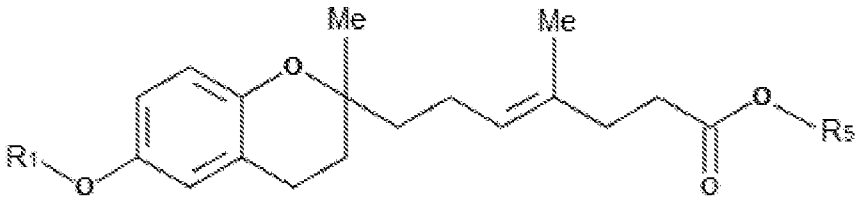
Otra realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en II, III, IV o V:



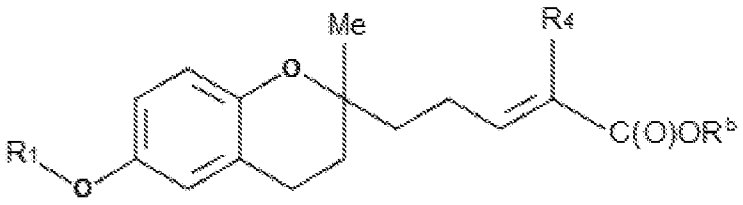
(II),



(III),



(IV), o



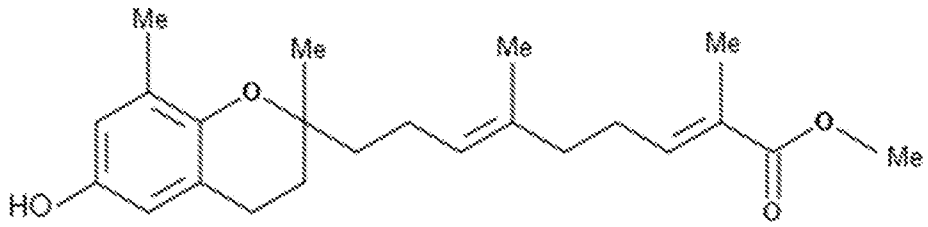
(V),

donde R_1, R_4, R_5, R_6 y R^b se definen tal como se describe anteriormente, o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

Una realización de los compuestos de fórmula II, III, IV o V, o de una composición que comprende uno de dichos compuestos, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, tal como se describe anteriormente, comprende cualquiera de sus enantiómeros o mezclas de estos, y cualquiera de sus isómeros E/Z y mezclas de ellos, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otra realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que se selecciona independientemente entre un compuesto 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13, o una composición farmacéutica que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

El compuesto 5 se refiere al compuesto de fórmula I:



(5)

En una realización los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el enantiómero *R*.

En otra realización los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el enantiómero *S*.

En una realización los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el isómero (*E,Z*).

En otra realización los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el isómero (*E,E*).

En una realización los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el isómero (*Z,Z*).

En otra realización los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 10, 11 y 12, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el isómero (*Z,E*).

En una realización los compuestos 9 y 13, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el isómero *E*.

En otra realización los compuestos 9 y 13, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ, descritos anteriormente, comprenden el isómero *Z*.

Otra realización se refiere al uso de los compuestos de fórmula I en el tratamiento de enfermedades que responden a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

Otra realización se refiere a un método de tratamiento que comprende la administración de una cantidad efectiva de al menos un compuesto de fórmula I, o de una composición farmacéutica que lo comprende, a un paciente de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

Otra realización de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I seleccionado independientemente entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4c, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas duales de PPARα y PPARγ.

En una realización la enfermedad que responde a la administración de agonistas duales de PPARα/γ se selecciona independientemente entre desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

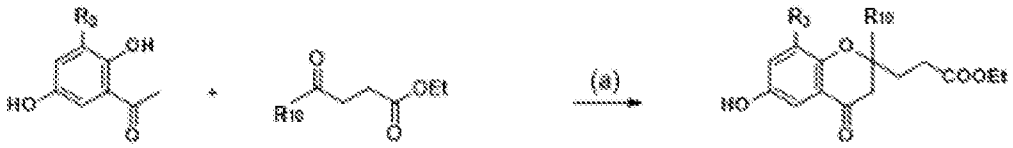
En una realización más preferente las enfermedades neurodegenerativas se seleccionan independientemente entre Parkinson, Alzheimer o la esclerosis lateral amiotrófica (ALS).

Otra realización se refiere a un método de tratamiento que comprende la administración de una cantidad efectiva de al menos un compuesto de fórmula I seleccionado

independientemente entre el grupo que consiste en 1, 2, 3, 4c, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, o de una composición farmacéutica que lo comprende, a un paciente de una enfermedad que responde a la administración de agonistas duales de PPARα y PPARγ.

Una realización de la invención se refiere al procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula I, tal como se describen anteriormente, donde dicho procedimiento comprende:

(a) condensar una 2,5-dihidroxiacetofenona y un alquilcetoéster para obtener una benzopiran-4-ona de fórmula A;



2,5-dihidroxiacetofenona Alquilcetoéster Benzopiran-4-ona (A)

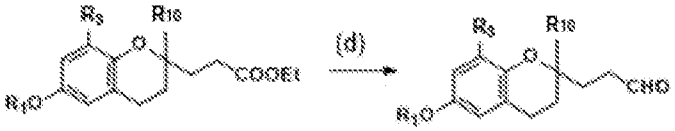
(b) reducir el grupo cetónico de la benzopiran-4-ona obtenida en el paso (a);

(c) proteger el grupo fenol de la benzopiran-4-ona para obtener un éster benzopirano de fórmula (B);



Benzopiran-4-ona (A) Éster benzopirano (B)

(d) reducir el grupo éster con reactivos adecuados para obtener un aldehído;



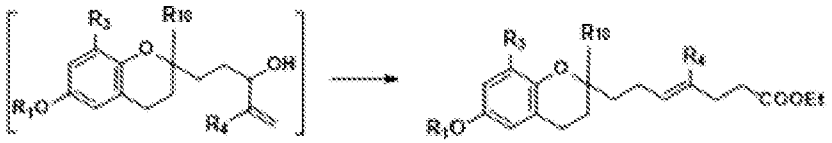
Éster benzopirano (B) Aldehído (C)

(e) hacer reaccionar el grupo aldehído (C), obtenido en (d), con un reactivo de Grignard para obtener un alcohol alílico;



Aldehído (C)

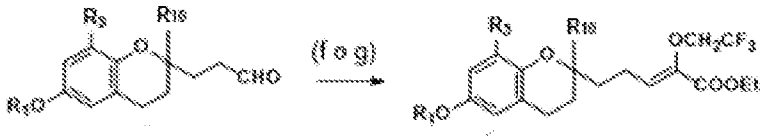
y someter dicho alcohol alílico a las condiciones de transposición de Johnson-Claisen obteniendo un éster benzopirano (D);



Éster benzopirano (D)

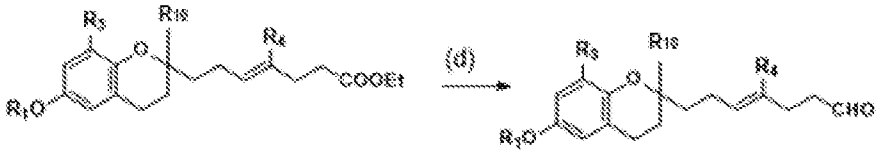
donde opcionalmente,

- el aldehído (C) obtenido en el paso (d) se somete a:
  - (f) condiciones de olefinación de Horner-Wadsworth-Emmons utilizando un fosfonato que comprende un radical -CH(COOR^b)R$_4$, o
  - (g) condiciones de olefinación de Wittig utilizando un iluro de fósforo que comprende un radical -C(COOR^b)R$_4$;



Aldehído (C)

- o donde una vez realizado el paso (e), el éster benzopirano (D) obtenido se somete al paso (d):



Éster benzopirano (D) Aldehído (E)

para obtener un nuevo aldehído (E); y donde se somete dicho nuevo aldehído (E) a

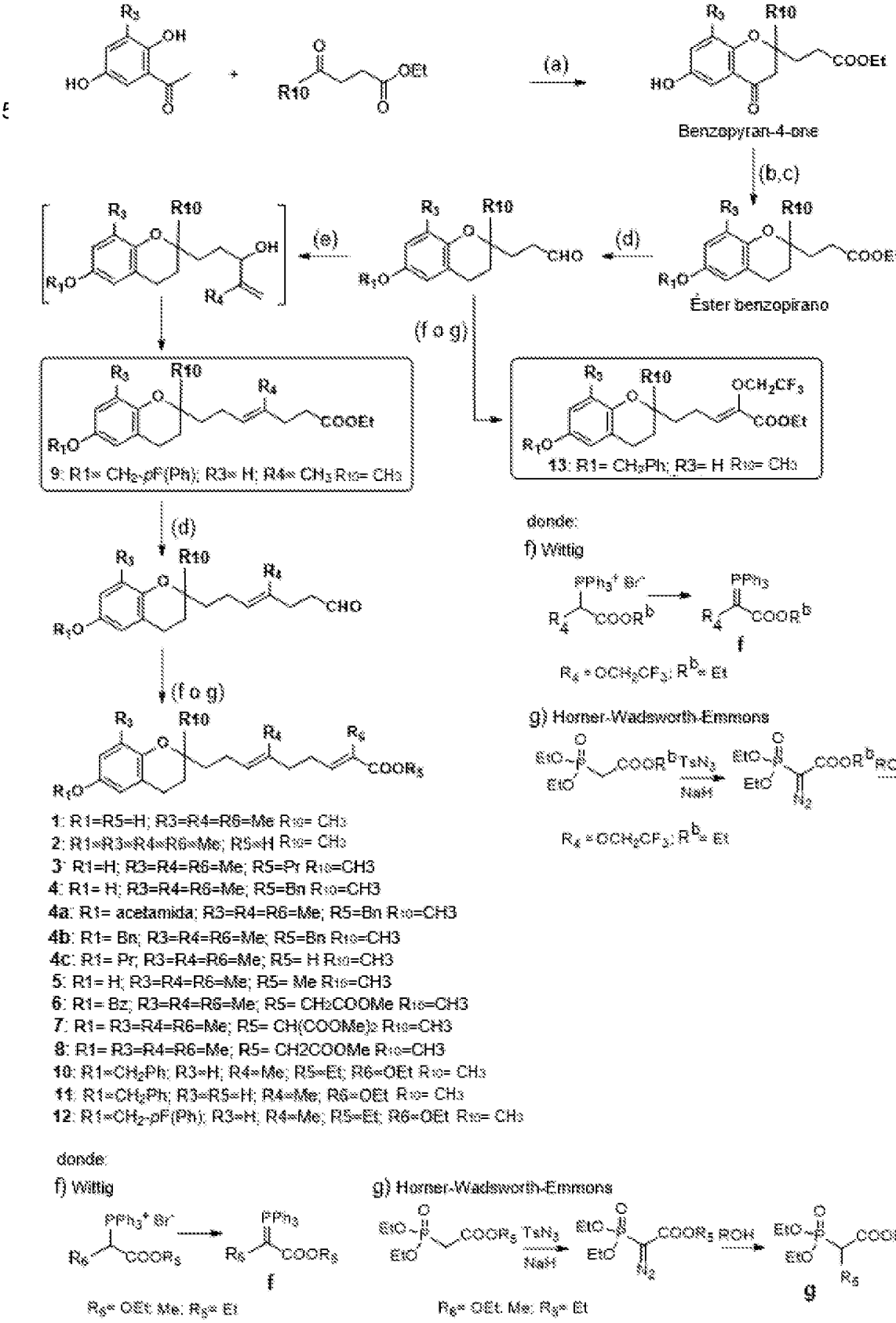
- (f)- condiciones de olefinación de Horner-Wadsworth- Emmons utilizando un fosfonato que comprende un radical -CH(COOR$_5$)R$_6$, o
- (g) condiciones de olefinación de Wittig utilizando un iluro de fosforo que comprende un radical -C(COOR$_5$)R$_6$;

y donde, opcionalmente, se desprotege posteriormente el grupo fenol, y/o el grupo carboxílico en el compuesto resultante del paso (f) o (g);

y donde R_1, R_3, R_4, R_5, R_6, R_{10} y R^b se definen tal como se describe anteriormente en las realizaciones descritas en esta invención.

Mediante dicho procedimiento de síntesis se obtienen los compuestos 1, 2, 3, 4, 4a, 4b, 4c, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 descritos anteriormente.

Dicho procedimiento de síntesis de los compuestos de fórmula I se puede esquematizar de la siguiente manera:



1: R1=R5=H; R3=R4=R6=Me R10= CH3
2: R1=R3=R4=R6=Me; R5=H R10= CH3
3: R1=H; R3=R4=R6=Me; R5=Pr R10=CH3
4: R1= H; R3=R4=R6=Me; R5=Bn R10=CH3
4a: R1= acetamida; R3=R4=R6=Me; R5=Bn R10=CH3
4b: R1= Bn; R3=R4=R6=Me; R5=Bn R10=CH3
4c: R1= Pr; R3=R4=R6=Me; R5= H R10=CH3
5: R1= H; R3=R4=R6=Me; R5= Me R10=CH3
6: R1= Bz; R3=R4=R6=Me; R5= CH2COOMe R10=CH3
7: R1= R3=R4=R6=Me; R5= CH(COOMe)2 R10=CH3
8: R1= R3=R4=R6=Me; R5= CH2COOMe R10=CH3
10: R1=CH2Ph; R3=H; R4=Me; R5=Et; R6=OEt R10= CH3
11: R1=CH2Ph; R3=R5=H; R4=Me; R6=OEt R10= CH3
12: R1=CH2-pF(Ph); R3=H; R4=Me; R5=Et; R6=OEt R10= CH3

donde:

f) Wittig

f

R6= OEt, Me; Rb= Et

g) Horner-Wadsworth-Emmons

g

R6= OEt, Me; Rb= Et

Reactivos y condiciones: (a) pirrolidina, EtOH, 45ºC, 24 h; (b) Zn, HCl-AcOH (2:1, v/v), temp amb, 1 h; (c) R_1X donde X es un halógeno, K_2CO_3, EtOH, reflujo, 4 h; (d) 1M DIBAL-H (hidruro de diisobutilalumino) en THF, -78 ºC, 20 min; (e) 1) R_4-MgBr, - 78 ºC, 3 h; 2) $MeC(OR6)_3$, ácido isobutírico (2 gotas), 140ºC, 2 h; (f) (g) tBuOK o NaH, THF, 0ºC a temp amb, 16h.

La formación del núcleo cromano se ha realizado, por tanto, mediante (a) condensación de 2,5-dihidroxi acetofenona y alquilcetoéster, dando lugar a benzopyran-4-ona (Kabbe *et al.*, 1982). A continuación, (b) se redujo el grupo carbonilo mediante reducción de Clemmensen, y (c) se protegió el grupo fenol. La elongación de la cadena lateral se realizó (d) mediante reducción del éster etílico formando el correspondiente aldehído. El compuesto **13** se obtiene sometiendo dicho aldehído obtenido en el paso (d), a una olefinacion mediante reacción de Wittig (f) o de Horner-Wadsworth-Emmons (g) (Bisceglia *et al.*, 2012 y Toshima *et al.*, 2001).

Para la obtención del compuesto **9**, (e) se trató el aldehído obtenido en el paso (d), en primer lugar, con un reactivo de Grignard generando un alcohol alílico que se sometió a las condiciones de transposición de Johnson-Claisen (Sen *et al.*, 1990) para finalmente obtener el éster del compuesto **9**. Los compuestos **1-8** y **10-12** se obtienen mediante una segunda elongación de la cadena lateral utilizando nuevamente las condiciones del paso (d) anteriormente descrito para realizar la reducción del grupo éster del compuesto 9 formando el correspondiente aldehído, donde dicho aldehído se somete a una olefinación mediante reacción de Wittig (f) o de Horner-Wadsworth-Emmons (g).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto en la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT de policerasoidol (1), policerasoidin (2), compuesto 8, WY-14643 y rosiglitazona. En neutrófilos humanos (**Fig. 1A**) y HUVEC (**Fig. 1B**). Datos representados como media ± SEM de n=5 experimentos independientes. *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo vehículo.

Figura 2. Efecto en la viabilidad celular mediante ensayo de MTT del análogo sintetizado 9. En neutrófilos humanos (**A**) y HUVEC (**B**). Datos representados como media ± SEM de n=5 experimentos independientes. *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo vehículo.

Figura 3. Efecto de policerasoidol (1), policerasoidin (2), compuesto 8, WY-14643 y rosiglitazona, en la viabilidad celular mediante citometría de flujo. Porcentaje de neutrófilos apoptóticos (**Fig. 3A**), supervivencia (**Fig. 3B**), apoptosis (**Fig. 3C**) y supervivencia en HUVEC (**Fig. 3D**) después de 24 h de incubación con los compuestos **1**, **2**, **8**, WY-14643 y rosiglitazona. Las células apoptóticas se cuantificaron como porcentaje de la población total de anexinas V^+/PI^- apoptóticas tardías y/o necróticas como anexina V^+/PI^+, y células no apoptóticas viables como anexina V^-/PI^-. Las columnas son la media ± SEM de n= 3

experimentos independientes. Se han incluido los paneles representativos de citometría de flujo (**Fig. 3E**) que muestran los efectos del vehículo y compuestos **1**, **2**, **8**, WY-14643 y rosiglitazona sobre la apoptosis/supervivencia de neutrófilos. *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo vehículo.

Figura 4. Efecto en la viabilidad celular del compuesto 9 mediante citometría de flujo. Porcentaje de apoptosis de neutrófilos (**Fig. 4A**), supervivencia (**Fig. 4B**), apoptosis de HUVEC (**Fig. 4C**) y supervivencia (**Fig. 4D**) después de 24 h de incubación. Las células apoptóticas se cuantificaron como porcentaje de la población total anexina V^+/PI^-, apoptóticas tardías y/o necróticas como anexina V^+/PI^+, y células no apoptóticas viables como anexina V^-/PI^-. Las columnas son la media ± SEM de n=3 experimentos independientes. Se han incluido los paneles representativos de citometría de flujo (**Fig. 4E**) que muestran los efectos del vehículo y del compuesto **9** sobre la apoptosis/supervivencia de neutrófilos. *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo vehículo.

Figura 5. Policerasoidol (1) inhibe la adhesión de células mononucleares a HUVEC inducida por TNFα en condiciones de flujo fisiológico. Las células se pretrataron durante 20 h con 1 μM de policerasoidol (1), policerasoidin (2), compuesto 8, WY-14643 o rosiglitazona, previamente a la estimulación con TNFα (20 ng/mL, 24 h). Neutrófilos humanos recién aislados o células mononucleares se perfundieron sobre monocapas endoteliales durante 5 min a 0,5 dinas/cm^2 y se cuantificó la adhesión de neutrófilos (**Fig. 5A**) y células mononucleares (**Fig. 5B**). Las curvas dosis-respuesta se realizaron para policerasoidol (1) y rosiglitazona con HUVEC estimuladas con TNFα (20 ng/mL, 24 h) y perfusión de células mononucleares humanas recién aisladas (**Fig. 5C**). Los resultados son la media ± SEM de 4-6 experimentos independientes. **p <0,01 relativo al grupo vehículo y $^{\dagger\dagger}p < 0,01$ relativo a células estimuladas con TNFα.

Figura 6. El compuesto 9 inhibe la adhesión de células mononucleares a HUVEC inducida por TNFα en condiciones de flujo fisiológico. Algunas células se pretrataron durante 20 h con 3, 30 o 100 μM de compuesto **9**, previamente a la estimulación con TNFα (20 ng/mL, 24 h). Neutrófilos humanos recién aislados o células mononucleares se perfundieron sobre monocapas endoteliales durante 5 min a 0,5 dinas/cm^2 y se cuantificó la adhesión de neutrófilos (**Fig. 6A**) y células mononucleares **(Fig. 6B**). Las curvas concentración-respuesta (0,1-100 μM) se realizaron para compuesto **9** con HUVEC estimuladas con TNFα (20 ng/mL, 24 h) y perfusión de células mononucleares humanas recién aisladas (**Fig. 6C**). Los resultados son la media ± SEM de 4-6 experimentos independientes. **p< 0,01 relativo al grupo vehículo y $^{++}p< 0,01$ relativo a células estimuladas con TNFα.

Figura 7. Las células endoteliales se transfectaron con siRNA de control o siRNA específico de RXRα, PPARα o PPAR. 48 h después de la transfección, la expresión proteica de RXRα (**Fig. 7A**), PPARα (**Fig. 7B**) o PPARγ (**Fig. 7C**) se determinó por Western blot. Los resultados

(media ± SEM de n=4 experimentos independientes) se expresan en relación con β-actina. También se muestran las imágenes de los geles representativos. **p <0,01 con respecto a los valores en el respectivo grupo de control de siRNA.

Figura 8. El silenciamiento de PPARγ o RXRα por siRNA detiene el efecto inhibitorio de policerasoidol (1) en las interacciones entre células endoteliales-leucocitos mononucleares inducidas por TNFα. HUVEC se transfectaron con el control, siRNA específico de RXRα, PPARα o PPARγ. 48h después de la transfección, las células se pretrataron con policerasoidol (10 μM) o rosiglitazona (1 μM) durante 20h y entonces se estimularon con TNFα (20 ng/mL, 4h). Se cuantificó la adhesión celular mononuclear. Los resultados son la media ± SEM de 3-4 experimentos independientes. *p <0,05 o **p <0,01 relativo a grupo vehículo respectivo, †p <0,05 o ††p <0,01 relativo a las células estimuladas con TNFα respectivas (**Fig. 8A, 8B, 8C**). La interacción RXRα/PPARγ se midió por immunoprecipitación de PPARγ seguido de Western blot para RXRα. Las películas de quimioluminiscencia se cuantificaron por análisis de imagen. El blot representa un n=3 de experimentos independientes (**Fig. 8D**).

Figura 9. La interacción RXRα/PPARγ del compuesto 9 se midió por inmunoprecipitación de PPARγ seguido de Western blot para RXRα. Las películas de quimioluminiscencia se cuantificaron por análisis de imagen. El blot representa un n=3 de experimentos independientes.

Figura 10. Policerasoidol (1) inhibe la expresión en HUVEC de ICAM-1, VCAM-1 y CX_3CL1 inducida por TNFα. Algunas células se pretrataron con policerasoidol (10 μM) 20 h, antes de la estimulación con TNFα (20 ng/mL, 24 h para ICAM-1, VCAM-1 y CX_3CL1). Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de ICAM-1 (**Fig. 10A**), VCAM-1 (**Fig. 10B**) y CX_3CL1 (**Fig. 10C**). Los resultados (media ± SEM) se expresaron como una media de la intensidad de fluorescencia de n=3-6 experimentos independientes. La expresión de ICAM-1, VCAM-1, y CX_3CL1 también se visualizó en HUVEC no permeabilizadas mediante inmunofluorescencia, utilizando alexa-fluor 488 (verde) (**Fig. 10E**). Los núcleos se contrastaron con colorante Hoechst (azul). *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo vehículo, †p <0,05 o ††p <0,01 relativo a células estimuladas con TNFα.

Figura 11. Compuesto 9 inhibe la expresión en HUVEC de VCAM-1, CX_3CL1 y CXCL16 inducida por TNFα, pero no de ICAM-1. Algunas células se pretrataron con el compuesto **9** (3 μM) 20 h, previamente a la estimulación con TNFα (20 ng/mL, 24 h). Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de ICAM-1(**Fig. 11A**), VCAM-1(**Fig. 11B**), CX_3CL1 (**Fig. 11C**) y CXCL16 (**Fig. 11D**). Los resultados (media ± SEM) se expresaron como una media de la intensidad de fluorescencia de n=3-6 experimentos independientes. La expresión de ICAM-1, VCAM-1, CX_3CL1 y CXCL16 también se visualizó en HUVEC no permeabilizadas mediante inmunofluorescencia, utilizando alexa-fluor 488 (verde) (**Fig. 11E**). Los núcleos se

contrastaron con colorante Hoechst (azul). **p <0,01 relativo al grupo vehículo, †p <0,05 o ††p <0,01 relativo a células estimuladas con TNFα.

Figura 12. Policerasoidol (1) inhibe la activación de p38 MAPK y NF-κB (p65) inducida por TNFα en HUVEC. Las células se estimularon durante 1 h con TNFα (20 ng/mL). Algunas células se pretrataron con policerasoidol (10 μM) 20 h antes de la estimulación con TNFα. La activación de p38 MAPK (**Fig. 12A**) y NF-κB (**Fig. 12B**) se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados (media ± SEM) se expresaron como la media de intensidad de fluorescencia de n=3-6 experimentos independientes (**Fig. 12C y 12D**). Se muestran los histogramas representativos. **p <0,01 relativo al grupo vehículo †p <0,05 y ††p <0,01 relativo a células estimuladas con TNFα.

Figura 13. El compuesto 9 inhibe la activación de p38 MAPK y NF-κB (p65) inducida por TNFα en HUVEC. Las células se estimularon durante 1 h con TNFα (20 ng/mL). Algunas células se pretrataron con el compuesto **9** (3 μM) 20 h antes de la estimulación con TNFα. La activación de p38 MAPK (**Fig. 13A**) y NF-κB (**Fig. 13B**) se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados (media ± SEM) se expresaron como la media de intensidad de fluorescencia de n=3-6 experimentos independientes (Fig. 13C y 13D). Se muestran los histogramas representativos. **p <0,01 relativo al grupo vehículo y †p <0,05 relativo a células estimuladas con TNFα.

Figura 14. El compuesto 9 no produce diferencias significativas en ganancia de peso (g) y eficiencia alimenticia en ratones *ob/ob* tras 4 días de tratamiento. Los histogramas muestran la ganancia de peso (**Fig. 14A**) que se expresó como la diferencia de peso entre el día 5 y el día 0 (d_5-d_0), y la eficiencia alimenticia (**Fig. 14B**) que se calculó como el cociente entre el aumento de peso y el alimento consumido. No se observaron diferencias significativas de aumento de peso ni eficiencia en la alimentación entre los ratones tratados con el compuesto **9** y los grupos control. Las columnas representan la media ± SEM de n=5-6 experimentos independientes.

Figura 15. El compuesto 9 y rosiglitazona reducen los valores de glucosa en plasma en ratones *ob/ob* tras 4 días de tratamiento. Se ha representado la variación de glucosa respecto al d_0, que se ha calculado utilizando la siguiente fórmula: $((d_5-d_0)/d_0) \times 100$. Las columnas representan la media ± SEM de n=5-6 experimentos independientes. *p <0,05 relativo al grupo de ratones *ob/ob* tratado con vehículo.

Figura 16. El compuesto 9 no produce diferencias significativas en la ganancia de peso de tejido adiposo blanco (WAT) en ratones *ob/ob* tras 4 días de tratamiento. Las columnas muestran la media ± SEM de n=5-6 experimentos independientes

Figura 17. El compuesto 9 reduce significativamente el área media de los adipocitos de WAT de forma dosis-dependiente en ratones *ob/ob* tras 4 días de tratamiento. Área media de los adipocitos, en μm^2 (**Fig. 17A**), y sus respectivas imágenes representativas (**Fig. 17B**). Las columnas representan la media ± SEM de n=5-6 experimentos independientes. *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo de ratones *ob/ob* tratados con vehículo.

Figura 18. Estudio del efecto antiinflamatorio en tejido adiposo blanco (WAT) en ratones *ob/ob* tras 4 días de tratamiento. Nivel de expresión de ARNm de MCP-1 en WAT (**Fig. 18A**) y Cuantificación de macrófagos $F4/80^+$ en WAT mediante inmunohistoquímica (**Fig. 18B**). El compuesto **9** disminuye la expresión de ARNm de MCP-1 y el número de macrófagos infiltrados en el tejido adiposo blanco (WAT). Las columnas son la media ± SEM de n=5-6 experimentos independientes. *p < 0,05 relativo al grupo de ratones *ob/ob* tratados con vehículo.

Figura 19. El compuesto 9 y WY-14643 aumentan los niveles de colesterol total y HDL-c, y disminuyen los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres en plasma. Valores de colesterol total (**Fig. 19A**), HDL-c (**Fig. 19B**), triglicéridos (**Fig. 19C**) y ácidos grasos libres (**Fig.19D**). Las columnas representan la media ± SEM de n=5-6 **experimentos** independiente. *p <0,05 o **p <0,01 relativo al grupo de ratones *ob/ob* tratados con vehículo.

Figura 20. El compuesto 9 no afectó de forma significativa al peso del hígado ni a los triglicéridos acumulados, en comparación con el grupo control (vehículo). Ganancia de peso del hígado (**Fig. 20A**) y niveles de triglicéridos en hígado (**Fig. 20B**). Las columnas representan la media ± SEM de n=5-6 experimentos independiente. *p <0,05 relativo al grupo de ratones *ob/ob* tratados con vehículo.

Figura 21. El compuesto 9 redujo los niveles circulantes de ALT y AST Niveles de alanina amino transferasa (ALT) y aspártico transaminasa (AST) en plasma de ratones *ob/ob* tras 4 días de tratamiento. Las columnas representan la media ± SEM de n=5-6 experimentos independiente. *p <0,05 relativo al grupo de ratones *ob/ob* tratados con vehículo.

EJEMPLOS

Los ejemplos descritos a continuación tienen carácter ilustrativo y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención. Toda la investigación con muestras humanas de este estudio se ha llevado a cabo cumpliendo los principios de la *Declaración de Helsinki* y con la aprobación del Comité ético institucional del Hospital Clínico de Valencia (Valencia, España).

Ejemplo 1: Obtención de compuestos de fórmula I

Todos los reactivos y disolventes se adquirieron de fuentes comerciales y se usaron directamente. Todas las reacciones sensibles a la humedad se llevaron a cabo en matraces secados en horno, bajo atmósfera de nitrógeno y con disolventes secos. Todas las reacciones se controlaron por CCF analítica con gel de sílice 60 F254 (Merck 5554) con detección UV a 254 nm. Los residuos se purificaron a través de una columna de gel de sílice 60H (5-40 µm, Merck 7736) y por cromatografía ultrarrápida (230-400 µm, Merck 9385). La CCF preparativa se realizó usando placas de gel de sílice de 0,5 mm (Merck). Hewlett-Packard (HP-1100) o TripleTOF5600 (ABSciex) se utilizó para el análisis LC-MS, con la fuente API (ionización de presión atmosférica) configurada como APCI (ionización química a presión atmosférica) o APIES (ionización por electrospray) en modo positivo o negativo. Los espectros de RMN (^{1}H, ^{13}C, COSY 45, DEPT, HSQC y HMBC) se referenciaron para la señal de disolvente $CDCl_3$ en un Bruker AC 300 o AC-500. Las multiplicidades de resonancias de ^{13}C RMN fueron asignadas por experimentos DEPT. Las asignaciones de RMN se apoyaron en experimentos COSY 45, DEPT, HSQC y HMBC.

1.1. Obtención de los compuestos 1 (policerasoidol) y 2 (policerasoidin)

Se aislaron el policerasoidol (**1**) y policerasoidin (**2**) a partir de un extracto metanólico de cortezas de tallos de *Polyalthia cerasoides* y *P. sclerophylla* y se identificaron en base a sus características cromatográficas y espectrales (Gonzalez *et al.*, 1995 y 1996).

1.2. Obtención de los compuestos 3 a 8

Compuesto 3: A una suspensión de policerasoidol (**1**) (80 mg, 0.2 mmol) y K_2CO_3 (80 mg) en acetona (2 mL), se añadió 1-bromopropano $CH_3CH_2CH_2Br$ (20 µL 0.2 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se volvió a disolver en 10 mL de CH_2Cl_2. La fase orgánica se lavó con salmuera (3 x 10 mL) y H_2O (3 x 10 mL), se deshidrató con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a sequedad en el rotavapor. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener el compuesto **3** (50 mg, 63 %). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.49 (d, *J*= 2.6 Hz, H-7), 6.39 (d, *J*= 2.6 Hz, H-5), 5.91 (td, *J*= 1.3, 7.2 Hz, H-7', 5.15 (td, *J*= 0.9, 7.1 Hz, H-3'), 4.11 (t, *J*= 6.6 Hz, 2H, $COOCH_2CH_2CH_3$-9'), 2.68 (t, *J*= 6.6 Hz, 2H, CH_2-4), 2.57 (ddd, *J*= 1.2, 7.5, 15.1 Hz, 2H, CH_2-6'), 2.12 (s, 3H, CH_3-13'), 2.10-2.03 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 1.89 (d, 3H, *J*= 1.6 Hz, CH_3-10'), 1.75 (sex, *J*= 7.3 Hz, 2H, $COOCH_2CH_2CH_3$-9'), 1.86-1.60 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.59 (s, 3H, CH_3-11'), 1.25 (s, 3H, CH_3-12'), 0.97 (t, *J*= 7.3 Hz, 3H, $COOCH_2CH_2CH_3$-9'); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 168.4 ($COOCH_2CH_2CH_3$-9'), 147.9 (C-6), 145.8 (C-8a), 142.8 (CH-7'), 134.3 (C-4'), 127.2 (C-8'), 127.0 (C-8), 124.9 (CH-3'), 121.1 (C-4a), 115.6 (CH-7), 112.6 (CH-5), 75.2 (C-2), 65.8 ($COOCH_2CH_2CH_3$-9'), 39.6 (CH_2-1'), 39.0

(CH_2-5'), 31.3 (CH_2-3), 27.9 (CH_2-6'), 23.9 (CH_3-12'), 22.4 (CH_2-4), 22.1 ($COOCH_2\mathit{CH_2}CH_3$-9'), 22.0 (CH_2-2'), 20.6 (CH_3-10'), 16.0 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'), 10.5 ($COOCH_2CH_2\mathit{CH_3}$-9'); LC-MS (APCI modo positivo) *m/z* 401.1 (100) $[MH]^+$; HREIMS *m/z* 400.263746 $[M]^+$ (400.261360 calcd para $C_{25}H_{36}O_4$).

Compuesto 4: A una suspensión de policerasoidol (**1**) (80 mg, 0.2 mmol) y K_2CO_3 (80 mg) en acetona (2 mL), se añadió cloruro de bencilo $ClCH_2Ph$ (25 µL 0.2 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 4 h. Tras extracción habitual, se purificó el crudo de reacción mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener el compuesto **4** (60 mg, 67 %). ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39–7.29 (m, 5H, $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 6.50 (dd, *J*= 0.4, 2.7 Hz, H-7), 6.40 (dd, *J*= 0.4, 2.7 Hz, H-5), 5.95 (td, *J*= 1.3, 7.2 Hz, H-7'), 5.20 (s, 2H, $COO\mathit{CH_2}$Ph-9'), 5.12 (td, *J*= 1.1, 7.1 Hz, H-3'), 2.70 (td, *J*= 2.5, 6.7 Hz, 2H, CH_2-4), 2.57 (ddd, *J*= 1.3, 7.4, 15.2 Hz, 2H, CH_2-6'), 2.14 (s, 3H, CH_3-13'), 2.12-1.90 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 1.92 (d, 3H, *J*= 1.6 Hz, CH_3-10'), 1.82-1.60 (m, 4H, CH_2-3 y CH_2-1'), 1.56 (s, 3H, CH_3-11'), 1.26 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 167.9 ($\mathit{C}OOCH_2$Ph-9'), 147.8 (C-6), 145.8 (C-8a), 143.6 (CH-7'), 134.1 (C-1'' de $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 134.3 (C-4'), 128.5 (2CH de $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 128.0 (3CH de $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 127.3 (C-8'), 126.7 (C-8), 124.8 (CH-3'), 121.2 (C-4a), 115.6 (CH-7), 112.6 (CH-5), 76.0 (C-2), 66.0 ($COO\mathit{CH_2}$Ph-9'), 39.6 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.3 (CH_2-3), 28.0 (CH_2-6'), 24.0 (CH_3-12'), 22.4 (CH_2-4), 22.1 (CH_2-2'), 20.6 (CH_3-10'), 16.0 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'); LC-MS (APCI modo positivo) *m/z* 472.2 (100) $[MH + Na]^+$; EIMS *m/z* 357 $[M\text{-}CH_2Ph]^+$.

Compuesto 4a: A una suspensión de compuesto **4** (45 mg, 0.1 mmol) y K_2CO_3 (45 mg) en acetonitrilo (5 mL), se añadió 2-cloroacetamida $ClCH_2CONH_2$ (0.1 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 9 h. Tras extracción habitual, se purificó el crudo de reacción mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-**AcOEt**, 90:10) para obtener el compuesto **4a** (25 mg, 50 %). RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38–7.29 (m, 5H, $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 6.60 (d, *J*= 3.0 Hz, H-7), 6.46 (dd, *J*= 3.0 Hz, H-5), 5.93 (td, *J*= 1.3, 7.3 Hz, H-7'), 5.18 (s, 2H, $COO\mathit{CH_2}$Ph-9'), 5.11 (td, *J*= 1.2, 7.3 Hz, H-3'), 4.41 (s, 2H, $O\mathit{CH_2}CONH_2$-6), 2.72 (td, *J*= 2.5, 6.5 Hz, 2H, CH_2-4), 2.56 (ddd, *J*= 1.2, 7.3, 14.8 Hz, 2H, CH_2-6'), 2.16 (s, 3H, CH_3-13'), 2.10-2.04 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 1.92 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, CH_3-10'), 1.81-1.58 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.55 (s, 3H, CH_3-11'), 1.26 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 171.8 ($OCH_2\mathit{C}ONH_2$-6), 167.7 ($\mathit{C}OOCH_2$Ph-9'), 149.8 (C-6), 147.0 (C-8a), 143.5 (CH-7'), 136.2 (C-1'' de $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 134.4 (C-4'), 128.4 (2CH de $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 128.0 (3CH de $COOCH_2\mathit{Ph}$-9'), 126.7 (C-8'), 126.7 (C-8), 124.7 (CH-3'), 121.2 (C-4a), 115.6 (CH-7), 112.0 (CH-5), 75.5 (C-2), 67.9 ($O\mathit{CH_2}CONH_2$-6), 65.9 ($COO\mathit{CH_2}$Ph-9'), 39.6 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.2 (CH_2-3), 28.0 (CH_2-6'), 24.0 (CH_3-12'), 22.6 (CH_2-4), 22.1 (CH_2-2'), 20.6 (CH_3-10'), 16.2 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'); HREIMS *m/z* 505.290785 $[M]^+$ (505.282824 calcd para $C_{31}H_{39}NO_5$).

Compuesto 4b. A una suspensión de compuesto **4** (35 mg, 0.1 mmol) y K_2CO_3 (35 mg) en acetona (5 mL), se añadió cloruro de bencilo $ClCH_2Ph$ (10 µL, 0.1 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 15 h. Tras extracción habitual, se purificó el crudo de reacción mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener el compuesto **4b** (20 mg, 40 %). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.44–7.29 (m, 10H, OCH_2*Ph*-6, $COOCH_2$*Ph*-9'), 6.66 (d, *J*= 3.0 Hz, H-7), 6.54 (dd, *J*= 3.0 Hz, H-5), 5.94 (td, *J*= 1.2, 7.2 Hz, H-7'), 5.19 (s, 2H, $COOCH_2$Ph-9'), 5.12 (td, *J*= 1.2, 7.2 Hz, H-3'), 4.98 (s, 2H, OCH_2Ph-6), 2.73 (td, *J*= 2.8, 6.7 Hz, 2H, CH_2-4), 2.56 (ddd, *J*= 1.2, 7.2, 15.2 Hz, 2H, CH_2-6'), 2.16 (s, 3H, CH_3-13'), 2.11-2.04 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 1.92 (d, 3H, *J*= 1.2 Hz, CH_3-10'), 1.81-1.60 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.56 (s, 3H, CH_3-11'), 1.27 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 167.0 (*C*$OOCH_2$Ph-9'), 151.4 (C-6), 146.2 (C-8a), 143.5 (CH-7'), 137.6 y 136.2 (2C, C-1'' de OCH_2*Ph*-6, C-1''' de $COOCH_2$*Ph*-9'), 134.3 (C-4'), 128.5-127.5 (10CH, OCH_2*Ph*-6, $COOCH_2$*Ph*-9'), 127.2 (C-8'), 126.7 (C-8), 124.9 (CH-3'), 120.9 (C-4a), 115.7 (CH-7), 112.2 (CH-5), 75.3 (C-2), 70.5 (OCH_2Ph-6), 65.9 ($COOCH_2$Ph-9'), 39.7 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.4 (CH_2-3), 28.0 (CH_2-6'), 24.0 (CH_3-12'), 22.6 (CH_2-4), 22.1 (CH_2-2'), 20.6 (CH_3-10'), 16.2 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'); EIMS *m/z* 538 $[M]^+$ (70), 447 $[M\text{-}CH_2Ph]^+$, 356 (10) $[M\text{-}2 \times CH_2Ph]^+$, 91 (100).

Compuesto 4c. A una suspensión de compuesto **4** (70 mg, 0.2 mmol) y K_2CO_3 (70 mg) en acetona (5 mL), se añadió 1-bromopropano $CH_3CH_2CH_2Br$ (20 µL, 0.2 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 10 h. Tras extracción habitual, el crudo de reacción con el grupo fenol protegido, se disolvió en 10 mL de una mezcla EtOH-KOH al 20% (v/v) y se mantuvo a reflujo durante 10 h. Posteriormente, la mezcla de reacción se acidificó con HCl 1N, se concentró a sequedad y se redisolvió en 10 mL de CH_2Cl_2. Tras extracción habitual, el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener **4c** (34 mg, 43 %). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.58 (d, *J*= 2.9 Hz, H-7), 6.45 (d, *J*= 2.9 Hz, H-5), 6.06 (td, *J*= 1.3, 7.3 Hz, H-7'), 5.16 (td, *J*= 0.9, 6.6 Hz, H-3'), 3.83 (t, *J*= 6.6 Hz, 2H, $OCH_2CH_2CH_3$-6), 2.72 (t, *J*= 6.8 Hz, 2H, CH_2-4), 2.62 (dd, *J*= 7.5, 14.4 Hz, 2H, CH_2-6'), 2.15 (s, 3H, CH_3-13'), 2.11-2.05 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 1.90 (d, 3H, J= 1.5 Hz, CH_3-10'), 1.79-1.72 (m, 6H, $OCH_2CH_2CH_3$-6, CH_2-3 y CH_2-1'), 1.60 (s, 3H, CH_3-11'), 1.26 (s, 3H, CH_3-12'), 1.01 (t, *J*= 6.6 Hz, 3H, $OCH_2CH_2CH_3$-6); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 173.0 (*C*OOH-9'), 151.6 (C-6), 146.3 (C-8a), 145.9 (CH-7'), 134.2 (C-4'), 127.1 (C-8'), 126.1 (C-8), 125.1 (CH-3'), 120.9 (C-4a), 115.4 (CH-7), 111.8 (CH-5), 75.2 (C-2), 70.0 ($OCH_2CH_2CH_3$-6), 39.7 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.4 (CH_2-3), 28.1 (CH_2-6'), 24.0 (CH_3-12'), 22.7 (CH_2-4), 22.6 ($OCH_2CH_2CH_3$-6), 22.1 (CH_2-2'), 20.5 (CH_3-10'), 16.2 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'), 22.6 ($OCH_2CH_2CH_3$-6); LC-MS (APCI modo positivo) *m/z* 424.2 (100) $[MH + Na]^+$.

Compuesto 5. A una disolución de policerasoidol (**1**) (10 mg, 0.03 mmol) en metanol (5 mL) se le añadió gota a gota HCl conc (1.5 mL) a 0ºC. La mezcla se agitó a reflujo 7 h. Tras extracción habitual, el crudo de reacción se purificó mediante CCF de sílica gel preparativa

(hexano-AcOEt, 90:10) para obtener **5** (6 mg, 54 %). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.48 (d, *J*= 2.9 Hz, H-7), 6.38 (d, *J*= 2.9 Hz, H-5), 5.94 (td, *J*= 1.2, 7.4 Hz, H-7'), 5.16 (td, *J*= 1.2, 7.4 Hz, H-3'), 3.73 (s, 3H, COO*CH*$_3$-9'), 2.80-2.57 (m, 4H, CH_2-4, CH_2-6'), 2.35-2.00 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 2.12 (s, 3H, CH_3-13'), 1.90-1.82 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.90 (d, 3H, *J*= 1.3 Hz, CH_3-10'), 1.58 (s, 3H, CH_3-11'), 1.25 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.1 (*C*OOCH$_3$-9'), 147.3 (C-6), 146.0 (C-8a), 144.8 (CH-7'), 134.2 (C-4'), 127.2 (C-8'), 127.1 (C-8), 124.9 (CH-3'), 121.1 (C-4a), 115.5 (CH-7), 112.5 (CH-5), 75.1 (C-2), 51.1 (COO*CH*$_3$-9'), 39.5 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.3 (CH_2-3), 27.9 (CH_2-6'), 23.9 (CH_3-12'), 22.3 (CH_2-4), 22.0 (CH_2-2'), 20.5 (CH_3-10'), 16.0 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'); HREIMS *m/z* 372.236641 $[M]^+$ (372.230060 calcd para $C_{23}H_{32}O_4$).

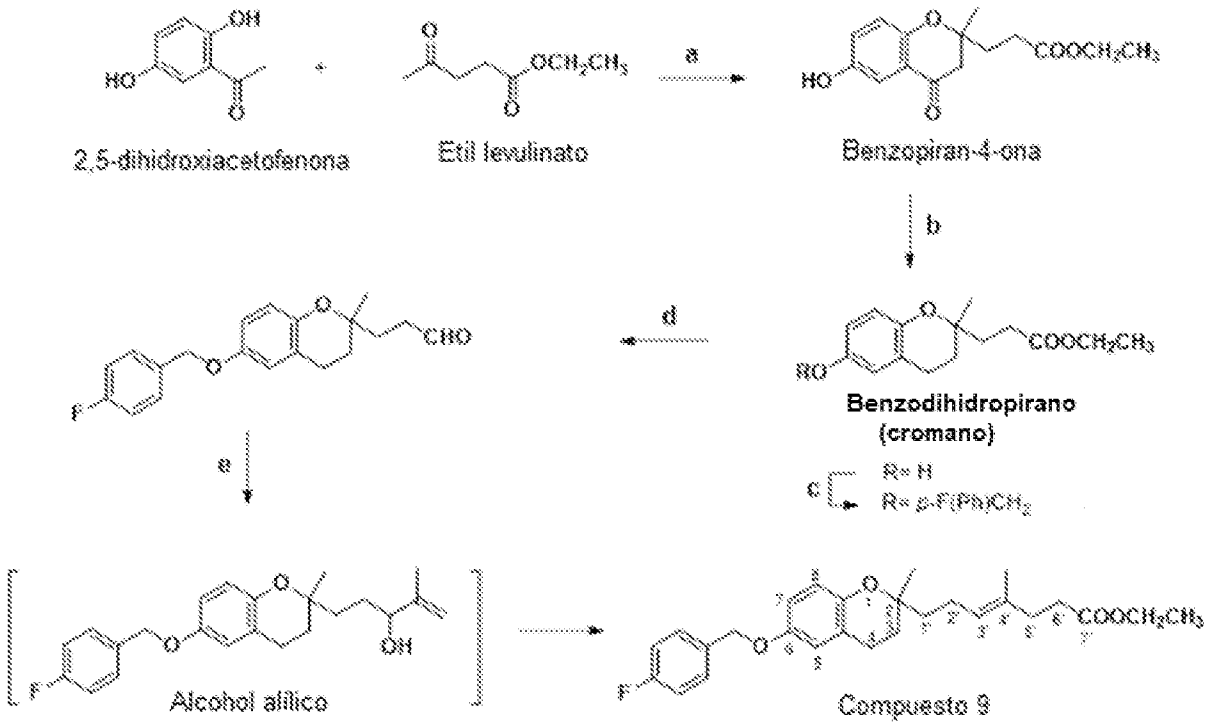
Compuesto 6. A una suspensión de policerasoidol (**1**) (100 mg, 0.3 mmol) y K_2CO_3 (100 mg) en acetona (5 mL), se añadió cloruro de benzoilo PhCOCl (25 µL, 0.2 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 2 h. Transcurrido este tiempo se añadió metil bromoacetato $BrCH_2COOCH_3$ (20 µL, 0.2 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 15 h. Tras extracción habitual, el crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener el compuesto **6** (55 mg, 35 %). RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (dd, 2H, *J*= 1.5, 7.7 Hz, H-2'' y H-6'' de OCO*Ph*-6), 7.62 (td, *J*= 1.5, 7.7 Hz, H-4'' de OCO*Ph*-6), 7.50 (td, 2H, *J*= 1.5, 7.7 Hz, H-3'' y H-5'' de OCO*Ph*-6), 6.80 (dd, *J*= 0.8, 2.8 Hz, H-7), 6.75 (dd, *J*= 0.8, 2.8 Hz, H-5), 6.02 (td, *J*= 1.2, 7.2 Hz, H-7'), 5.17 (td, *J*= 1.2, 7.2 Hz, H-3'), 4.69 (s, 2H, COO*CH*$_2$COOCH$_3$-9'), 3.77 (s, 3H, COOCH$_2$COO*CH*$_3$-9'), 2.77 (m, 2H, CH_2-4), 2.61 (m, 2H, CH_2-6'), 2.18 (s, 3H, CH_3-13'), 2.15-2.06 (m, 4H, CH_2-2', CH_2-5'), 1.94 (d, 3H, *J*= 1.6 Hz, CH_3-10'), 1.80-1.62 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.57 (s, 3H, CH_3-11'), 1.30 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ 170.0-165.0 (3C, O*C*OPh-6 y *C*OOCH$_2$*C*OOCH$_3$-9'), 149.5 (C-6), 145.0 (CH-7'), 142.7 (C-8a), 134.4 (C-1'' de OCO*Ph*-6), 134.2 (C-4'), 130.1-128.5 (5CH, de OCO*Ph*-6), 127.4 (C-8'), 125.9 (C-8), 124.9 (CH-3'), 121. 2 (CH-7), 120.9 (C-4a), 119.2 (CH-5), 75.9 (C-2), 60.4 (COO*CH*$_2$COOCH$_3$-9'), 52.2 (COOCH$_2$COO*CH*$_3$-9'), 39.8 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.0 (CH_2-3), 28.0 (CH_2-6'), 24.1 (CH_3-12'), 22.4 (CH_2-4), 22.1 (CH_2-2'), 20.5 (CH_3-10'), 16.1 (CH_3-13'), 15.7 (CH_3-11'); HREIMS *m/z* 534.267390 $[M]^+$ (534.261754 calcd para $C_{32}H_{38}O_7$).

Compuesto 7. A una suspensión de policerasoidin (**2**) (20 mg, 0.05 mmol) y K_2CO_3 (20 mg) en acetona (5 mL), se añadió dimetil bromomalonato $BrCH(COOCH_3)_2$ (5 µL, 0.05 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se añadió metil bromoacetato $BrCH_2COOCH_3$ (20 µL, 0.2 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 15 h. Tras extracción habitual, el crudo de reacción se purificó mediante CCF preparative (hexano-AcOEt, 80:20) para obtener el compuesto **7** (17 mg, 67 %). RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.56 (d, *J*= 2.8 Hz, H-7), 6.44 (d, *J*= 2.8 Hz, H-5), 6.08 (td, *J*= 1.3, 7.2 Hz, H-7'), 5.62 (s, COO*CH*(COOCH$_3$)$_2$-9'), 5.16 (t, *J*= 6.6 Hz, H-3'), 3.83 (s, 6H, COOCH(COO*CH*$_3$)$_2$-9'), 3.73 (s, 3H, COO*CH*$_3$-6), 2.75-

2.71 (m, 2H, CH_2-4), 2.66-2.59 (m, 2H, CH_2-6'), 2.18-2.05 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 2.15 (s, 3H, CH_3-13'), 1.96 (d, 3H, *J*= 1.3 Hz, CH_3-10'), 1.90-1.73 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.59 (s, 3H, CH_3-11'), 1.26 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 169.0-167.2 (3C, *C*OOCH(*C*OOCH_3)$_2$-9'), 151.5 (C-6), 145.4 (C-8a), 144.4 (CH-7'), 133.7 (C-4'), 126.6 (C-8'), 126.1 (COO*C*H(COOCH_3)$_2$-9'), 125.3 (C-8), 124.4 (CH-3'), 121.0 (C-4a), 115.0 (CH-7), 111.0 (CH-5), 75.4 (C-2), 56.1 (O*C*H_3-6), 52.1 (2C, COOCH(COO*C*H_3)$_2$-9'), 40.0 (CH_2-1'), 39.0 (CH_2-5'), 31.3 (CH_2-3), 28.3 (CH_2-6'), 24.1 (CH_3-12'), 23.3 (CH_2-4), 22.2 (CH_2-2'), 20.3 (CH_3-10'), 16.3 (CH_3-13'), 16.0 (CH_3-11'); HREIMS *m/z* 502.263390 $[M]^+$ (502.256669 calcd para $C_{28}H_{38}O_8$).

Compuesto 8. A una suspensión de policerasoidin (**2**) (20 mg, 0.05 mmol) y K_2CO_3 (20 mg) en acetona (5 mL), se añadió metil bromoacetato $BrCH_2COOCH_3$ (5 µL, 0.05 mmol) y la mezcla se agitó a reflujo durante 6 h. Tras extracción habitual, el crudo de reacción se purificó mediante CCF de sílica gel preparativa (hexano-AcOEt, 80:20) para obtener el compuesto **8** (15 mg, 67 %). RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.56 (d, *J*= 2.7 Hz, H-7), 6.44 (d, *J*= 2.7 Hz, H-5), 6.00 (td, *J*= 1.5, 7.2 Hz, H-7'), 5.15 (td, *J*= 1.5, 7.2 Hz, H-3'), 4.68 (s, 2H, COO*C*H_2COOCH_3-9'), 3.76 (s, 3H, $COOCH_2COOCH_3$-9'), 3.73 (s, 3H, COO*C*H_3-6), 2.73 (t, 2H, *J*= 7.0 Hz, CH_2-4), 2.59 (dd, 2H, *J*= 7.2, 14.8 Hz, CH_2-6'), 2.15 (s, 3H, CH_3-13'), 2.10-2.04 (m, 4H, CH_2-2' y CH_2-5'), 1.93 (d, 3H, *J*= 1.4 Hz, CH_3-10'), 1.79-1.56 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.59 (s, 3H, CH_3-11'), 1.26 (s, 3H, CH_3-12'); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 168.8 y 167.4 (2C, *C*OOCH$_2$*C*OOCH$_3$-9'), 152.5 (C-6), 146.4 (C-8a), 145.4 (CH-7'), 134.7 (C-4'), 127.6 (C-8'), 126.3 (C-8), 125.4 (CH-3'), 121.3 (C-4a), 115.2 (CH-7), 111.4 (CH-5), 75.7 (C-2), 60.8 (COO*C*H_2COOCH$_3$-9'), 56.0 (O*C*H_3-6), 52.6 ($COOCH_2COOCH_3$-9'), 40.1 (CH_2-1'), 39.4 (CH_2-5'), 31.8 (CH_2-3), 28.4 (CH_2-6'), 24.4 (CH_3-12'), 23.1 (CH_2-4), 22.6 (CH_2-2'), 20.9 (CH_3-10'), 16.6 (CH_3-13'), 16.1 (CH_3-11'); HREIMS *m/z* 444.252007 $[M]^+$ (444.251189 calcd para $C_{26}H_{36}O_6$).

1.3. Síntesis del compuesto 9:



(a) Síntesis de benzopiran-4-ona: 2,5-dihidroxiacetofenona (0.5 g, 3.28 mmol), etil levulinato (0.46 mL, 3.28 mmol) y pirrolidina (0.87 mL, 9.86 mmol), se disolvieron en EtOH absoluto (10 mL) con tamiz molecular de 3-Å (100 mg).[6] La mezcla se agitó a 45ºC durante 24 h bajo atmósfera de N_2. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró, y el filtrado se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con HCl 1N (3 x 50 mL), H_2O (3 x 50 mL) y sal muera (3 x 50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó en el rotavapor. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 70:30) para obtener la benzopiran-4-ona (729 mg, 2.62 mmol, 80%) como un aceite amarillo. RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.34 (d, *J*= 3.0 Hz, H-5), 7.07 (dd, *J*= 8.9, 3.0 Hz, H-7), 6.80 (d, *J*= 8.9 Hz, H-8), 4.14 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H, $COOC\underline{H_2}CH_3$), 2.78 (d, *J*= 16.7 Hz, 1H, CH_{2a}-3), 2.63 (d, *J*= 16.7 Hz, 1H, CH_{2b}-3), 2.53-2.46 (m, 2H, CH_2-2'), 2.1 (m, 2H, CH_2-1'), 1.38 (s, 3H, CH_3-4'), 1.25 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, $COOCH_2C\underline{H_3}$); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 193.0 (C-4), 173.3 ($\underline{CO}OCH_2CH_3$-3'), 153.7 (C-8a), 150.2 (C-6), 125.2 (CH-7), 120.1 (C-4a), 119.5 (CH-8), 110.6 (CH-5), 79.8 (C-2), 60.8 ($COO\underline{C}H_2CH_3$), 47.2 (CH_2-3), 34.1 (CH_2-1'), 28.7 (CH_2-2'), 23.3 (CH_3-4'), 14.1 ($COOCH_2\underline{C}H_3$); EIMS *m/z* 278 [M: $C_{15}H_{18}O_5$]$^+$ (35), 233 (25), 177 (100), 137 (75); HREIMS (%) *m/z* 278.11408 [M]$^+$ (278.11542 calcd para $C_{15}H_{18}O_5$).

(b) Reducción del grupo cetona: Se disolvió el benzopiran-4-ona (0.4 g, 1.44 mmol) en una mezcla de AcOH-H_2O (2:1, v/v) (14 mL). Entonces, se añadió poco a poco Zn en polvo (1.69 g, 25.92 mmol) y HClconc (9 mL) durante 30 min y la mezcla se agitó durante 1 h a temperatura

ambiente. Se añadió H_2O (15 mL) a la mezcla de reacción y se filtró y el filtrado se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó en el rotavapor. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 85:15) para obtener el éster de benzopirano (220.3 mg, 0.834 mmol, 58%) como un aceite incoloro. RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 6.55 (m, 3H, H-5, H-7, H-8), 4.12 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H, $COOC\underline{H_2}CH_3$), 2.70 (m, 2H, CH_2-4), 2.44 (t, *J*= 7.7 Hz, 2H, H-2'), 2.05-1.70 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.23 (s, 3H, CH_3-2), 1.24 (t, *J*= 7.1 Hz, 3H, $COOCH_2C\underline{H_3}$); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 174.1 ($\underline{CO}OCH_2CH_3$-3'), 148.8 (C-6), 147.4 (C-8a), 121.6 (CH-7), 117.8 (CH-8), 115.4 (C-4a), 114.6 (CH-5), 74.6 (C-2), 60.5 ($COO\underline{CH_2}CH_3$), 34.3 (CH_2-3), 31.1 (CH_2-1'), 28.8 (CH_2-2'), 34.3 (CH_2-3), 23.7 (CH_3-2), 22.1 (CH_2-4), 14.1 ($COOCH_2\underline{CH_3}$); EIMS *m/z* 264 [M: $C_{15}H_{20}O_4]^+$ (100), 218 (50), 163 (35), 123 (55). HREIMS (%) *m/z* 264.13562 $[M]^+$ (264.13616 calcd para $C_{15}H_{20}O_4$) (100).

(c) *O*-protección del éster de benzopirano: Una suspensión de éster de benzopirano (0.5 g, 1.89 mmol), cloruro de *p*-flurobencilo *p*F(Ph)CH_2Cl (0.3 mL, 2.46 mmol), K_2CO_3 anhidro (0.4 g, 2.83 mmol) en EtOH absoluto (20 mL) se agitó a 65ºC bajo atmósfera de N_2 durante 4 h. La mezcla de reacción se evaporó en el rotavapor, se añadió H_2O (3 x 20 mL) y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con HCl 1M (2 x 15 mL) y salmuera (2 x 15 mL), deshidrataron con Na_2SO_4 anhidro y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener el éster de benzopirano *O*-protegido (556 mg, 1.49 mmol, 79%) como un aceite incoloro. RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7.05 (m, 2H, H-3'', H-5''), 6.70 (m, 3H, H-5, H-7, H-8), 4.94 (s, 2H, *p*-F-PhC$\underline{H_2}$O), 4.13 (q, *J*= 7.1 Hz, 2H, $CO_2C\underline{H_2}CH_3$), 2.76 (t, 2H, *J*= 6.7 Hz, CH_2-4), 2.48 (t, *J*= 7.7 Hz, 2H, CH_2-2'), 1.91 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.24 (t, *J*= 7.2 Hz, 3H, $CO_2CH_2C\underline{H_3}$-3'); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 173.6 ($\underline{CO}OCH_2CH_3$-3'), 162.3 (d, J_{CF}=243.7 Hz, C-4''), 152.0 (C-6), 147.9 (C-8a), 133.1 (d, J_{CF}= 3 Hz, C-1''), 129.1 (d, 2C, J_{CF}= 8.3 Hz, C-2'', C-6''), 121.4 (C-4a), 117.7 (CH-5), 115.2 (d, 2C, J_{CF}= 24.8 Hz, CH-3'', CH-5''), 115.1 y 114.4 (CH-7 y CH-8), 74.6 (C-2), 69.9 (*p*-F-PhC$\underline{H_2}$O), 60.3 ($CO_2\underline{C}H_2CH_3$), 34.3 (CH_2-1'), 31.0 (CH_2-3), 28.7 (CH_2-2'), 23.6 (CH_3-2), 22.2 (CH_2-4), 14.1 ($CO_2CH_2\underline{C}H_3$); HREIMS *m/z* (%) 372.1730 $[M]^+$ (372.173688 calcd para $C_{22}H_{25}O_4F$) (83).

(d) Reducción del éster de benzopirano *O*-protegido Una disolución de éster de benzopirano *O*-protegido (0.2 g, 0.54 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (6 mL) a -78ºC bajo atmósfera de N_2 se agitó durante 15 min. A esta disolución se le añadió gota a gota una disolución de hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) 1M en THF (2.47 mL, 2.47 mmol). Transcurridos 20 min, se detuvo la reacción mediante adición de MeOH (1 mL) y se agitó durante 15 min, y entonces se añadió una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (1 mL). La mezcla se agitó durante 1 h a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se extrajo con AcOEt (3 x 15 mL). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó a presión

reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 90:10) para obtener el aldehído (128 mg, 0.34 mmol, 63%) como un aceite incoloro. RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.78 (t, *J*= 1.6 Hz, 1H, CHO), 7.39 (m, 2H, H-2'' y H-6''), 7.06 (m, 2H, H-3'' y H-5''), 6.73 (m, 3H, H-5, H-7, H-8), 4.94 (s, 2H, O$C\underline{H_2}$Ph-p-F), 2.75 (m, 2H, CH_2-4), 2.60 (m, 2H, CH_2-2'), 1.90 (m, 4H, CH_2-3, CH_2-1'), 1.30 (s, 3H, CH_3-2); RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ 202 (CHO), 162.4 (d, J_{CF}=244.4 Hz, C-4''), 152.1 (C-6), 147.7 (C-8a), 133.1 (d, J_{CF}= 3.3 Hz, C-1''), 129.3 and 129.2 (d, 2C, J_{CF}= 8.3 Hz, C-2'', C-6''), 121.4 (C-4a), 117.7 (CH-5), 115.2 (d, 2C, J_{CF}= 24.8 Hz, CH-3'', CH-5''), 115.2 y 114.5 (CH-7 y CH-8), 74.6 (C-2), 69.9 (O$\underline{C}H_2$Ph-p-F), 38.4 (CH_2-2'), 31.8 (CH_2-1'), 31.2 (CH_2-3), 23.7 (CH_3-2), 22.3(CH_2-4); HREIMS *m/z* (%) 329.1552 $[M]^+$ (329.1547 calcd para $C_{20}H_{21}O_3F$), 343.1710 (343.1704 calcd para $C_{21}H_{23}O_3F$).

(e) Reacción de Grignard y transposición de Johnson-Claisen: Una disolución del intermedio aldehído (0.2 g, 0.61 mmol) en THF anhidro (5 mL) se agitó a -78ºC bajo atmósfera de N_2 durante 15 min, y entonces se trató con una solución de bromuro de isopropenilmagnesio 0.5 M (7.32 mL, 3.66 mmol) (Sen *et al.*, 1990).[7] La mezcla se agitó a -78ºC durante 3 h. La mezcla de reacción se trató con una solución de NH_4Cl saturada y se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. Se añadió H_2O y se extrajo con con AcOEt (3 x 15 mL). Se combinaron las fases orgánicas y la fase orgánica resultante se lavó con H_2O (3 x 15 mL) y sal muera (3 x 15 mL), se deshidrató con Na_2SO_4 anhidro y se concentró en el rotavapor.

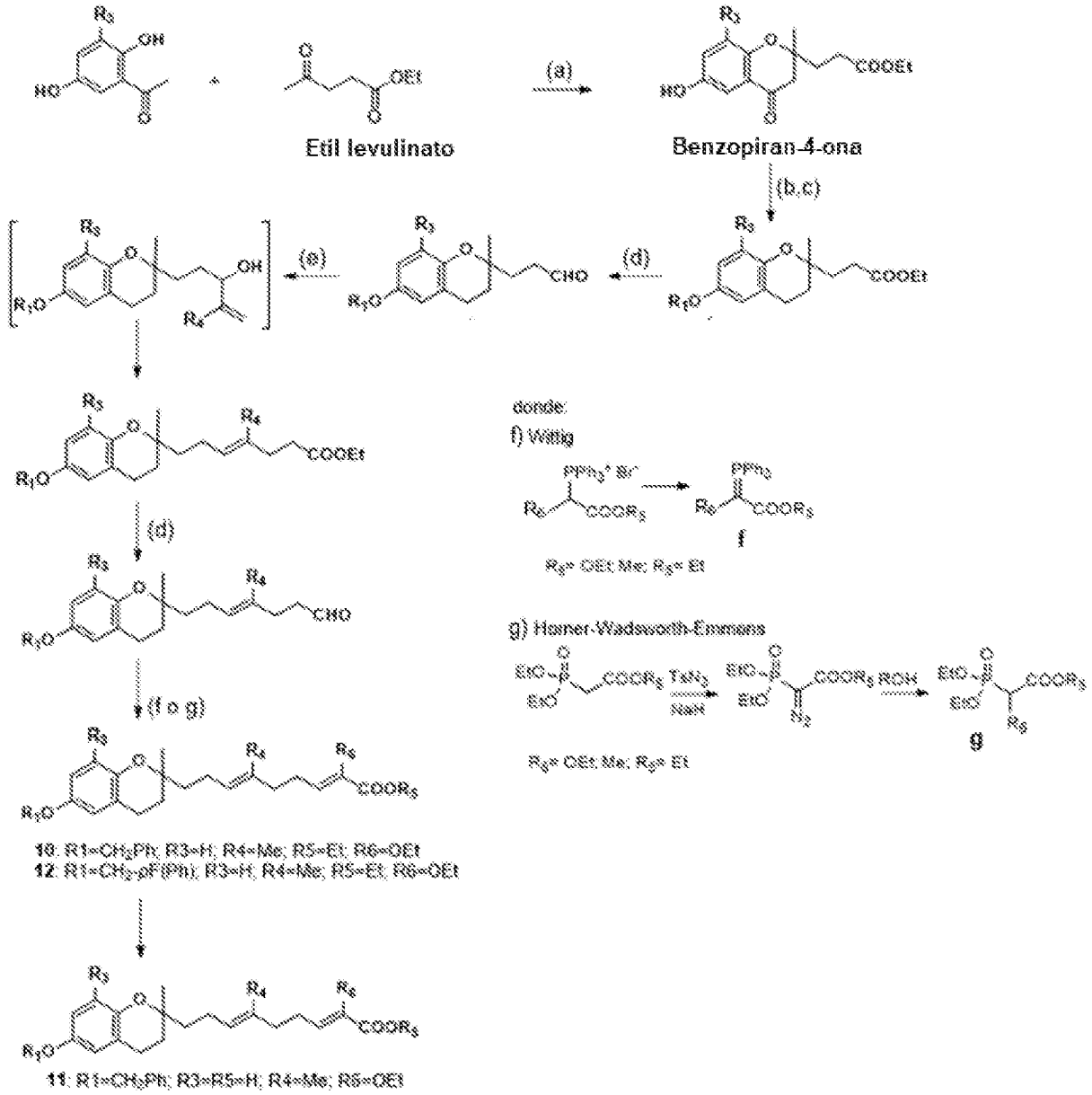
El residuo obtenido (250 mg) se utilizó en la siguiente reacción sin purificar. El residuo se trató con 10 mL de trietil ortoacetato y cantidades catalíticas de ácido isobutírico (3 gotas) (Sen *et al.*, 1990).[7] La mezcla se agitó a 140ºC durante 2 h. Después de enfriar, la mezcla se concentró en el rotavapor para eliminar el exceso de trietilortoacetato. El residuo se diluyó con CH_2Cl_2 (20 mL) y se lavó con H_2O (3 x 15 mL), se deshidrató con Na_2SO_4 anhidro y se concentró en el rotavapor. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de sílica gel (hexano/AcOEt, 98:2) para obtener 126 mg de compuesto **9** (0.29 mmol, 47 %). RMN ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39 (m, 2H, H-2'' y H-6''), 7.06 (m, 2H, H-3'' y H-5''), 6.73 (m, 3H, H-5, H-7, H-8), 5.14 (t, *J*= 7.0 Hz, 1H, CH-3'), 4.94 (s, 2H, O$C\underline{H_2}$Ph-p-F), 4.11 (q, *J*= 7.4 Hz, 2H, COO$C\underline{H_2}CH_3$), 2.72 (t, *J*= 6.8, 2H, CH_2-4), 2.39 (m, 2H, CH_2-6'), 2.28 (m, 2H, CH_2-5'), 2.08 (m, 2H, CH_2-2'), 1.82 (m, 2H, CH_2-3), 1.67 (m, 6H, CH_2-1'), 1.60 (s, 3H, CH_3-4'), 1.27 (s, 3H, CH_3-2), 1.23 (t, *J*= 7.3 Hz, 3H, $COOCH_2C\underline{H_3}$); RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) δ 173.4 (CO), 162.4 (d, J_{CF}=245 Hz, C-4''), 151.9 (C-6), 148.2 (C-8a), 133.5 (C-4'), 133.3 (d, J_{CF}= 3 Hz, C-1''), 129.2 (d, 2C, J_{CF}= 8.3 Hz, C-2'', C-6''), 124.9 (C-3'), 121.7 (C-4a), 117.8 (CH-5), 115.3 (d, 2C, J_{CF}= 24.8 Hz, CH-3'', CH-5''), 115.2 y 114.4 (CH-7 y CH-8), 75.6 (C-2), 70.1 (O$\underline{C}H_2$Ph-p-F), 60.2 (COO$\underline{C}H_2CH_3$), 39.2 (CH_2-1'), 34.6 (CH_2-6'), 33.2 (CH_2-5'), 30.9 (CH_2-3), 24.1 (CH_3-2), 22.4 (CH_2-4), 22.2 (CH_2-2'), 15.8 (CH_3-4'), 14.2 ($COOCH_2\underline{C}H_3$); HREIMS *m/z (%)* 441.2441 $[M]^+$ (441.2436 calcd para $C_{27}H_{33}FO_4$).

1.4. Síntesis de los compuestos 10 a 12:

Se procede a realizar los pasos (a), (b), (c), (d) y (e) tal como se describen en la sección 1.3 para el compuesto 9, si bien, la O-protección del éster de benzopirano se realiza en el caso de los compuestos 10 y 11 con cloruro de bencilo (R_1= bencilo) y en el caso del compuesto 12 con cloruro de *p*-flurobencilo (R_1= *p*-FluoroBn).

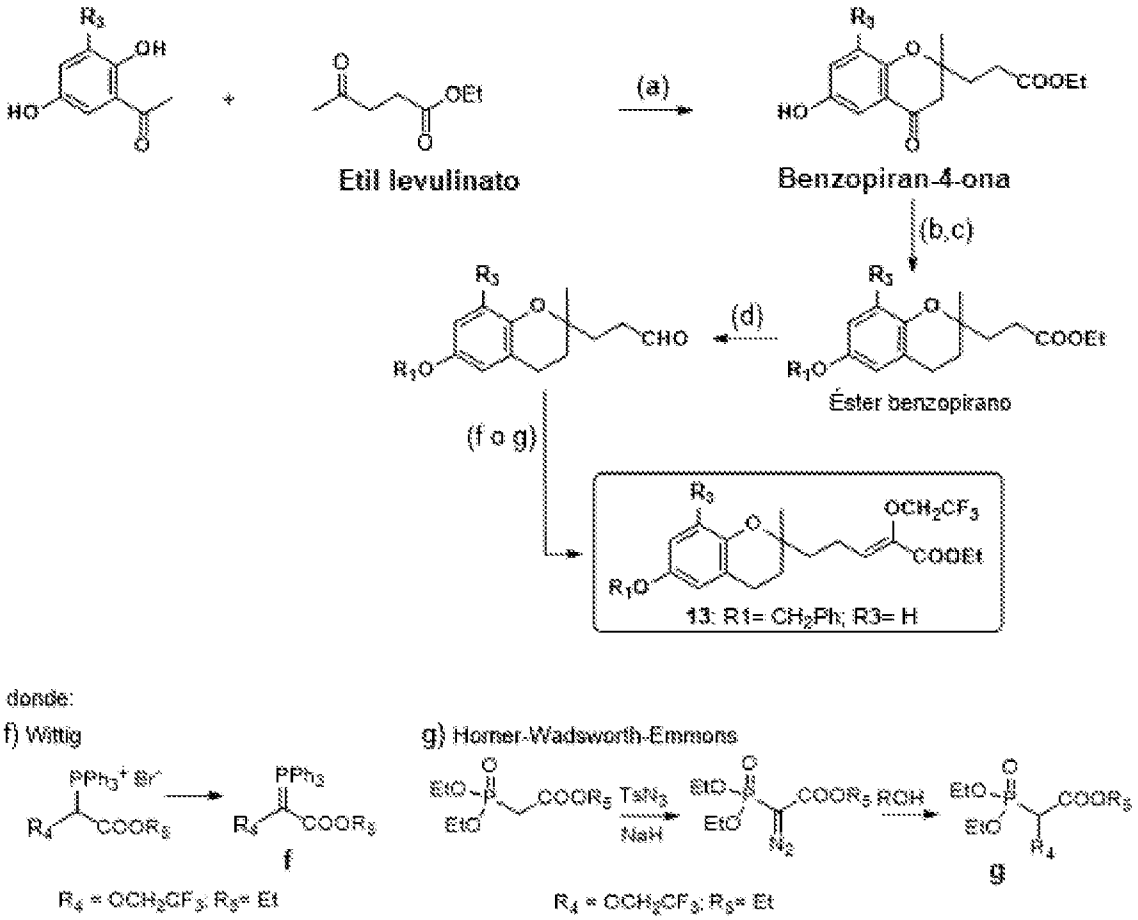
Una vez realizado el paso (e), se vuelve a realizar una reducción del grupo éster, obtenido mediante transposición de Johnson-Claisen, para volver a obtener un aldehído, de acuerdo con las condiciones descritas en el paso (d) de la sección 1.3.

Los compuestos 10 y 12 se obtienen mediante olefinación del aldehído obtenido llevando a cabo la reacción de Wittig con un iluro de fósforo $(Ph)_3P=C(CH_2CH_3)(COOCH_2CH_3)$ o la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons con un fosfonato $(EtO)_2P(O)$-$CH(CH_2CH_3)(COOCH_2CH_3)$. El compuesto 11 se obtiene por hidrólisis del grupo éster, mediante tratamiento con KOH a reflujo del compuesto 10.



1.5. Síntesis del compuesto 13:

Se procede a realizar los pasos (a), (b), (c) y (d) tal como se describen en la sección 1.3, en donde la O-protección del éster de benzopirano se realiza con cloruro de bencilo. El aldehído obtenido tras el paso (d) se somete a olefinación llevando a cabo la reacción de Wittig con un iluro de fósforo $(Ph)_3P=C(CH_2CF_3)(COOCH_2CH_3)$ o la reacción de Horner-Wadsworth-Emmons con un fosfonato $(EtO)_2P(O)\text{-}CH(CH_2CF_3)(COOCH_2CH_3)$.



Estudios *in vitro*

Ejemplo 2: Evaluación de la transactivación hPPARα y hPPARγ

Los compuestos naturales **1** y **2**, los compuestos **3-8** y el compuesto (**9**), se estudiaron *in vitro* mediante ensayos de transactivación PPARα/γ. Se utilizó un ensayo de transcripción en células Cos-7 transitoriamente transfectadas con un plásmido reportero de luciferasa en presencia de vectores de expresión pGAL4hPPARα y pGAL4hPPARγ (Carmona *et al.*, 2007). Las células Cos-7 se obtuvieron de la ATCC (CRL-1651). Las células se mantuvieron bajo condiciones de cultivo estándar (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) a 37°C en una atmósfera de humedad al 5% CO_2. El medio se cambiaba cada 2 días. Las células Cos-7 se sembraron en discos de 60 mm a una densidad de 5,5 x 10^5 células/disco en DMEM suplementado con 10% de FCS e incubado a 37°C durante 16 h antes de la transfección. Las células fueron transfectadas en DMEM, usando jetPEI, con reportador (pG5-TK-pGL3) y plásmidos de expresión (pGal4-h, hPPARα o hPPARγ). El plásmido de expresión pCMV-β-galactosidasa se co-transfectó como control para la eficiencia de la transfección. Después de 16 h se detuvo la transfección adicionando DMEM suplementado con 10% FCS, y las células

se tripsinizaron y sembraron en placas de 96-pocillos e incubaron durante 6 h en DMEM conteniendo 10% FCS. Posteriormente, las células se incubaron durante 24 h en DMEM conteniendo 0,2% FCS y se ensayaron concentraciones crecientes de los compuestos o del vehículo (DMSO, concentración máxima 0,1%). Finalmente, las células se lavaron una vez con PBS enfriado sobre hielo, se lisaron y se realizaron los ensayos de luciferasa y β-galactosidasa.

Para evaluar los compuestos sobre la actividad transcripcional PPAR, los ensayos se llevaron a cabo en una quimera de un sistema de gen reportero de luciferasa PPAR/Gal4 humano para determinar la respuesta de transactivación máxima de cada compuesto. Los distintos compuestos se ensayaron en un rango de concentraciones de 0,001 a 10 μM. Los resultados obtenidos de todos los compuestos se compararon con los datos de los compuestos de referencia WY-14643 y rosiglitazona en hPPARα y hPPARγ, respectivamente.

Los resultados se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1	**hPPARα**		**hPPARγ**	
Compuesto	**CE_{50} (nM)**	**Eficacia (%)**	**CE_{50} (nM)**	**Eficacia (%)**
Rosiglitazona	10000	15	4	100
WY-14643	10000	100	NA	NA
Policerasoidol, 1	184	107	84	95
Policerasoidin, 2	1000	82	1000	55
3	10000	100	991	86
4a	10000	18	10000	0
4b	10000	28	10000	0
4c salt	10000	191	1692	88
5	10000	27	574	35
6	10000	14	10000	0
7	1616	76	10000	37
8	10000	39	12	24
9	300	251	400	57
10	10000	60	2000	183
11	1500	96	300	62
12	10000	113	2000	183
13	10000	166	400	39

([a]) Máxima actividad obtenida con cada compuesto expresada como porcentaje de actividad máxima de WY-14643 para PPARα (CE_{50} 12 μM) y rosiglitazona para PPARγ (CE_{50} 4 nM) respectivamente. (NA: no activo sobre el hPPAR ensayado).

De entre todos los compuestos ensayados, el producto natural policerasoidol (**1**) mostró la mayor actividad agonista dual PPARα/γ y su respuesta máxima resultó comparable a la obtenida por los compuestos de referencia (WY-14643 y rosiglitazona). Los datos de CE_{50} mostraron que el compuesto natural **1**, y su derivado semisintético **3**, con el grupo fenólico libre, presentan actividad agonista total sobre hPPARα y hPPARγ, y elevados porcentajes de transactivación (107-100% y 95-86% para hPPARα y hPPARγ, respectivamente). El compuesto **4c**, el derivado *O*-propilado con una función carboxílica libre en C-9', mostraba el máximo porcentaje de transactivación (191% y 88% para hPPARα y hPPARγ, respectivamente). Los otros derivados de policerasoidol (**4a**, **4b** y **5**) mostraron porcentajes de transactivación más bajos que los compuestos **1**, **3** y **4c** a las concentraciones ensayadas. Las modificaciones sobre el grupo carboxílico en C-9' de la cadena lateral en posición 2, introduciendo el grupo $COOCH(COOCH_3)_2$ daba lugar al compuesto **7** con selectividad sobre la activación PPARα (76% para hPPARα y 37% para hPPARγ). Sin embargo, el derivado **8**, con un grupo $COOCH_2COOCH_3$ en C-9', mostró una menor activación PPARα (39% para hPPARα y 24% para hPPARγ). El compuesto **9** también mostró una actividad agonista dual y un porcentaje de transactivación elevado (251% para hPPARα y 57% para hPPARγ, respectivamente).

Los compuestos **10**, **11**, **12** y **13** también mostraron actividad agonista dual PPARα y PPARγ, destacando la potencia del compuesto 11, con porcentajes de transactivación del 96% y 62% para hPPARα y hPPARγ respectivamente.

Cabe destacar que el compuesto **1** (natural) y **9** (sintético) mostraron una potente acción agonista dual de los receptores PPARα y PPARγ. El compuesto **2** presentó una actividad dual PPARα/γ moderada y el compuesto **8** desplazaba su selectividad hacia la activación de PPARγ (**Tabla 1**).

<u>Ejemplo 3: Estudios de citotoxicidad en neutrófilos humanos y células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC)</u>

Anteriormente se ha mencionado que existen importantes limitaciones en la utilización de agonistas PPAR para su uso en humanos, debido a sus efectos adversos como hepatotoxicidad, cáncer, cardiotoxicidad u otros efectos cardiovasculares. Los glitazares son los compuestos más estudiados con actividad agonista PPARγ, sin embargo, como hemos mencionado en la introducción, únicamente está aprobado el uso de los agonistas duales saroglitazar (Lipaglyn™) en la India desde 2013 y lobeglitazona en Corea (Duvie™) con efectos antidiabéticos e hipolipemiantes. En la actualidad, existe un mayor interés en desarrollar agonistas duales PPARα y PPARγ que muestren menos efectos adversos que los ligandos selectivos α o γ (Tan *et al.*, 2017).

Con la finalidad de evaluar los posibles efectos adversos (citotoxicidad) de los compuestos de la invención, los compuestos **1**, **2** y **8** así como los compuestos de referencia, se evaluaron a concentraciones de 30 y 100 µM en neutrófilos humanos (**Fig. 1A**) y cultivos celulares primarios de células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) (**Fig. 1B**) mediante dos técnicas distintas: el ensayo de colorimetría de MTT y el análisis de citometría de flujo de apoptosis celular y supervivencia. Además, el compuesto sintetizado **9** se evaluó a 10, 30 y 100 µM (**Fig. 2**).

Ensayo de MTT. La viabilidad de neutrófilos y HUVEC se determinó mediante el ensayo de colorimetría de MTT (bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Se obtuvieron neutrófilos a partir de la fracción leucoplaquetaria (*buffy coats*) de donantes sanos mediante centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque.

Las células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) se aislaron mediante el tratamiento de colagenasa y mantenidas en medio basal endotelial específico humano (EBM-2) suplementado con medio de crecimiento endotelial (EGM-2) y 10% FCS. Se cultivaron células de pase 1 hasta confluencia en placas de 24-pocillos. Antes de iniciar cada experimento, las células se incubaron 24 h en medio conteniendo 1% FBS.

Se añadieron 100 µL de neutrófilos y la suspensión de HUVEC en medio RPMI suplementado (2×10^5 células/mL) a cada pocillo de una placa de 96-pocillos. Las células se incubaron en ausencia y/o presencia de los compuestos a 37ºC durante 24h. Se preparó una disolución de MTT (2 mg/mL en PBS). Se añadieron 100 µL de la disolución de MTT a cada pocillo y se incubó a 37°C durante otras 3 h. Los sobrenadantes se descartaron y se añadieron 200 µL de DMSO a cada pocillo para disolver el precipitado de formazán. Se midieron las densidades ópticas a dos longitudes de onda (560 y 630 nm) en un espectrofotómetro (Infinite M200, Tecan, Mannedorf, Suiza).

Todos los compuestos mostraron una citotoxicidad significativa a 100 µM sobre ambos tipos de células (**Figuras 1 y 2**). Policerasoidin (**2**) y el derivado **8** también presentaron toxicidad a 30 µM en neutrófilos y HUVEC, y WY-14643 produjo citotoxicidad a 30 µM (9%) pero solo en neutrófilos humanos (**Fig. 1**). El compuesto sintetizado **9**, mostró únicamente citotoxicidad en HUVEC a 30 µM (**Fig. 2**) pero del 12% respecto al vehículo.

Además, la tasa de apoptosis y supervivencia en neutrófilos humanos y HUVEC se determinó mediante doble tinción con anexina V y yoduro de propidio (PI) mediante citometría de flujo.

Análisis de citofluorometría de apoptosis y supervivencia. Se utilizó el kit FITC Annexin V Apoptosis Detección (BD Bioscience, San Jose, CA). El protocolo de tinción y todos los reactivos se suministraron en el kit comercial. Las HUVEC se separaron de los frascos de

cultivo mediante acutasa (StemPro® Accutase® Cell dissociation reagent, Thermofischer Scientific Waltham, MA). Ambos tipos celulares se incubaron a 37ºC durante 24h en presencia o ausencia de los compuestos a ensayar. HUVEC confluentes y neutrófilos recién aislados se lavaron, resuspendieron en binding buffer 1x (1 x 10^6 cells/mL) y se tiñeron con anexina V conjugada con FITC y yoduro de propidio (PI), tal y como se describe en las instrucciones del fabricante. Las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSVerse Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) y se diferenciaron como células de apoptosis temprana (anexina V^+ y PI^-), apoptosis tardía y/o necrótica (anexina V^+ y PI^+), y células vivas (anexina V^- y PI^-).

En neutrófilos, solo el compuesto **8** y rosiglitazona a la dosis de 100 µM causó un efecto mínimo en la supervivencia celular (5,3% y 8,5% respectivamente) (**Figura 3B)**. El compuesto de síntesis **9** también provocó un efecto mínimo en la supervivencia de neutrófilos a las dosis de 30 y 100 µM (1,07% y 1,55%, respectivamente), en comparación con el vehículo (**Figura 4B**). Por el contrario, todos los compuestos aumentaron la apoptosis de forma significativa y disminuyeron la supervivencia a partir de 30 µM en células HUVEC, con excepción de policerasoidol (**1**) (**Figura 3C** y **D**) y el compuesto **9** (**Figura 4C** y **D**). En HUVEC, los compuestos más tóxicos fueron policerasoidin (**2**), su análogo **8** y rosiglitazona, que disminuyeron la supervivencia celular un 38,9, 61,3 y 79,2%, respectivamente, a 100 µM y ejercieron algunos efectos significativos a 30 µM (**Figura 3C** y **D**). Cabe destacar la ausencia de toxicidad del compuesto **9** en HUVEC a las dosis ensayadas, incluida a 100 µM, en comparación con el vehículo (**Figura 4 C** y **D**).

En la introducción hemos mencionado el uso limitado en humanos de numerosos agonistas PPARα y PPARγ debido a problemas de toxicidad que conlleva a importantes efectos adversos. De hecho, a pesar de que rosiglitazona ejerce numerosos efectos beneficiosos en pacientes con diabetes tipo 2, las evidencias de sus efectos adversos cardiovasculares que incluyen aumento del riesgo de infarto de miocardio e insuficiencia cardiaca, ha obligado la retirada del fármaco en numerosos países de la Comunidad Europea (Palee *et al.*, 2011). Así pues, los estudios de toxicidad son importantes en este tipo de compuestos y mediante los ensayos de MTT y citometría de flujo hemos demostrado que los compuestos **1** y **9** son menos citotóxicos que los agonistas específicos de referencia para PPARα y PPARγ.

Ejemplo 4: Efecto de los compuestos 1, 2, 8 y 9 sobre la interacción leucocito-endotelio inducida por TNFα bajo condiciones de flujo

El endotelio que recubre internamente los vasos sanguíneos presenta diversas funciones, cuyas alteraciones ("disfunción endotelial") se han visto relacionadas con enfermedades cardiovasculares, tromboembolismo y aterosclerosis. De hecho, la disfunción endotelial es una de las primeras manifestaciones del inicio de aterosclerosis que conlleva a un fenotipo

proinflamatorio y protrombótico del endotelio, provocando la liberación y migración de leucocitos al espacio subendotelial. Los PPAR, en particular PPARα y PPARγ, se expresan en la mayoría de las células vasculares, incluyendo endoteliales y células del músculo liso, donde participan en efectos antiinflamatorios específicos y el control lípidico (Rosenson *et al.*, 2012).[12] Los agonistas PPARγ (rosiglitazona) son capaces de inhibir el proceso inflamatorio, disminuyendo la acumulación de neutrófilos y células mononucleares (Palee *et al.*, 2011).

Se utilizó la técnica de cámara de flujo paralelo que permite visualizar la adhesión celular bajo condiciones dinámicas de flujo fisiológico.

En la realización de este estudio, los neutrófilos y las células mononucleares se perfundieron a través de monocapas de HUVEC previamente estimuladas o no con TNFα (20 ng/mL) durante 24 h. Para ello, los neutrófilos y células mononucleares humanas se obtuvieron en suspensión de voluntarios sanos mediante el método Ficoll-Hypaque de centrifugación por gradiente de densidad. Las células recién aisladas (1 x 10^6/mL) se perfundieron a través de la monocapa de células endoteliales (HUVEC) estimuladas o no, con TNFα durante 24 h. En todos los experimentos, se determinaron las interacciones de los leucocitos después de perfundir durante 5 min a 0,5 dinas/cm^2. Las placas de HUVEC se colocaron en la cámara de flujo (GlycoTech, Gaithersburg, MD) y se acopló una cámara colocada sobre un microscopio invertido de contraste de fases (Axio Observer A1 Carl Zeiss microscope, Thornwood, NY) para visualizar la adhesión celular (objetivo 20x y un ocular 10x). Además, las imágenes se grabaron en vídeo para su posterior análisis.

Las HUVEC se pretrataron con policerasoidol (**1**), policerasoidin (**2**), el compuesto (**8**), o el compuesto **9** a dosis de 1, 3, 10, 30 y 100 µM, así como WY-14643 o rosiglitazona a 1 µM, 20 horas antes de la estimulación con TNFα (Sanz *et al.*, 2012).

El TNFα provocó un aumento significativo en la adhesión a las células endoteliales de leucocitos mononucleares y neutrófilos (**Figuras 5 y 6**). Ninguno de los compuestos inhibió significativamente las interacciones HUVEC-neutrófilos a la concentración de 1 µM, sin embargo, cabe destacar que el pretratamiento con policerasoidol (**1**), el análogo sintetizado **9** y rosiglitazona disminuyeron significativamente la adhesión HUVEC-células mononucleares (**Figuras 5 y 6**) de forma concentración-dependiente (**Figuras 5C y 6B**). En este ensayo, policerasoidol (**1**) fue 5 veces menos potente que rosiglitazona, mientras que el compuesto **9** mostró una potencia de aproximadamente 3,6 y 16 veces mayor que rosiglitazona y policerasoidol, respectivamente (valores CI_{50} de 0,30 µM *vs.* 1,1 µM y 4,9 µM, respectivamente). Teniendo en cuenta estos resultados y los estudios de citotoxicidad sobre apoptosis y supervivencia en neutrófilos, podemos decir que policerasoidol (**1**) y el compuesto sintetizado **9**, podrían actuar inhibiendo el reclutamiento de células mononucleares sin comprometer la respuesta inmunitaria de neutrófilos, necesaria para la defensa del huésped.

Por lo tanto, parece que ambos compuestos son candidatos interesantes para una evaluación inmuno-farmacológica adicional, debido a la capacidad de estos compuestos para reducir el reclutamiento de células mononucleares, la potencia como agonistas duales de PPARα/γ y la baja citotoxicidad.

Ejemplo 5: Policerasoidol (1) y el compuesto 9 inhibieron la adhesión celular mononuclear al endotelio, inducida por TNFα vía interacción RXRα/PPARγ

Policerasoidol (**1**) y el compuesto sintetizado **9** son ligandos agonistas duales PPARα/γ y rosiglitazona es un agonista selectivo PPARγ. Para suprimir la expresión PPARα o PPARγ en células endoteliales, hemos aplicado una aproximación de silenciamiento de genes mediante ARN de interferencia (siRNA).

Se transfectaron HUVEC confluentes con ARNsi de RXRα, PPARα, PPARγ específicos (Dharmacon, Lafayette, CO) utilizando RNAiMAX de lipofectamina (Invitrogen, Carslbad, CA) durante 48 h (Sanz *et al.*, 2012).[13] A continuación, las células se trataron durante 20 h con policerasoidol (**1**) a 10 μM o rosiglitazona a 1 μM y luego se estimularon durante 4 h con TNFα (10 ng/mL). Con el fin de confirmar el silenciamiento PPARα, PPARγ y RXRα vía ARNsi, se realizó el análisis mediante Western blot (Sanz *et al.*, 2012).[13] Después de silenciar, se lavaron las células, se rasparon, se recogieron y se centrifugaron a 15.000 g a 4ºC durante 30 min para obtener el extracto total de proteína. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. Las muestras se desnaturalizaron, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con BSA-PBS al 5% con Tween 20 al 0,05% y se incubaron con el anticuerpo correspondiente. Los anticuerpos policlonales de conejo frente a RXRα y PPARγ (H-100) y el anticuerpo monoclonal de ratón frente a PPARα fueron adquiridos a Santa Cruz Biotechnology (dilución: 1:400, Santa Cruz, CA). Los anticuerpos secundarios IgG anti-conejo o anti-ratón ligados a la peroxidasa de rábano fueron suministrados por DakoCytomation (dilución 1:2000, Dinamarca).

Transcurridas las 48 horas de la transfección con siRNA específico de PPARα o PPARγ, las HUVEC mostraron > 68% y 66% de reducción de proteína, respectivamente, en comparación con los niveles detectados en las células control tratadas con siRNA (**Figura 7**). En el control de células transfectadas-siRNA, la estimulación con TNFα inducía aumentos significativos en la adhesión de las células mononucleares que eran inhibidas cuando las células endoteliales se pretrataban con policerasoidol (**1**) o rosiglitazona (**Figura 8A y B**). Cabe destacar que, mientras estas respuestas no se veían afectadas por el silenciamiento PPARα (**Figura 8A**), las respuestas inducidas por policerasoidol (**1**) eran anuladas en HUVEC deficiente de PPARγ (**Figura 8B**). Los PPAR forman heterodímeros con RXR que en algunos casos responden sinérgicamente a ambos agonistas, RXR y el receptor. Dado que PPARγ puede interactuar

con RXRα para producir su actividad antiinflamatoria (Sanz *et al.*, 2012), la delección dirigida de la expresión de RXRα en HUVEC con siRNA específico de RXRα (>72% de reducción de proteína, **Figura 7**) también suprimió completamente el efecto inhibidor de policerasoidol (**1**) sobre la adhesión de células mononucleares inducida por TNFα (**Figura 8C**).

Además, para confirmar la interacción entre PPARγ y RXRα, las HUVEC se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-PPARγ y se sometieron a electroforesis y western-blot con un anticuerpo anti-RXRα, y se detectó el aumento de la interacción RXRα/PPARγ en aquellas células pretratadas con policerasoidol (**1**) o rosiglitazona (**Figura 8D**).

Para inmunoprecipitación, los extractos de proteína se obtuvieron en 50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 y proteasa (1 mM PMSF, 40 µg/mL aprotinina y 40 µg/mL leupeptina) e inhibidores de fosfatasa. Entonces, los extractos de proteína (~200 µg) se incubaron con 5 µg de anticuerpo frente a PPARγ. Se precipitaron inmunocomplejos utilizando un anti-conejo IgG beads (cat# 8800, eBioscience, San Diego, CA) y se suspendieron en tampón de muestra con 50 mM ditiotreitol (DTT). El Western blot se llevó a cabo con un anticuerpo frente a RXRα y las membranas se incubaron con el secundario HRP-conjugado Conejo TrueBlot (eBioscience, San Diego, CA) como anticuerpo secundario. Se desarrollaron señales de quimioluminiscencia con ECL (GE Healthcare, Madrid, España).

Este mismo experimento de inmunoprecipitación se llevó a cabo con el compuesto de síntesis **9** (**Figura 9**). Teniendo en cuenta los resultados, podemos concluir que policerasoidol (**1**) y el compuesto **9**, no requieren la activación de PPARα para inhibir el reclutamiento de células mononucleares, pero necesitan la activación de RXRα y PPARγ para ejercer su efecto antiinflamatorio, como ocurre con otros agonistas selectivos PPARγ o RXRα (Sanz *et al.*, 2012).

Ejemplo 6: Policerasoidol (1) y el compuesto sintetizado 9 disminuyen la expresión de la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y fractalquina (CX_3CL1), inducidas por TNFα

En enfermedades cardiovasculares y cardiometabólicas (hipertensión, obesidad, diabetes, síndrome metabólico) se han detectado niveles elevados de mediadores circulantes, entre otros, citoquinas y quimiocinas que pueden reflejar alteraciones en la función endotelial. Las citoquinas proinflamatorias estimulan el endotelio para expresar moléculas de adhesión celular (CAM), tales como la molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1) y la molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1), aumentando la adhesión de leucocitos a las células del endotelio vascular, que constituye un proceso importante de la etapa inicial de las respuestas inflamatorias e inmunológicas (Zernecke *et al.*, 2010). PPARγ se expresa en tejidos vasculares y leucocitos, y su activación puede disminuir la expresión de CAMs como ICAM-1

o VCAM-1, así como la expresión de CX_3CL1 (fractalquina). CX_3CL1 es una quimiocina que se expresa en la superficie de células endoteliales, y puede unirse a su receptor CX_3CR1, expresado en monocitos, linfocitos T y células NK, promoviendo la adhesión celular. CX_3CL1 también se puede desprender de la superficie celular por acción de ADAM10 y ADAM17, liberándose una forma soluble capaz de actuar como quimioatrayente de los leucocitos que expresan su receptor. Además de CX_3CL1, existe otra quimiocina transmembrana, CXCL16, que al igual que CX_3CL1, también se expresa en células endoteliales y puede desprenderse por la acción de ADAM10. Ejerce su acción interaccionando con su receptor CXCR6, presente en determinados subtipos leucocitarios, promoviendo la adhesión de los mismos a la superficie endotelial. Así, estas quimiocinas y moléculas de adhesión regulan la adhesión y migración de los leucocitos a la pared vascular, y existen indicios de que un incremento de su expresión endotelial está asociado a un incremento de la aterosclerosis (Zernecke *et al.*, 2008).

Para investigar la expresión de VCAM-1, ICAM-1, fractalquina (CX_3CL1) y CXCL16, se pretrataron HUVEC con policerasoidol (**1**) (10 µM) o el compuesto **9** (3 µM) durante 24 h, y se estimularon con TNFα (20 ng/mL) durante 24 h adicionales. Las células se recogieron de los frascos utilizando accutasa (StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA). Entonces, se lavaron e incubaron durante 1 h con un anticuerpo APC–conjugado mAb frente a VCAM-1 humano (100 µg/mL; clon STA, BioLegend, San Diego, CA), FITC–conjugado mAb frente a ICAM-1 humano (400 µg/mL; clon HA58, BioLegend, San Diego, CA), PE–conjugado mAb frente a CX_3CL1 humano (1,25 µg/mL; clon 51637, R&D Systems, Minneapolis, MN) o con un anticuerpo monoclonal APC–conjugado frente a CXCL16 humano (clon 256213, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), todos ellos a una dilución 1:25 en 3% BSA/PBS. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo paralelo (FACSVerse, BD Biosciences, San Jose, CA).

En este estudio hemos demostrado que el pretratamiento de HUVEC con policerasoidol (**1**) durante 20 h a 10 µM disminuía significativamente la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, inducida por TNFα (**Fig. 10)**, siendo el efecto más acusado en VCAM-1 (87,8% de inhibición) que ICAM-1 (23,8% de inhibición). Para investigar el efecto de policerasoidol (**1**) sobre la expresión de fractalquina (CX_3CL1), las células se estimularon con TNFα y las respuestas se evaluaron por citometría de flujo e inmunofluorescecia después de 24 h.

Los resultados mostraron que policerasoidol (**1**) a 10 µM reducía la expresión de esta quimiocina en un 77,6% (**Figura 10C**). La expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 o quimiocinas como CX_3CL1 o CXCL16, también se determinó para el compuesto **9** a 3 µM, que mostró un descenso significativo de la expresión de VCAM-1, CX_3CL1 y CXCL16 (**Figura 11**).

Para realizar los ensayos de inmunofluorescencia HUVEC confluentes se cultivaron sobre cristales y algunas células se incubaron 24 h con policerasoidol (**1**) (10 µM) o el compuesto **9** (3 µM), antes de ser tratadas con TNFα (20 ng/mL) durante 24 h adicionales. Entonces, las células se lavaron dos veces con PBS (1x), se fijaron con 4% de paraformaldehído y se bloquearon en solución de PBS (1x) conteniendo 1% BSA. HUVEC se incubaron a 4ºC toda la noche con un anticuerpo monoclonal primario de ratón frente a VCAM-1 humano (dilución 1:200; clon 1.G11B1, Serotec, Kidlington, Reino Unido), ICAM-1 (dilución 1:200; clon 6.5B5, Serotec, Kidlington, Reino Unido), CX_3CL1 (dilución 1:200; clon 81506, R&D Systems, Minneapolis, MN) o CXCL16 (1:200 dilución; Immunostep, Salamanca, España) en una solución 0,1% BSA/PBS, seguido de incubación con un anticuerpo secundario alexa-fluor 488–conjugado de cabra anti-conejo (dilución 1:1000; A11034, Life Technologies, Carlsbad, CA) a temperatura ambiente durante 1 h. Los núcleos celulares se contrastaron con Hoechst (diluido 1:4000 en PBS, Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se capturaron imágenes con microscopio de fluorescencia (Axio Observer A1, Carl Zeiss, Thornwood, NY) equipado con un objetivo de lente 40x y un ocular 10x.

Ejemplo 7: Policerasoidol (1) y el compuesto 9 inhiben la activación de p38 MAPK y NF-κB inducida por TNFα en HUVEC

Numerosas evidencias han revelado que los ligandos PPAR son capaces de modular las vías de señalización MAPK (Park *et al.*, 2011). Por lo que hemos investigado las vías de señalización intracelular que subyacen a las respuestas inhibidoras mostradas por polycerasoidol (**1**) y el compuesto sintetizado **9**.

El efecto de policerasoidol (**1**) o el compuesto **9** sobre la fosforilación de p38 MAPK y p65 (NF-κB) inducida por TNFα se determinó en HUVEC mediante citometría de flujo. HUVEC se incubaron previamente durante 24 h con el compuesto **1** (10 µM) o **9** (3 µM) y se estimularon durante 1 h con TNFα (20 ng/mL). Las células endoteliales se fijaron con BD Cytofix Fixation Buffer (BD Biosciences, San Jose, CA) y se permeabilizaron con BD Sol Perm III solución (BD Biosciences, San Jose, CA) y se tiñeron secuencialmente con una dilución 1:10 de un anticuerpo PE–conjugado mAb frente a p65 humano (pS529, clon K10-895.12.50; BD Biosciences, San Jose, CA) y una dilución 1:10 de anticuerpo Alexa Fluor-conjugado mAb frente a p38 MAPK humano (pT80/pY182, clon 36/p38; BD Biosciences, San Jose, CA). Las células se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, CA).

Los resultados mostraron que policerasoidol (**1**) fue capaz de descender de forma considerable (63,4%) la activación de p38 MAPK, así como el compuesto **9** (71,9%) (**Figuras 12A** y **13A**). Además, la activación de distintos compuestos de la familia MAPK se asocia con la transactivación de NF-κB (p65), y la movilización de NF-κB al núcleo activa la transcripción

de genes que codifican la expresión de numerosos mediadores inflamatorios como las moléculas de adhesión endoteliales o la síntesis de citocinas y quimiocinas (Monaco *et al.*, 2004). Pudimos determinar que policerasoidol (**1**) y el compuesto **9** fueron capaces de bloquear significativamente la activación de NF-κB inducida por TNFα (**Figura 12B** y **13B**).

Estudios *in vivo*

Ejemplo 8: Tratamiento de ratones *ob/ob* con el compuesto 9.

Los protocolos conformes a las directrices de la Unión Europea para el cuidado y la protección de los animales fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Valencia. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados, así como su sufrimiento.

Los ratones *ob/ob* presentan una deficiencia de leptina, y están asociados con hiperfagia, y obesidad, además de hiperglicemia e hiperinsulinemia. En este estudio se utilizaron ratones machos *ob/ob* (C57BL/6J) (Charles River laboratories, Chatillon-sur-Chalaronne, Francia).

Los ratones fueron alojaron en jaulas individuales en una habitación donde se controlaba la temperatura, humedad y luz. Se mantuvieron y criaron (estabulario de la UCIM, Universitat de València). en condiciones libres de patógenos con acceso libre a alimento y agua autoclavada, a una humedad del 60-65% y a una temperatura constante de 22±2ºC con un ciclo oscuro/luminoso de 12 h (luz de 06:00-18:00 h, oscuridad de 18:00–06:00 h). A los ratones se les permitió aclimatarse durante diez días antes del estudio.

Los ratones machos *ob/ob* de 7 a 8 semanas de edad se trataron diariamente entre las 9:00 a.m. y las 11:00 horas con el compuesto **9** por vía oral mediante una sonda orogástrica (10 mg/Kg/d y 30 mg/Kg/d), rosiglitazona (10 mg/ Kg/ d) y/ o WY-14643 (30 mg/Kg/d) durante 4 días, y se compararon con el grupo de ratones *ob/ob* control tratados únicamente con el vehículo (suero fisiológico con HEC 1%). Las dosis se eligieron en base a resultados previos, obtenidos de un experimento con ratones *ob/ob* (n=3) en el que el compuesto **9** y los compuestos de referencia, rosiglitazona y WY-14643, se administraron intraperitonealmente (datos no mostrados). Se utilizaron 6 animales por grupo, en experimentos independientes (n=6). Los compuestos se prepararon diariamente como suspensiones en HEC al 1% para su administración oral. La aleatorización se realizó sobre los valores de glucemia a día 0. Durante la duración del experimento se pesó diariamente para cada ratón: cantidad de alimento ingerido y el peso corporal. Diariamente, entre las 9:00 a.m. y las 11:00 horas (previo al tratamiento) se midió la glucosa en sangre utilizando (Contour next USB Blood glucose meter, BAYER, Basel, Suiza). El quinto día del experimento, los ratones se anestesiaron con isofluorano y se extrajo la sangre por punción cardiaca. La sangre se recogió en tubos conteniendo EDTA o heparina. Una vez tomadas las muestras, los animales se sacrificaron

por dislocación cervical y posteriormente, se extrajeron diversos órganos como tejido adiposo blanco (WAT) e hígado, para su estudio posterior. Los órganos se pesaron y se congelaron para un posterior análisis de ARN y poder llevar a cabo estudios histológicos. Las muestras de plasma se obtuvieron por centrifugación y se almacenaron a -80ºC.

Análisis histológico

Las muestras de tejido adiposo blanco perigonal (WAT) y de hígado fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, embebidas en parafina, seccionadas utilizando un microtomo (Leica RM2245, Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania) y montadas en portaobjetos de microscopio Superfrost® plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se obtuvieron secciones transversales de tejido de WAT y de hígado. Se examinaron al menos 10 portaobjetos, que contenían ≈ 4 secciones transversales de tejido (5 µm de espesor) de cada animal. Se llevó a cabo una tinción de hematoxilina y eosina (H&E) de WAT e hígado. La infiltración inflamatoria en WAT se midió como se describió previamente (Toyoda *et al.*, 2008). Tras la inactivación de la peroxidasa (H_2O_2 3%) y del bloqueo con suero de cabra (Abcam, Cambridge, Reino Unido), se incubaron secciones transversales de WAT durante la noche (4ºC) con el siguiente anticuerpo monoclonal (mAb) primario: mAb de conejo anti-ratón F4/80 (dilución 1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Se detectó un marcaje específico con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con HRP (dilución 1:500, Dako, Copenhague, Dinamarca). Con el fin de confirmar la especificidad de los anticuerpos, se usaron anticuerpos control de igual isotipo (Abcam, Cambridge, Reino Unido) o anticuerpo secundario sólo como controles negativos. Las muestras se revelaron usando una solución que contenía 3, 3'-diaminobenzidina (DAB, Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA), posteriormente se contratiñeron con hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se deshidrataron. Cinco campos de cada sección de tejido WAT fueron fotografiados (Axio Observer A1, microscopio Carl Zeiss, Thornwood, NY) digitalizados y analizados (*ImageJ* software 1.48V, Bethesda, MA). La cuantificación se realizó a doble ciego y mediante códigos.

Extracción *de ARNm, PCR en tiempo real*

El ARN total se extrajo de la grasa WAT de ratones mediante homogenización. La transcripción reversa se realizó con 1000 ng de ARN total usando el kit de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se convirtió a cDNA por métodos estándar. El cDNA se amplificó con cebadores específicos para la proteína quimioatrayente monocítica de ratón 1 (MCP-1 o CCL2, Mm00441242_m1) en un aparato de PCR en Tiempo Real 7900HT (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) usando el Mix Universal Master (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) Todos los cebadores fueron prediseñados por Applied Biosystems. La cuantificación relativa de las diferentes transcripciones se determinó con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

usando GAPDH (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) como control endógeno y normalizado para el grupo control.

Mediciones *de metabolitos*

Se determinaron los ácidos grasos libres en plasma (FFA), el enzima aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) por medio de un kit de ensayo colorimétrico (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Además, se determinaron los niveles de lípidos en plasma de colesterol total y triglicéridos (TG) mediante procedimientos enzimáticos (WAKO, Cape Charles, VA). También se determinó la concentración de HDL-colesterol (HDL-c) con el mismo método que el usado para medir colesterol total, después de la precipitación de la apolipoproteína-B (apoB) con sulfato de dextrano/$MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, Madrid, España) como se describió previamente (Zieske *et al*., 2005).

8.1 El compuesto 9 no provoca variaciones en el peso corporal y en la eficiencia alimenticia.

Un efecto adverso durante el tratamiento con TZD en los individuos con DT2 es la ganancia de peso (Ahmadian *et al*., 2013). Para determinar los efectos del tratamiento con el compuesto **9**, los ratones y la comida ingerida se pesaron diariamente. Se calculó la ganancia de peso al final del tratamiento (d_5-d_0) (**Figura 14A**). El tratamiento con el compuesto **9** a las dosis de 10 y 30 mg/Kg/d no provocó diferencias significativas en la ganancia de peso en relación al grupo control. El aumento de ganancia fue de 1,70 ±0,25, 2,5±0,32 y 1,88±0,52 g, para los ratones control, tratados con rosiglitazona y compuesto **9** (30 mg/Kg/d), respectivamente. La eficiencia alimenticia siguió esta misma tendencia, y en los ratones tratados con el compuesto **9** no se observaron diferencias significativas (**Figura 14B**).

8.2 El compuesto 9 disminuye los valores de glucemia

El tratamiento durante 4 días nos permitió observar un aumento del 47% en el porcentaje de glucosa en sangre (248 *vs*. 300 mg/dL) en los ratones *ob/ob* del grupo control tratados con vehículo, mientras que la administración del compuesto **9** provocó un descenso del 20% en los niveles de glucosa (261 *vs*. 194 mg/dL) a la dosis de 30 mg/Kg/d respecto al día 0 (d_0), por último, el tratamiento con rosiglitazona disminuyó la glucosa un 32% (217 *vs*. 135 mg/dL) (**Figura 15)**.

8.3 Efecto del compuesto 9 sobre el tejido adiposo blanco (WAT)

El tratamiento de ratones *ob/ob* con el compuesto **9** no aumentó de forma significativa el peso del tejido adiposo blanco (WAT) perigonadal en comparación con el grupo de ratones control (**Figura 16**).

Por otra parte, el examen histológico de WAT reveló cambios en la morfología de las células, con un descenso significativo del área media de los adipocitos en ratones tratados con el compuesto **9** de forma dosis-dependiente, similar al efecto producido por WY-14643 (**Figura 17**), sugiriendo la capacidad del compuesto **9** para prevenir la hipertrofia de adipocitos. Por el contrario, el tratamiento con rosiglitazona aumentó el número de adipocitos de pequeño tamaño en los depósitos de WAT, disminuyendo el valor medio del área de los adipocitos y confirmando su efecto adipogénico.

8.4 Efecto antiinflamatorio del compuesto 9 sobre el tejido adiposo blanco (WAT)

Existen evidencias de que en individuos obesos con DT2 se desarrolla un proceso de inflamatorio crónico iniciado en el tejido adiposo. En WAT de ratones obesos se encuentran aumentados los niveles de expresión de los genes en las vías inflamatorias, esto se refleja en un aumento de quimiocinas inflamatorias en el tejido adiposo de individuos obesos, tales como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), que participa en el reclutamiento de monocitos en la zona de la inflamación (Yoshimura *et al.*, 1989), así como un aumento de la infiltración de macrófagos en tejido adiposo (MacKnight *et al.*, 1996).

Se realizaron estudios sobre el proceso inflamatorio de WAT y pudimos observar que en ratones *ob/ob* tratados con el compuesto **9** a 30 mg/Kg/d, disminuyó de forma significativa la expresión de MCP-1 (**Figura 18A**). Además, la cuantificación de macrófagos en WAT mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo frente a F4/80, nos mostró que el compuesto **9** fue capaz de disminuir significativamente el número de macrófagos a la dosis de 30 mg/Kg/d, indicando la capacidad del compuesto **9** para reducir la infiltración de macrófagos en WAT, similar al efecto producido por rosiglitazona (**Figura 18B**).

8.5 El compuesto 9 mejora los parámetros lipídicos en sangre

Se ha estudiado los efectos en la dislipidemia de ratones *ob/ob* determinando diversos parámetros en plasma como son el colesterol total, HDL-c, triglicéridos y ácidos grasos libres. El tratamiento con el compuesto **9** a la dosis de 30 mg/Kg/d y WY-14643 aumentó de forma significativa los niveles de colesterol total respecto al grupo de ratones control *ob/ob* (50% y 64%, respectivamente) (**Figura 19A**). El compuesto **9** a las dosis de 10 y 30 mg/Kg/d y WY-14643 también aumentaron significativamente el HDL-c, respecto al grupo de ratones control *ob/ob* (**Figura 19B**). Además, el compuesto **9** y WY-14643 mostraron un descenso de los niveles de triglicéridos en plasma, aunque no de forma significativa y que podría ser debido al corto periodo de tratamiento (122 mg/dL o 101 mg/dL a la dosis de 10 o 30 mg/Kg/d, respectivamente, *vs.* 137 mg/dL del control *ob/ob*) (**Figura 19C**). El compuesto **9** a 30 mg/Kg/d y WY-14643 fueron capaces de descender significativamente los niveles de ácidos grasos

libres en sangre (0,25 y 0,33 moles/µL, respectivamente, *vs.* 0,67 moles/µL del control *ob/ob*) (**Figura 19D**).

8.6 Efecto del compuesto 9 en el hígado

Se ha estudiado el efecto del compuesto **9** sobre un órgano primordial como es el hígado, observándose un aumento de peso no significativo respecto al grupo control *ob/ob* (**Figura 20A**). La cuantificación del contenido de triglicéridos mostró que en el corto periodo de tratamiento con el compuesto **9** a 30 mg/Kg/d, los triglicéridos no se acumularon de forma significativa en hígado en comparación al grupo control *ob/ob* (**Figura 20B**).

8.7. El compuesto 9 disminuyó los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST)

El compuesto **9** disminuyó los niveles de ALT y AST, sufriendo esta última una reducción estadísticamente significativa a la concentración de 30 mg/Kg/d (28%) en comparación con el grupo control *ob/ob* tras 4 días de tratamiento (**Figura 21**). Esto sugiere que el compuesto **9** podría reducir el daño hepático, mostrando un efecto hepatoprotector.

REFERENCIAS

1. Cheang, W. S. *et al*. The peroxisome proliferator-activated receptors in cardiovascular diseases: experimental benefits and clinical challenges. *Br. J. Pharmacol*. 2015, 172, 5512–5522.
2. Ahmadian, M. *et al*. PPARγ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat. Med.* 2013, 19, 557-566.
3. Tan, C. K. *et al*. Synthetic and natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic síndrome. *Expert Opin. Ther. Targets* 2017, 21, 333–348.
4. González, M. C. *et al*. Polycerasoidin and polycerasoidol, two new prenylated benzopyran derivatives from *Polyalthia cerasoides*. *J. Nat. Prod*. 1995, 58, 1278-1284.
5. González, M. C. *et al*. Prenylated benzopyran derivatives from two *Polyalthia* species. *Phytochem.* 1996, 43, 1361-1364.
6. Kabbe, H.-J., Widdig, A. Synthesis and reactions of 4-chromanones. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 1982, 21, 247-256.
7. Sen, S. E. *et al*. Inhibition of vertebrate squalene epoxidase by extended and truncated analogues of trisnorsqualene alcohol. J. Med. Chem. 1990, 33, 1698-1701.

8. Bisceglia, J. A.; Orelli, L. R. Recent Applications of the Horner-Wadsworth-Emmons Reaction to the Synthesis of Natural Products. Curr. Org. Chem. 2012, 16, 2206-2230.

9. Toshima, K. *et al*. The First Total Synthesis of Concanamycin F (Concanolide A). J. Org. Chem. 2001, 66, 1708-1715.

10. Carmona, M. C. *et al*. S 26948: a new specific peroxisome proliferator–activated receptor-modulator with potent antidiabetes and antiatherogenic effects. *Diabetes* 2007, 56, 2797-2808.

11. Palee, S. *et al*. PPARgamma activator, rosiglitazone: Is it beneficial or harmful to the cardiovascular system? *World J. Cardiol.* 2011, 3, 144-152.

12. Rosenson, R. S. *et al*. Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. *Am. Heart J.* 2012, 164, 672-680.

13. Sanz, M. J. *et al*. Retinoid X receptor agonists impair arterial mononuclear cell recruitment through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *J. Immunol.* 2012, 189, 411-424.

14. Zernecke, A.; Weber, C., Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 2010, 86, 192-201.

15. Zernecke, A. *et al*. Chemokines in atherosclerosis an update. *Artherioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2008, 28, 1897-1908.

16. Park, J. B. *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress tissue factor overexpression in rat balloon injury model with paclitaxel infusion. *PLoS One* 2011, 6, e2832.

17. Monaco, C.; Paleolog, E., Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovasc. Res.* 2004, 61, 671-678.

18. Toyoda, T. *et al*. Effect of peroxisoma proliferator-activated receptor-α ligands in the interaction between adipocytes and macrophages in obese adipose tissue. *Obesity* 2008, 16, 1199-1207.

19. Zieske A. W. *et al*. Elevated serum c-reactive protein levels and advanced atherosclerosis in youth. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2005, 25, 1237-1243.

20. Yoshimura, T. *et al*. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett.* 1989, 244, 487–49321.

21. McKnight, A. J. *et al*. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 486–489.

22. Taha H et al., (2015) PLoS ONE 10(5) e0126126.doi: 10.1371 /journal.pone.0126126.

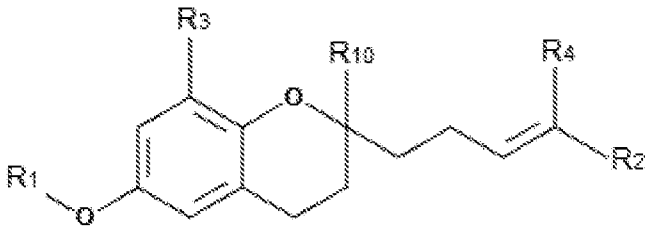
23. Zhao Yang et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry (2010), 58(8), 4844-4852.

24. Karimian et al., (2015) PLoS ONE 10(5) e0127434.doi:10.1371/journal.pone.0127434.

25. Zafra-Polo et. Al., J. Nat. Prod., 1996, 59(10), 913-916.

REIVINDICACIONES

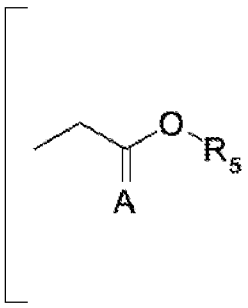
1. Compuesto de formula general I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

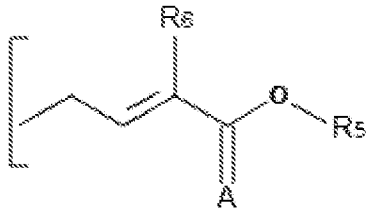
donde

- R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo $C(O)R^a$, donde R^a es un grupo arilo; alquilsulfona y halo-alquilsulfona;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo $-C(O)OR^b$, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo, en donde cuando R^b es etilo, R_1 es bencilo y R_4 es $-OCH_2CF_3$;

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H; C_{1-6} alquilo; alilo; alquilamida; alquilamina; alquilarilo; alquil-éter; halo-alquilo; sililo; $C(O)NR_mR_p$, donde R_m y/o R_p son cada uno e independientemente H, C_{1-6} alquilo o arilo; acilo; alquilsulfona y halo-alquilsulfona;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

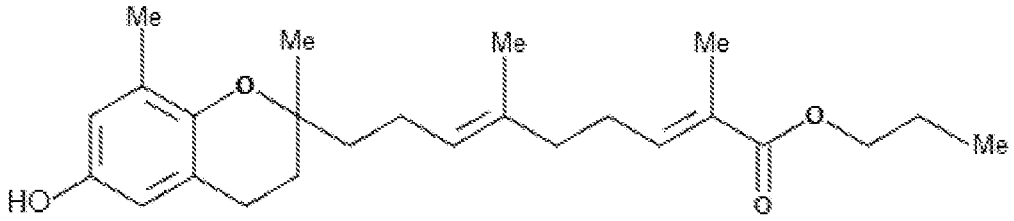
y donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido;
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona

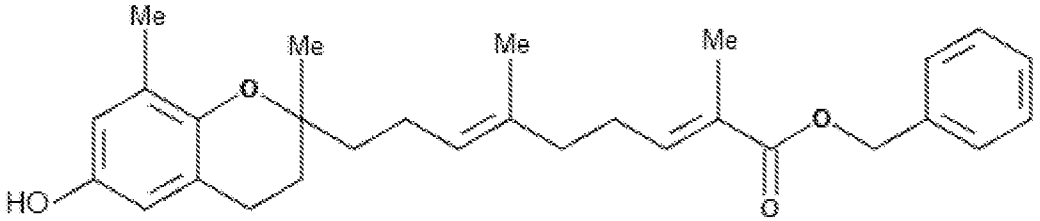
y en donde, además,

cuando R_1 es H y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo, y
cuando R_1 es metilo y R_3 es metilo, R_5 es distinto de H o metilo.

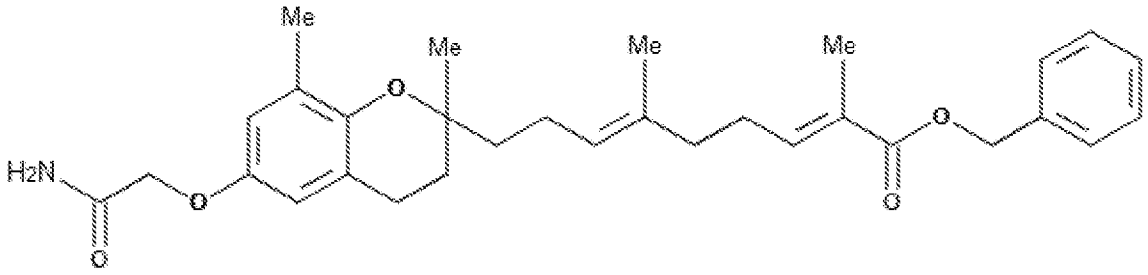
2. Compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre el grupo que consiste en 3, 4, 4a, 4b, 4c, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13:



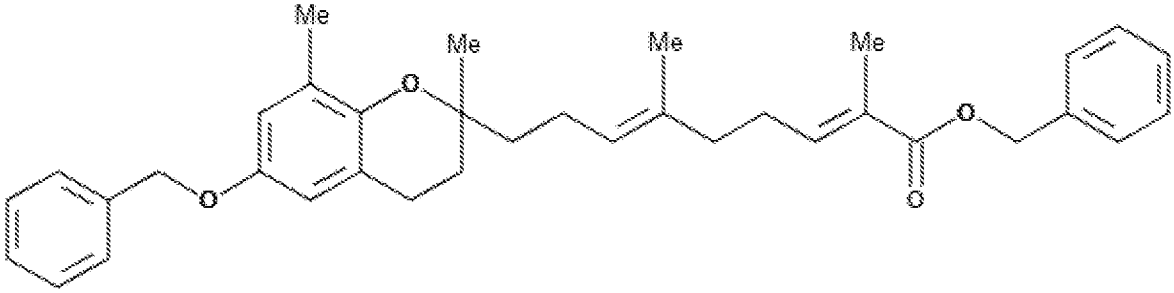
(3)



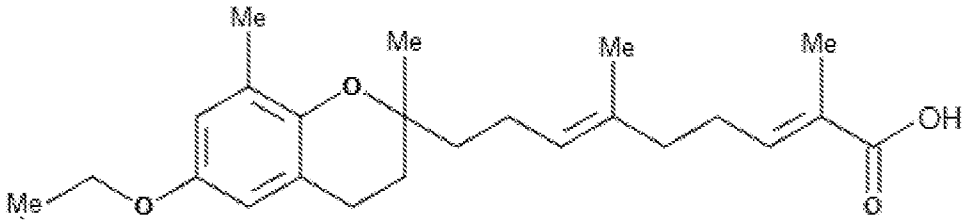
(4)


Me
Me
Me
Me
H2N
O
O
O
O
O

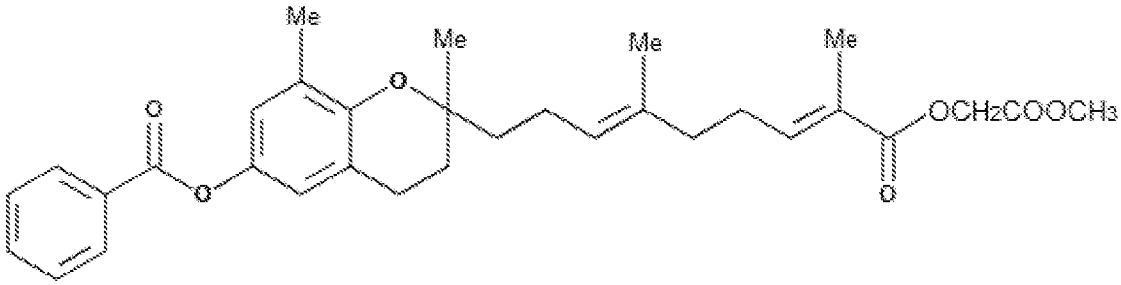
(4a)


Me
Me
Me
Me
O
O
O
O

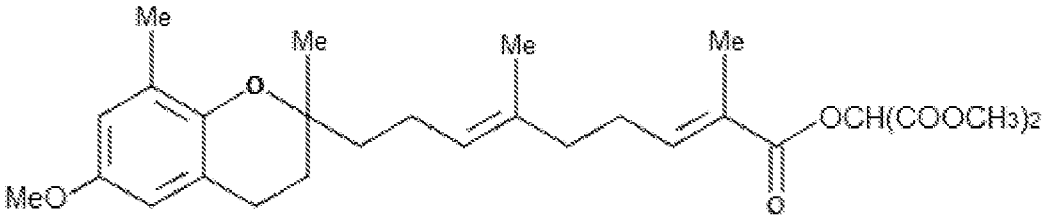
(4b)


Me
Me
Me
Me
OH
Me
O
O
O

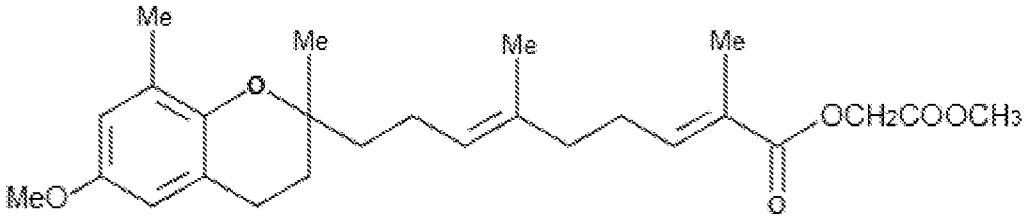
(4c)


Me
Me
Me
Me
OCH2COOCH3
O
O
O

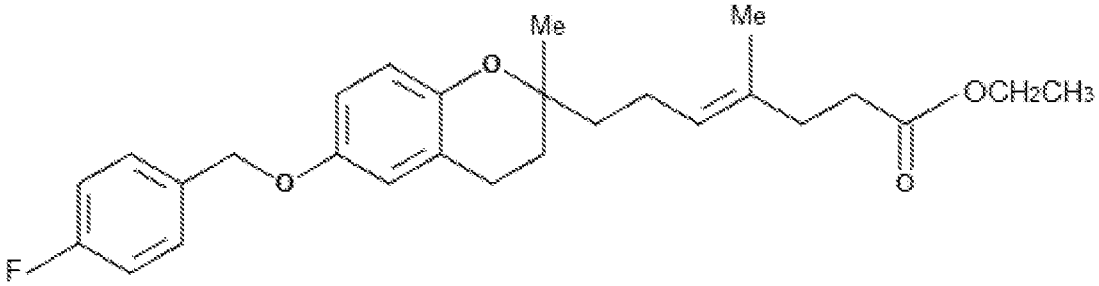
(6)


Me
Me
Me
Me
OCH(COOCH3)2
MeO
O
O

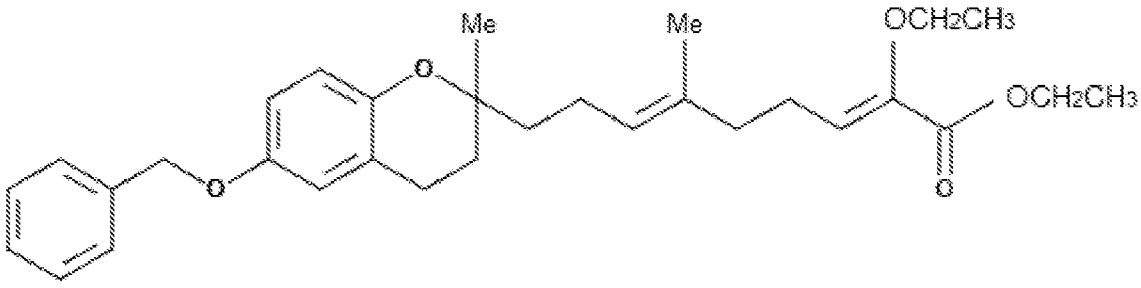
(7)


Me
Me
Me
Me
O
OCH2COOCH3
MeO
O

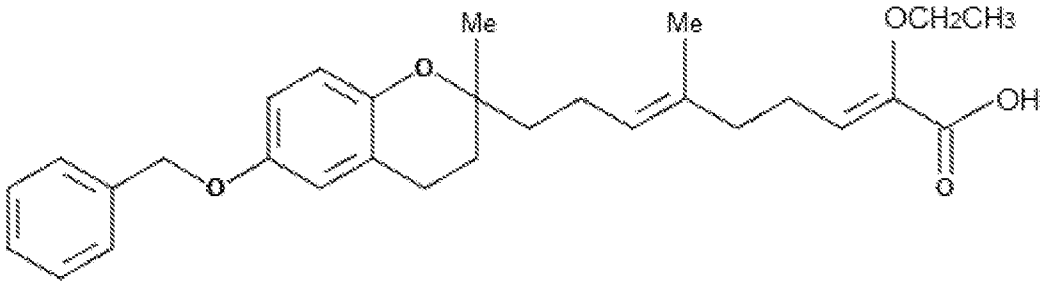
(8)


Me
Me
O
OCH2CH3
O
O
F

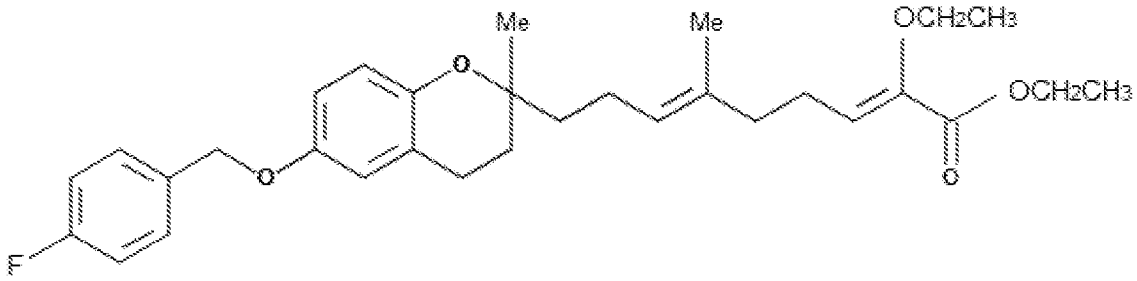
(9)


Me
Me
OCH2CH3
O
OCH2CH3
O
O

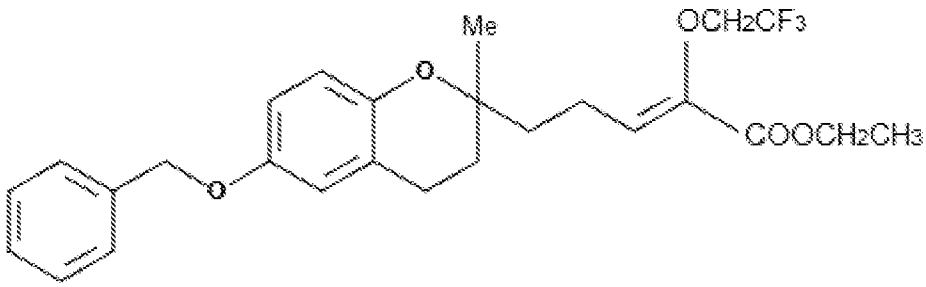
(10)


Me
Me
OCH2CH3
O
OH
O
O

(11)



(12)



(13)

3. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para uso como medicamento.

4. Compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

5. Compuesto para uso, de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicha enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ se selecciona independientemente entre desórdenes cardiometabólicos, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar y enfermedades neurodegenerativas.

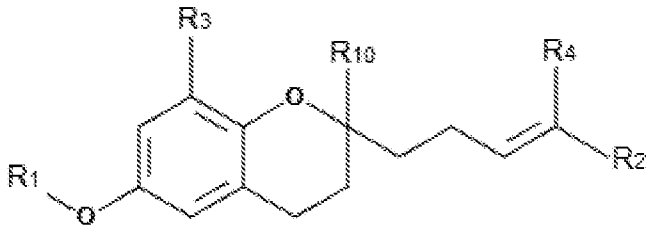
6. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto de fórmula I, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para uso como medicamento.

8. Composición farmacéutica, de acuerdo con la reivindicación 6, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

9. Composición farmacéutica para uso, de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicha enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ se selecciona independientemente entre desórdenes cardiometabólicos, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar y enfermedades neurodegenerativas.

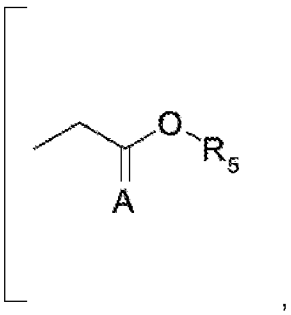
10. Compuesto de formula general I, estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo:



(I)

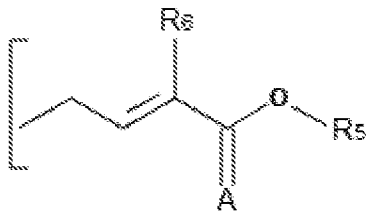
donde

- R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H o un grupo protector de fenol;
- R_2 se selecciona independientemente entre un grupo alquil-éster de estructura:



,

un derivado de un grupo prenilo de estructura:



o un grupo acilo -C(O)OR^b, donde R^b es un grupo C_{1-6} alquilo,

en donde

- A se selecciona independientemente entre un átomo de O, un átomo de S o un grupo NR_7, donde R_7 se selecciona independientemente entre H, OR_8 o un grupo C_{1-6} alquilo, y donde R_8 es un grupo H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_5 se selecciona independientemente entre H o un grupo protector de ácido carboxílico;
- R_6 es C_{1-6} alquilo o OR_9 donde R_9 es C_{1-6} alquilo;

y donde

- R_3 es H o un grupo C_{1-6} alquilo;
- R_4 es un grupo C_{1-6} alquilo o un alcóxido;
- R_{10} se selecciona independientemente entre un grupo C_{1-6} alquilo, alilo, alquilamina, alquilamida, alquilarilo, alquiléter, haloalquilo, sililo, carbamato, alquilsulfona o haloalquilsulfona

para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ,

11. Compuesto para uso, de acuerdo con la reivindicación 10, donde la enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ se selecciona independientemente entre desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

12. Composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto según la reivindicación 10 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ.

13. Composición farmacéutica para uso, de acuerdo con la reivindicación 12, donde la enfermedad que responde a la administración de agonistas de PPARα y/o PPARγ se selecciona independientemente desórdenes cardiovasculares, diabetes tipo 2 (DT2), obesidad, síndrome metabólico, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, quilomicronemia primaria, hiperlipoproteinemia, disbetalipoproteinemia familiar, inflamación y enfermedades neurodegenerativas.

Fig. 1

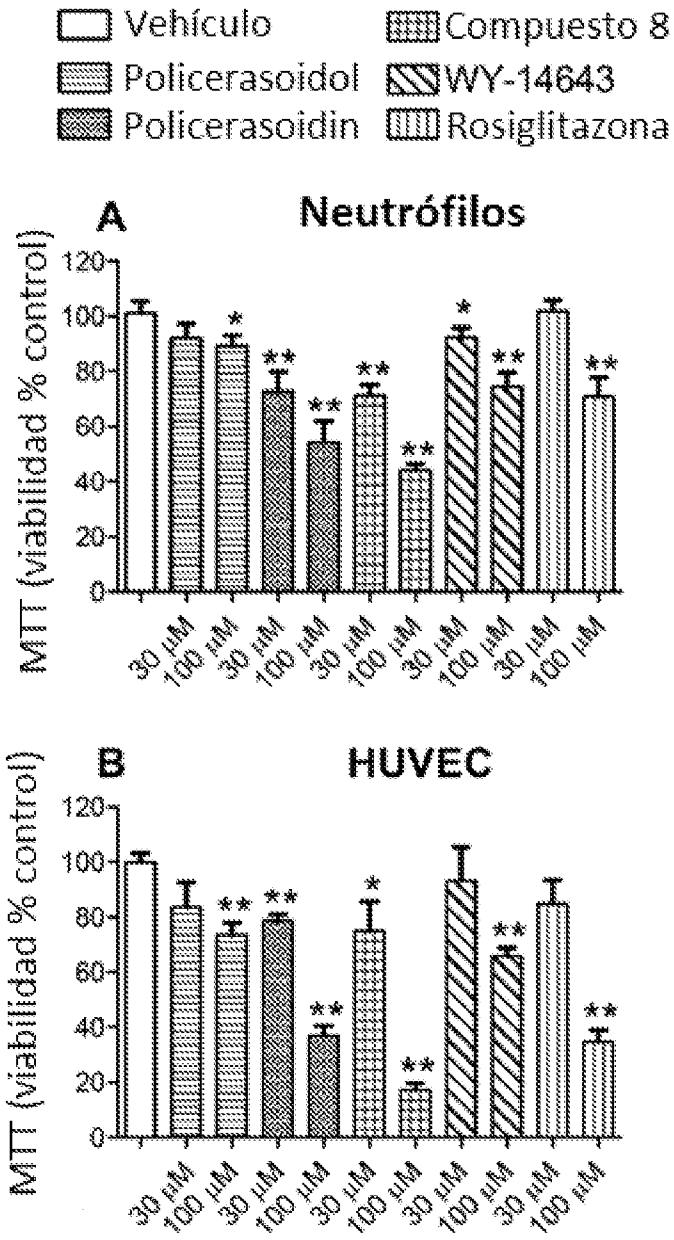

Vehículo
Policerasoidol
Policerasoidin
Compuesto 8
WY-14643
Rosiglitazona
A
Neutrófilos
MTT (viabilidad % control)
B
HUVEC
MTT (viabilidad % control)
30 µM
100 µM

Fig. 2

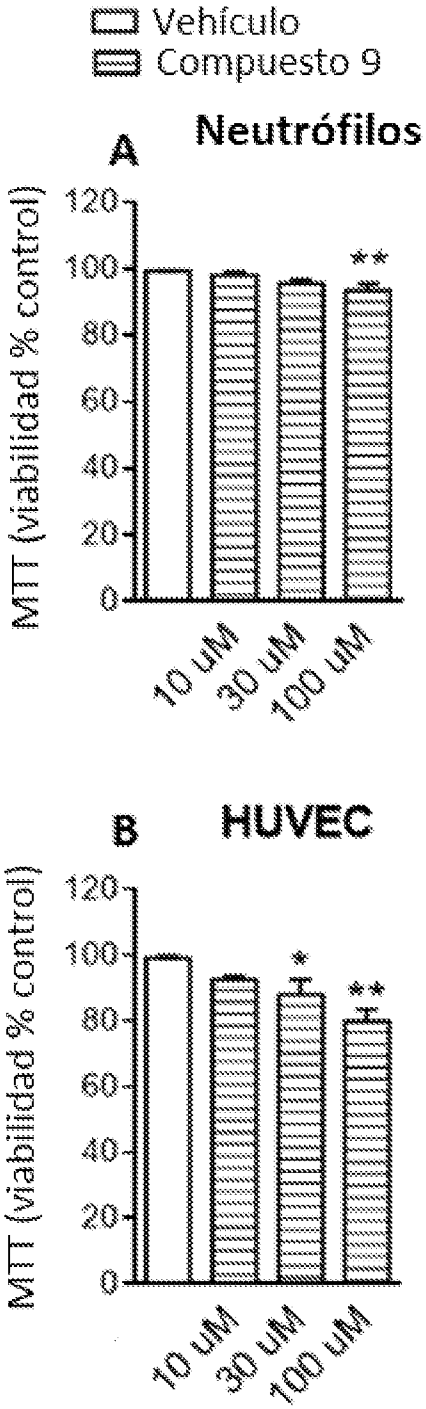

Vehículo
Compuesto 9
A
Neutrófilos
MTT (viabilidad % control)
120
100
80
60
40
20
0
**
10 uM
30 uM
100 uM
B
HUVEC
MTT (viabilidad % control)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
10 uM
30 uM
100 uM

Fig. 3

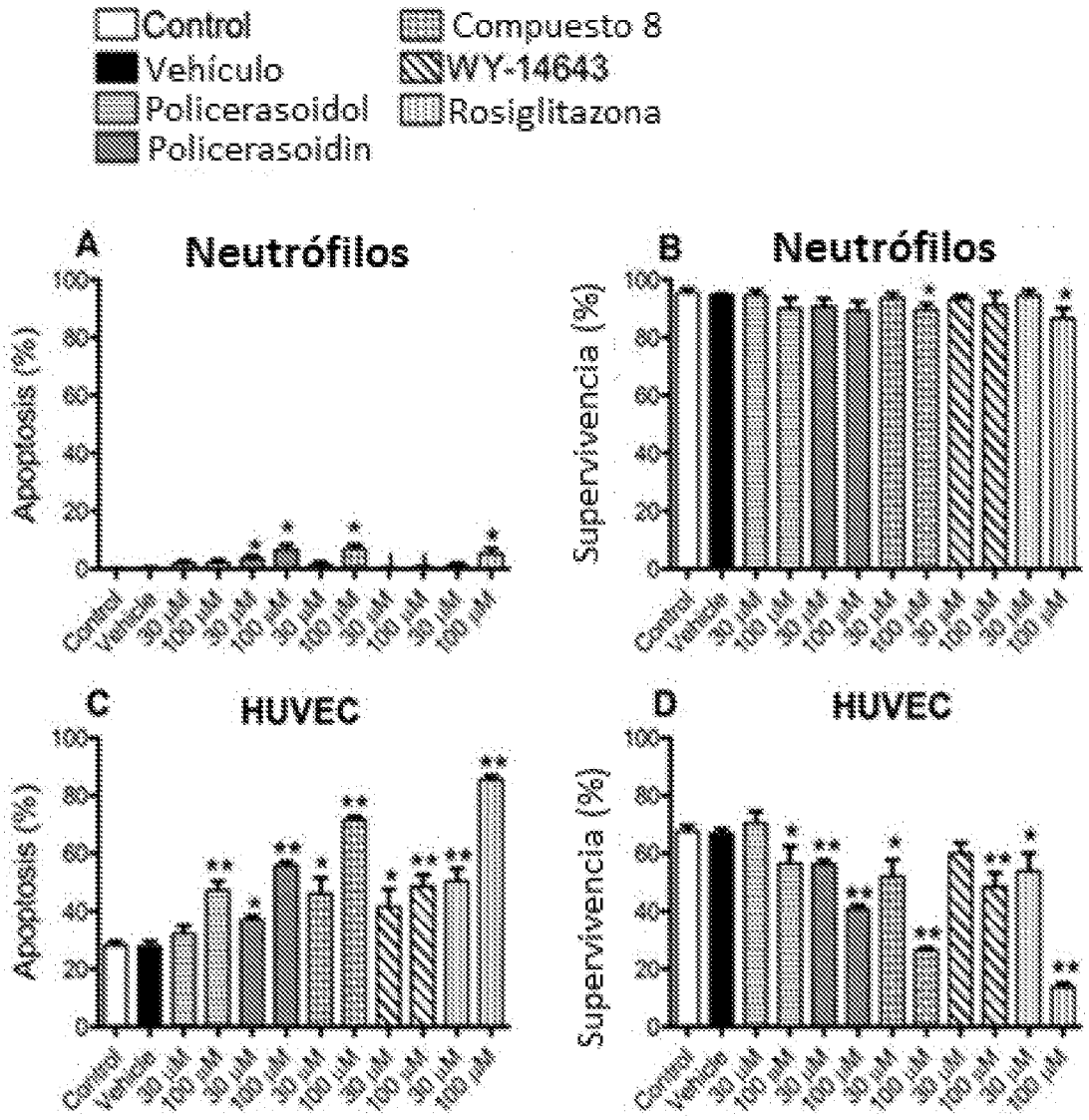

Control
Vehículo
Policerasoidol
Policerasoidin
Compuesto 8
WY-14643
Rosiglitazona
A
Neutrófilos
Apoptosis (%)
B
Neutrófilos
Supervivencia (%)
C
HUVEC
Apoptosis (%)
D
HUVEC
Supervivencia (%)
Control
Vehículo
30 µM
100 µM
500 µM

Fig. 3 (cont.)

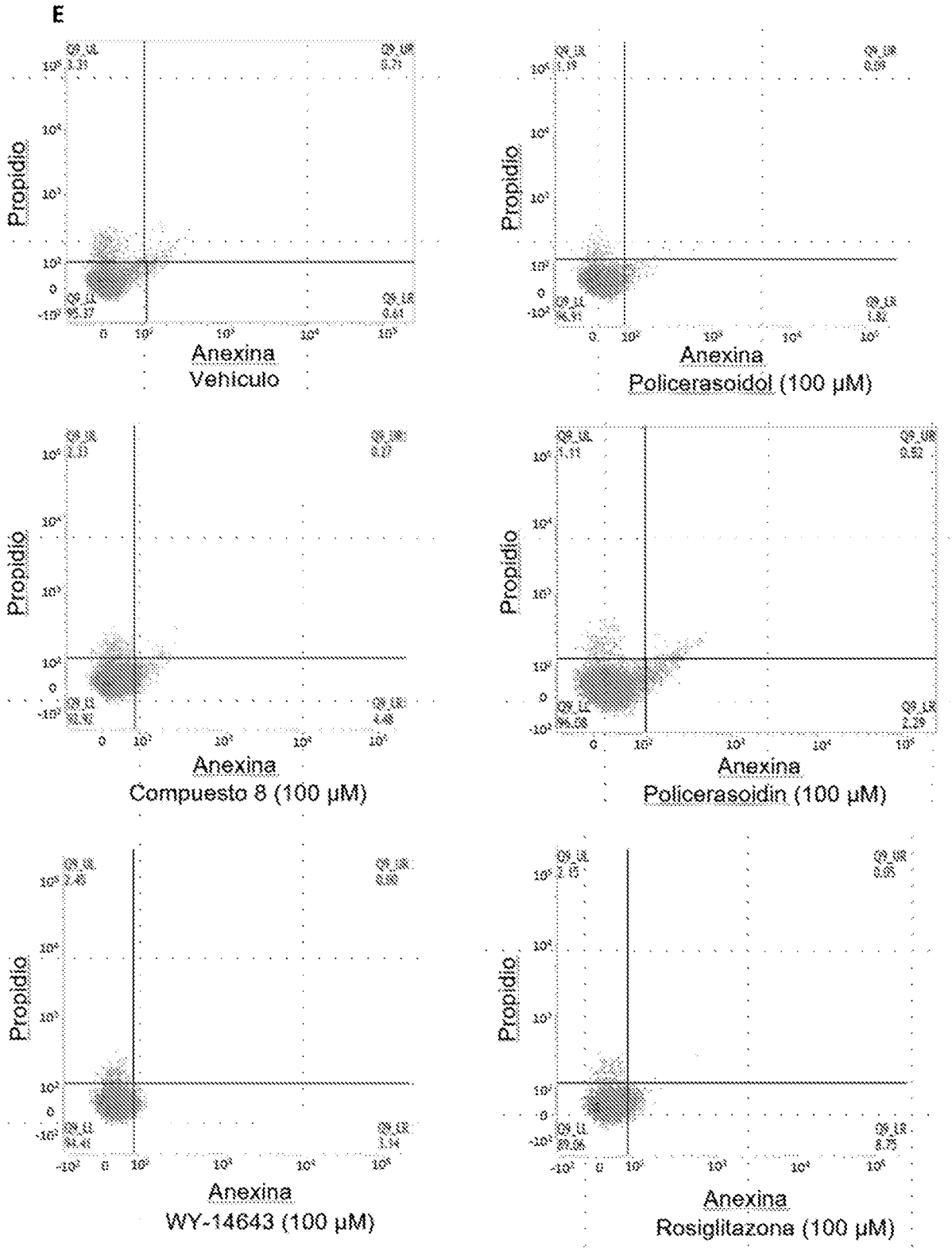

E
Propidio
Anexina
Vehiculo
Propidio
Anexina
Policerasoidol (100 µM)
Propidio
Anexina
Compuesto 8 (100 µM)
Propidio
Anexina
Policerasoidin (100 µM)
Propidio
Anexina
WY-14643 (100 µM)
Propidio
Anexina
Rosiglitazona (100 µM)

Fig. 4

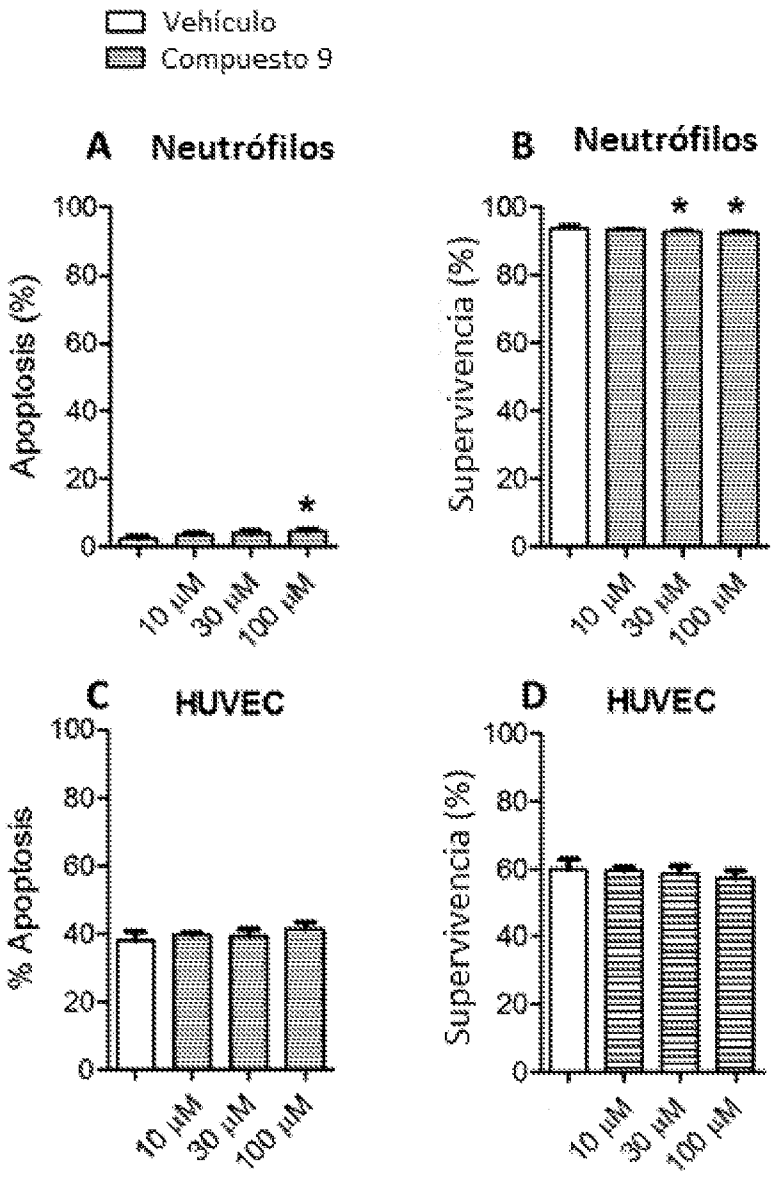

Vehículo
Compuesto 9
A Neutrófilos
Apoptosis (%)
B Neutrófilos
Supervivencia (%)
C HUVEC
% Apoptosis
D HUVEC
Supervivencia (%)
10 µM
30 µM
100 µM

Fig. 4 (cont.)

E

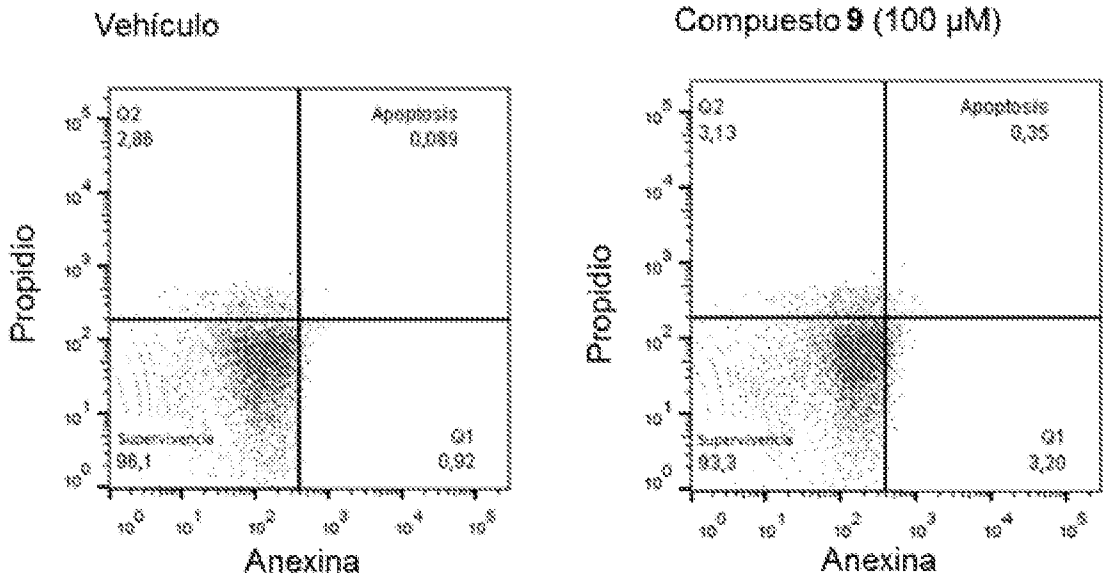

Vehículo
Compuesto 9 (100 µM)
Propidio
Anexina
Q2
2,88
Apoptosis
0,089
Supervivencia
96,1
Q1
0,92
Q2
3,13
Apoptosis
0,35
Supervivencia
93,3
Q1
3,20

Fig. 5

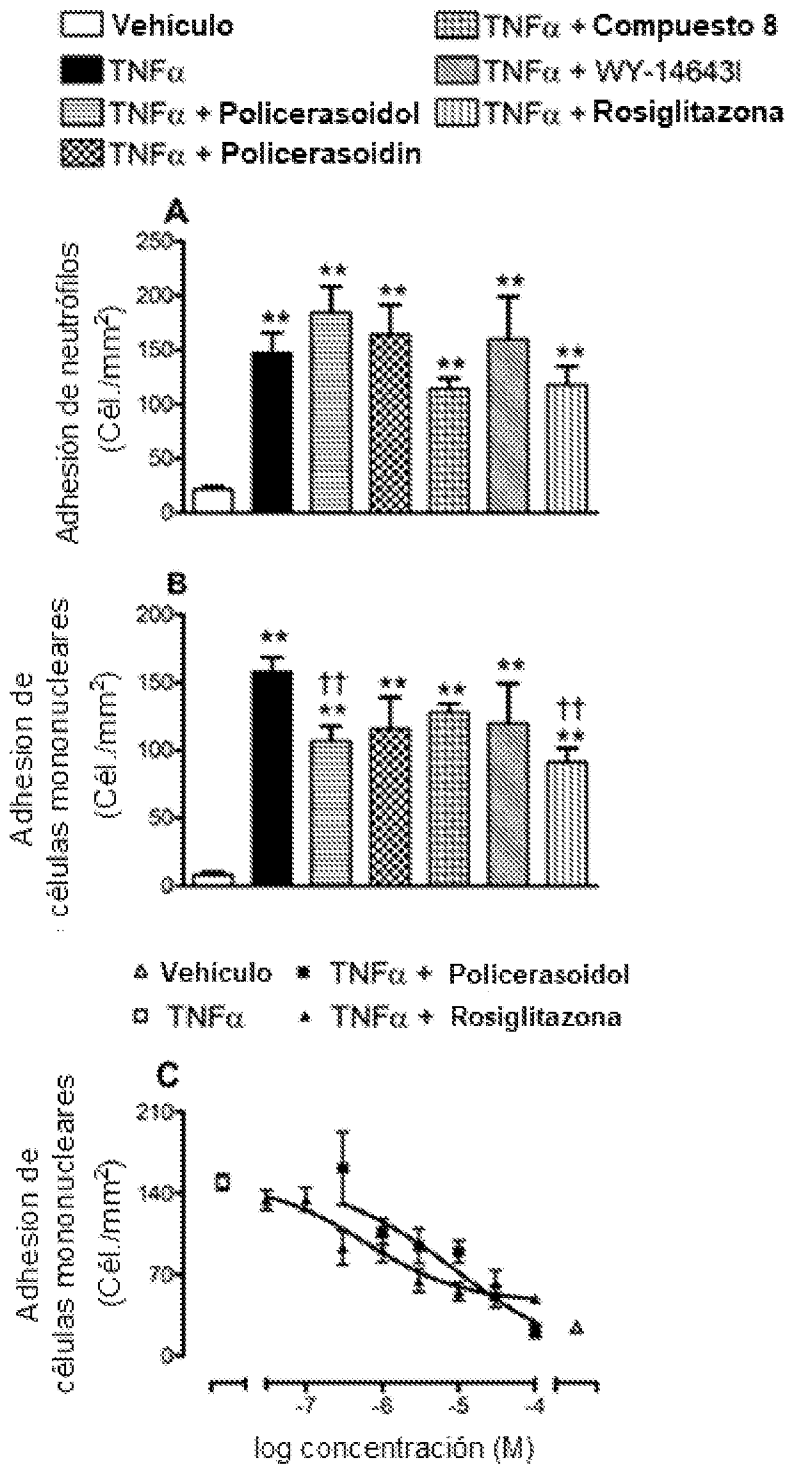

Vehículo
TNFα
TNFα + Policerasoidol
TNFα + Policerasoidin
TNFα + Compuesto 8
TNFα + WY-14643l
TNFα + Rosiglitazona
A
Adhesión de neutrófilos (Cél./mm²)
B
Adhesion de células mononucleares (Cél./mm²)
Vehículo
TNFα
TNFα + Policerasoidol
TNFα + Rosiglitazona
C
Adhesion de células mononucleares (Cél./mm²)
log concentración (M)

Fig. 6

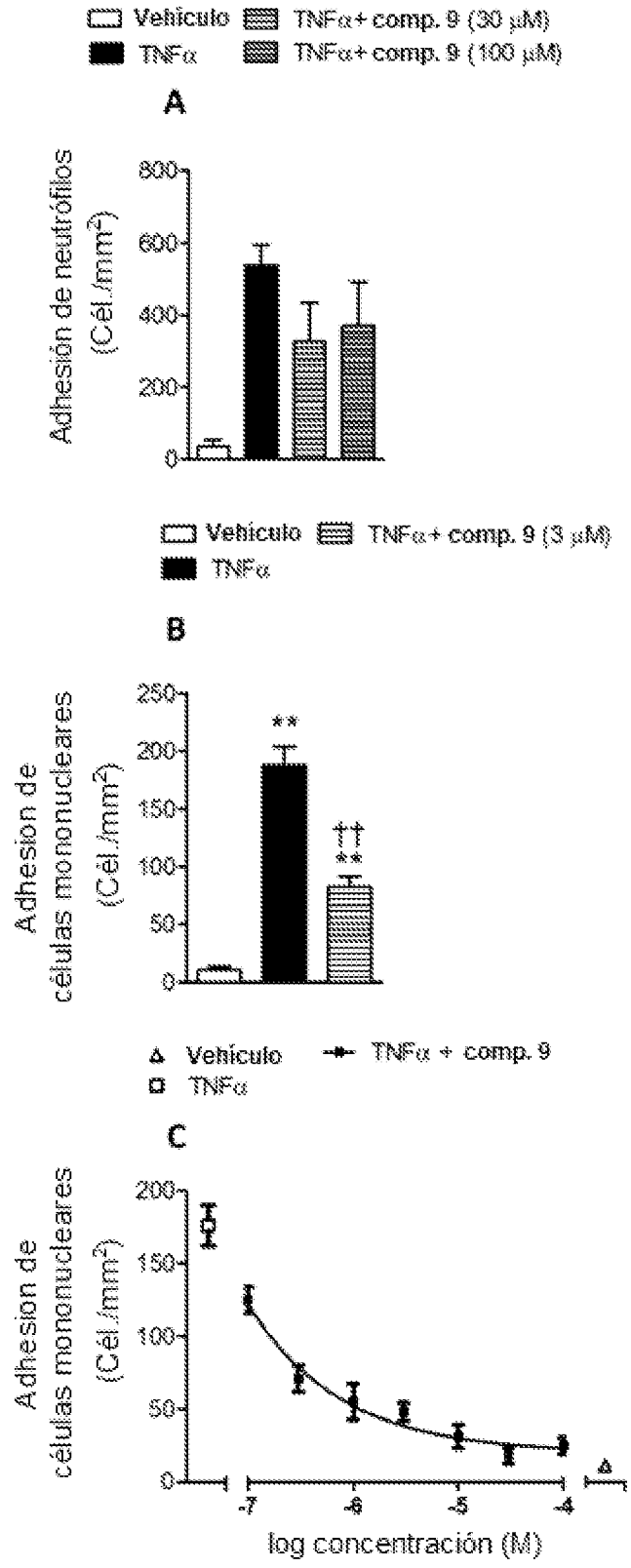
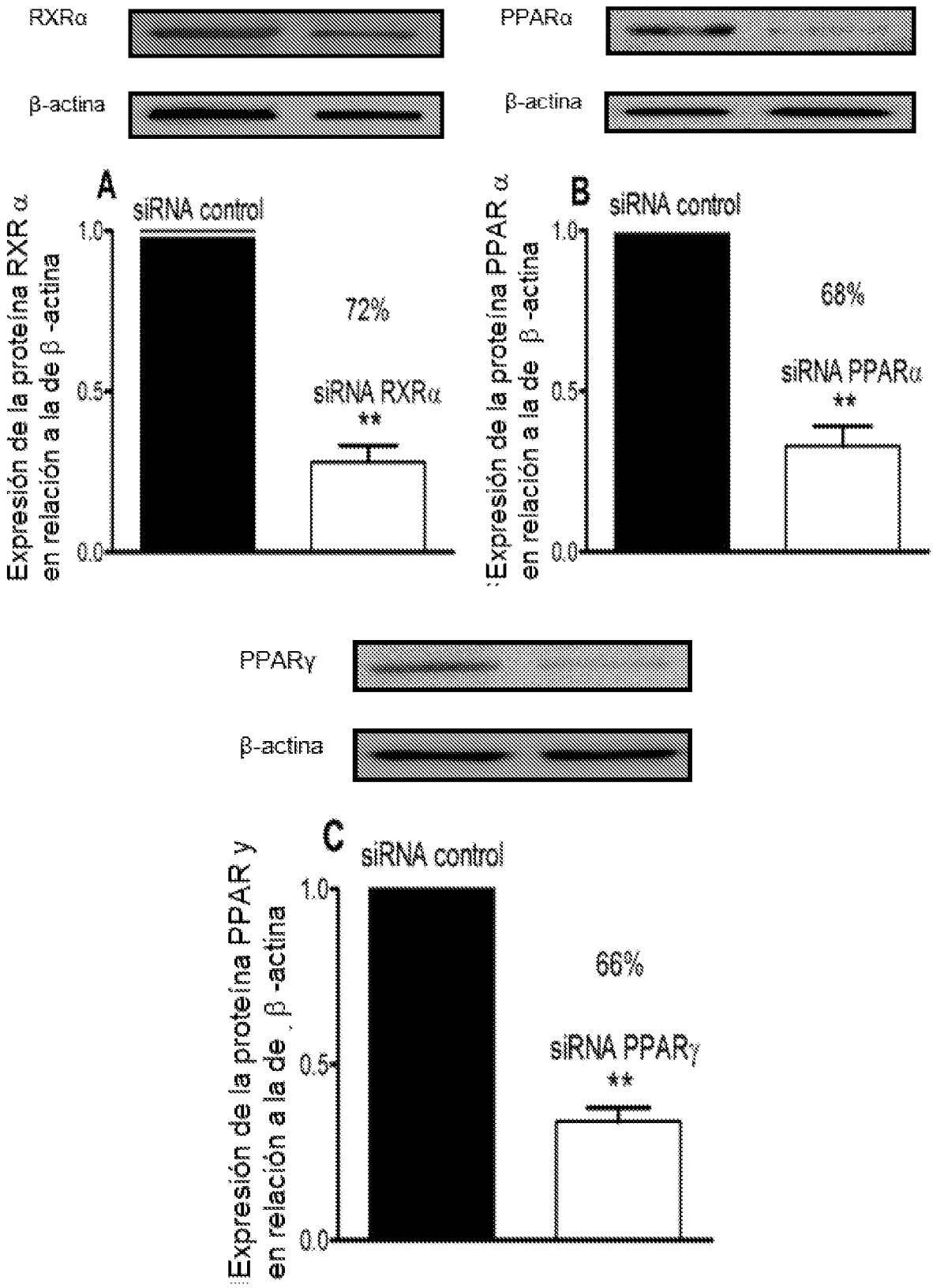

Vehículo
TNFα
TNFα+ comp. 9 (30 μM)
TNFα+ comp. 9 (100 μM)
A
Adhesión de neutrófilos (Cél./mm²)
800
600
400
200
0
Vehículo
TNFα
TNFα+ comp. 9 (3 μM)
B
Adhesion de células mononucleares (Cél./mm²)
250
200
150
100
50
0
**
**
Vehículo
TNFα
TNFα + comp. 9
C
Adhesion de células mononucleares (Cél./mm²)
200
150
100
50
0
-7
-6
-5
-4
log concentración (M)

Fig. 7


RXRα
β-actina
A
siRNA control
72%
siRNA RXRα
**
Expresión de la proteína RXR α en relación a la de β -actina
1.0
0.5
0.0
PPARα
β-actina
B
siRNA control
68%
siRNA PPARα
**
Expresión de la proteína PPAR α en relación a la de β -actina
PPARγ
β-actina
C
siRNA control
66%
siRNA PPARγ
**
Expresión de la proteína PPAR γ en relación a la de β -actina

5

Fig. 8

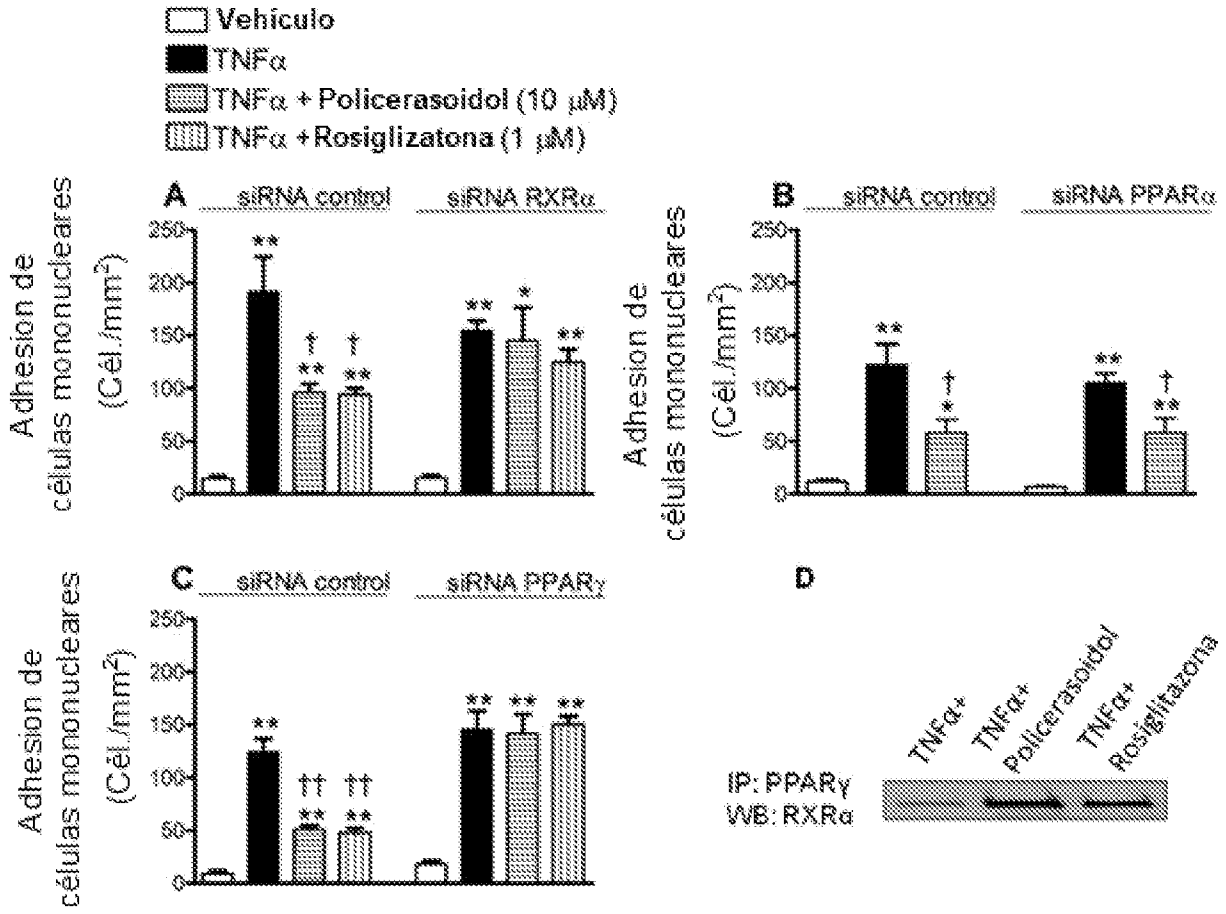

Vehiculo
TNFα
TNFα + Policerasoidol (10 μM)
TNFα +Rosiglizatona (1 μM)
A
siRNA control
siRNA RXRα
B
siRNA control
siRNA PPARα
C
siRNA control
siRNA PPARγ
D
Adhesion de células mononucleares (Cél./mm²)
IP: PPARγ
WB: RXRα
TNFα+
TNFα+ Policerasoidol
TNFα+ Rosiglitazona

Fig. 9

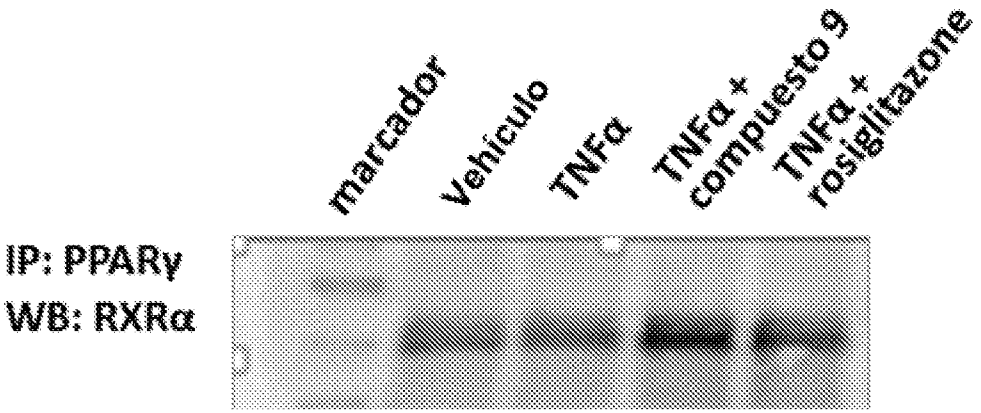

marcador
Vehiculo
TNFα
TNFα + compuesto 9
TNFα + rosiglitazone
IP: PPARγ
WB: RXRα

Fig. 10

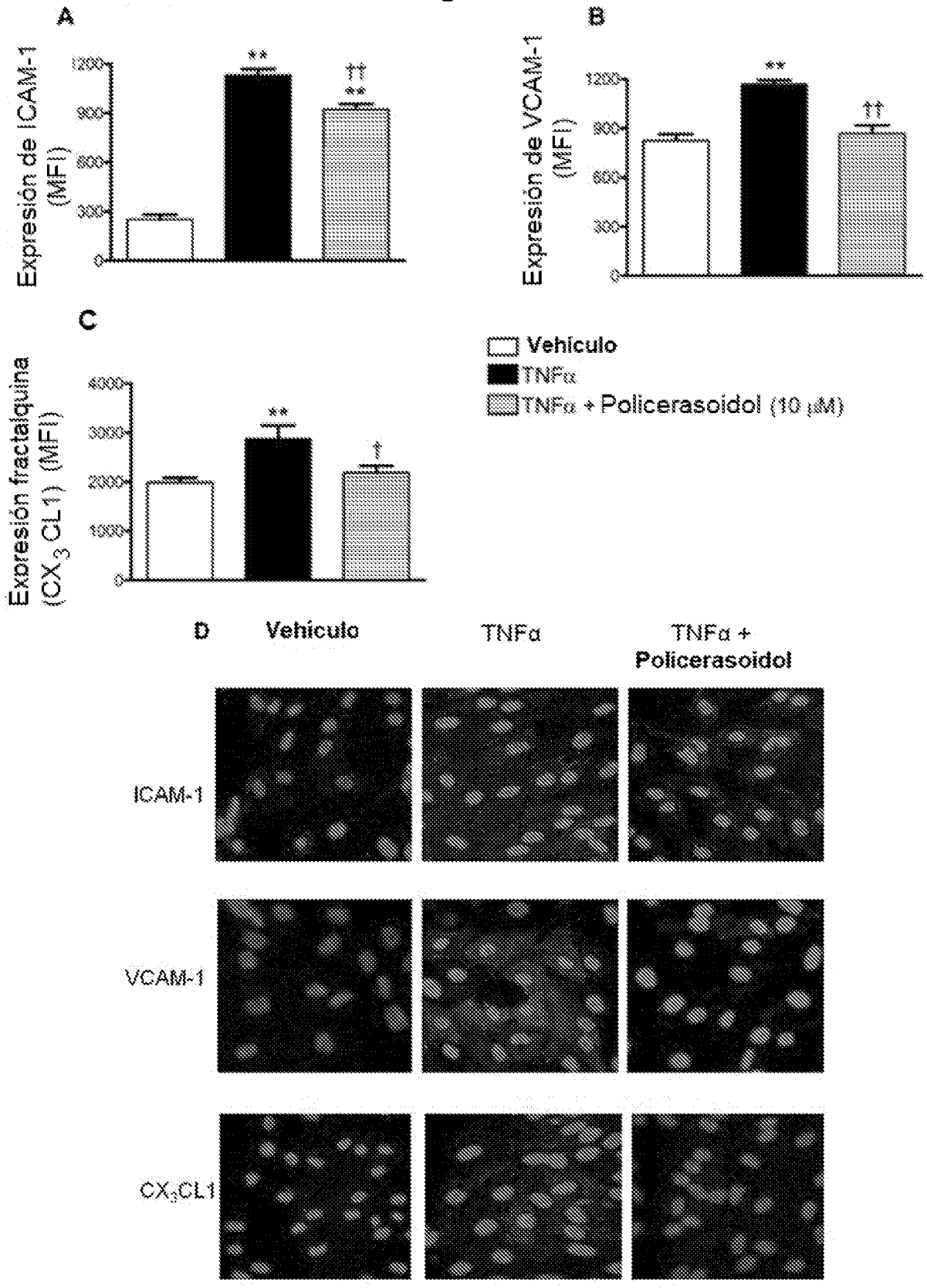

A
Expresión de ICAM-1 (MFI)
B
Expresión de VCAM-1 (MFI)
C
Expresión fractalquina (CX_3CL1) (MFI)
Vehículo
TNFα
TNFα + Policerasoidol (10 μM)
D
Vehículo
TNFα
TNFα + Policerasoidol
ICAM-1
VCAM-1
CX_3CL1

Fig. 11

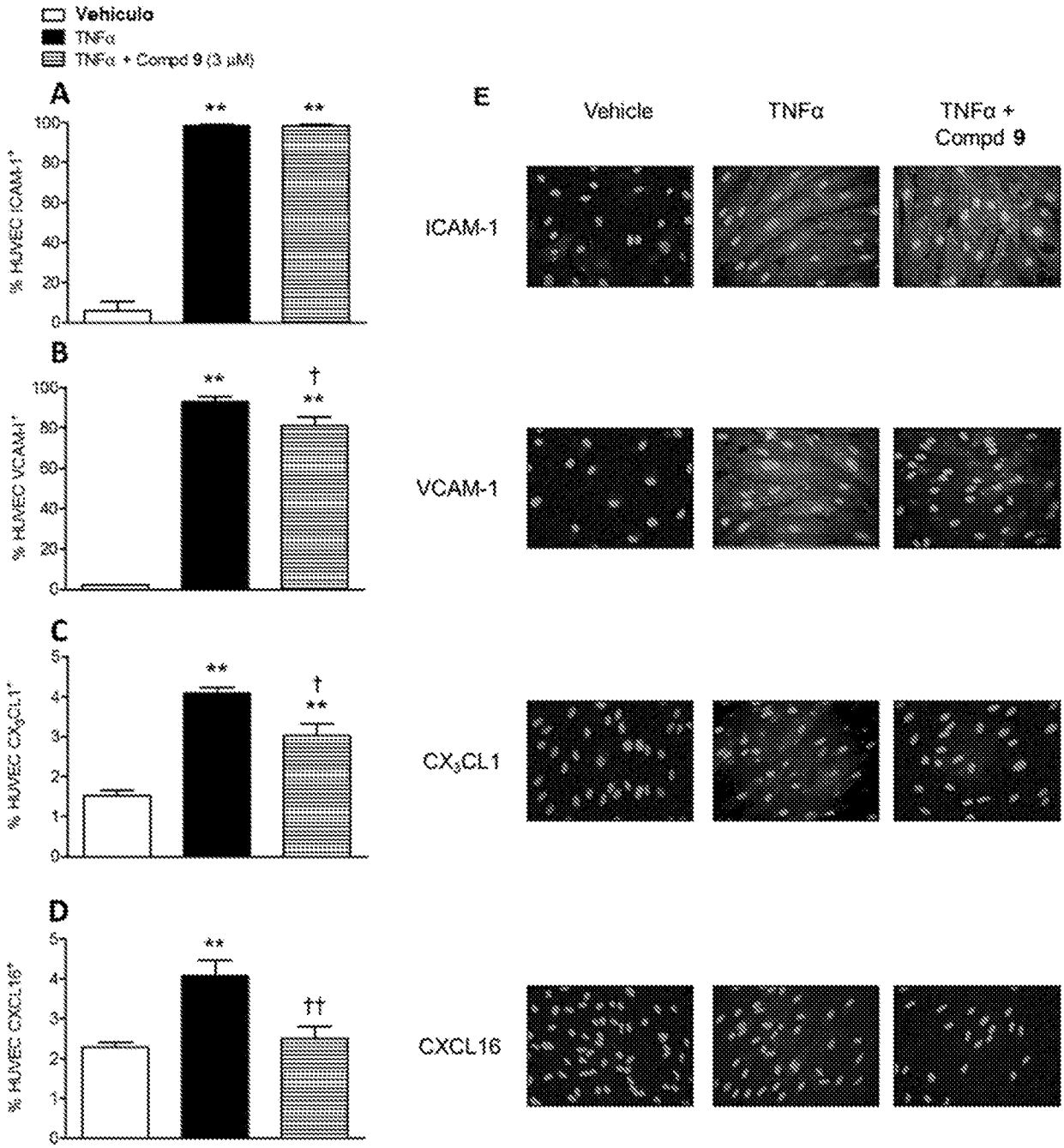

Vehículo
TNFα
TNFα + Compd 9 (3 µM)
A
B
C
D
E
Vehicle
TNFα
TNFα + Compd 9
ICAM-1
VCAM-1
CX3CL1
CXCL16

Fig. 12

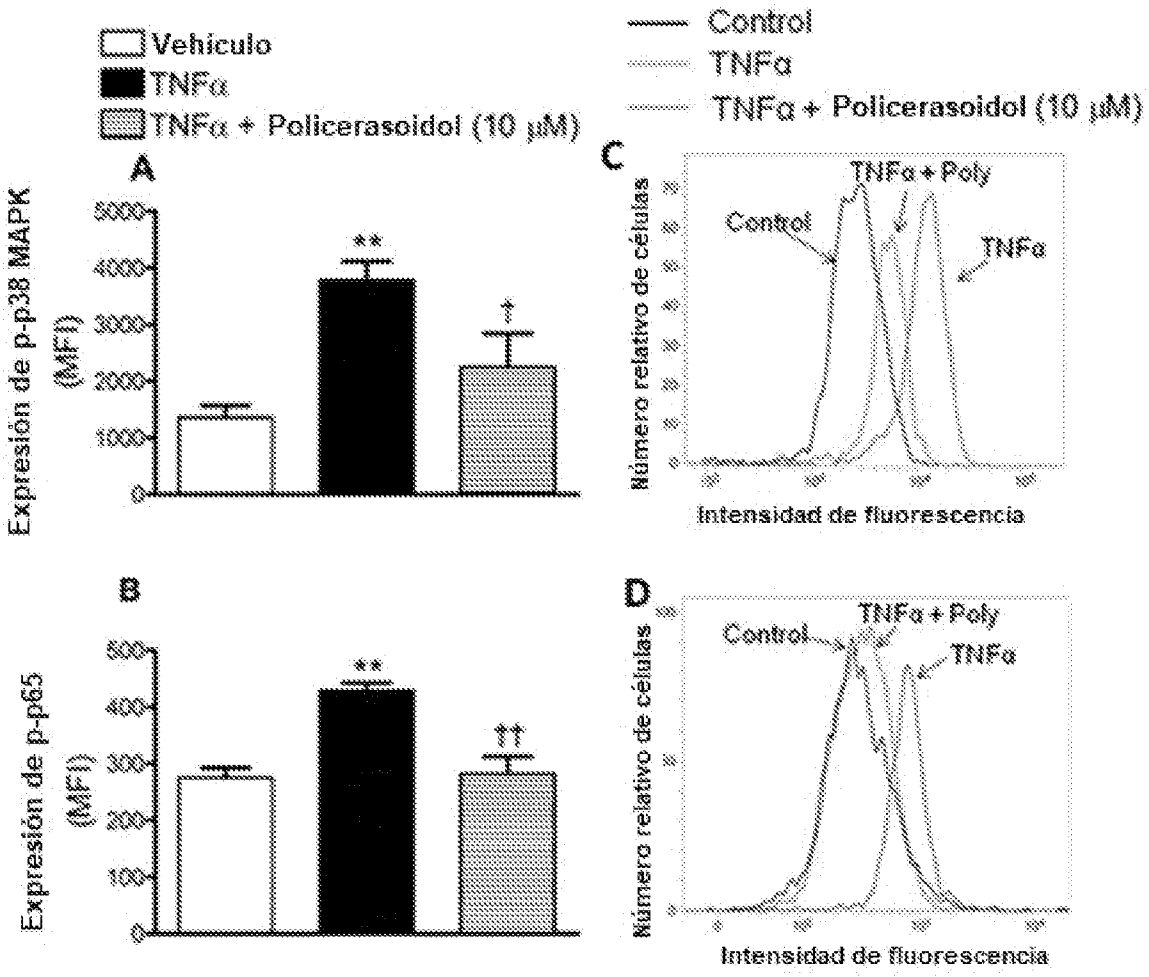

Vehículo
TNFα
TNFα + Policerasoidol (10 μM)
A
Expresión de p-p38 MAPK (MFI)
0
100
200
300
400
500
**
†
B
Expresión de p-p65 (MFI)
0
10
20
30
40
50
**
††
Control
TNFα
TNFα + Policerasoidol (10 μM)
C
Número relativo de células
Control
TNFα + Poly
TNFα
Intensidad de fluorescencia
D
Número relativo de células
Control
TNFα + Poly
TNFα
Intensidad de fluorescencia

Fig. 13

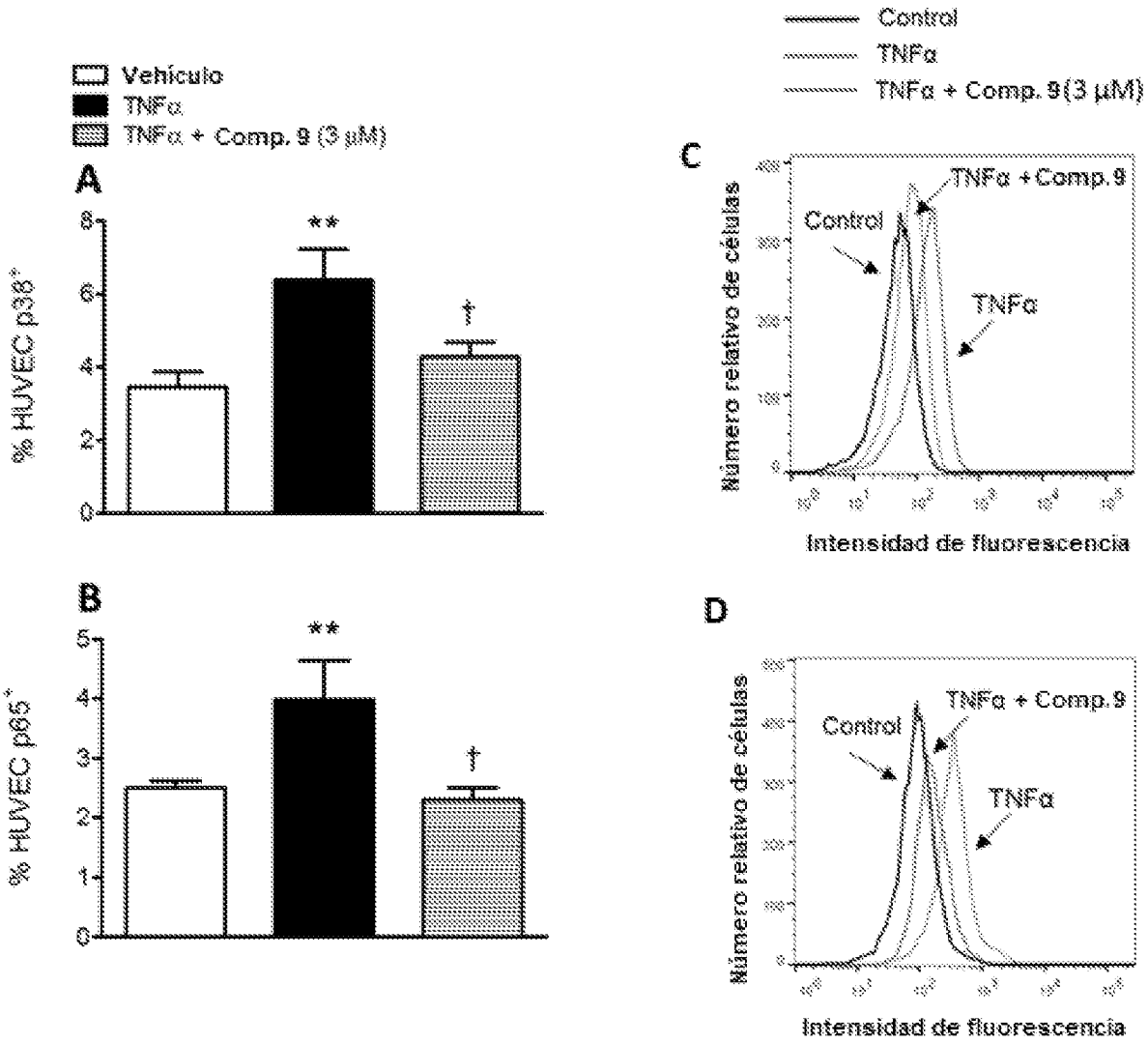

Vehículo
TNFα
TNFα + Comp. 9 (3 µM)
A
% HUVEC p38+
**
†
B
% HUVEC p65+
**
†
Control
TNFα
TNFα + Comp. 9 (3 µM)
C
Número relativo de células
Control
TNFα + Comp. 9
TNFα
Intensidad de fluorescencia
D
Número relativo de células
Control
TNFα + Comp. 9
TNFα
Intensidad de fluorescencia

Fig. 14

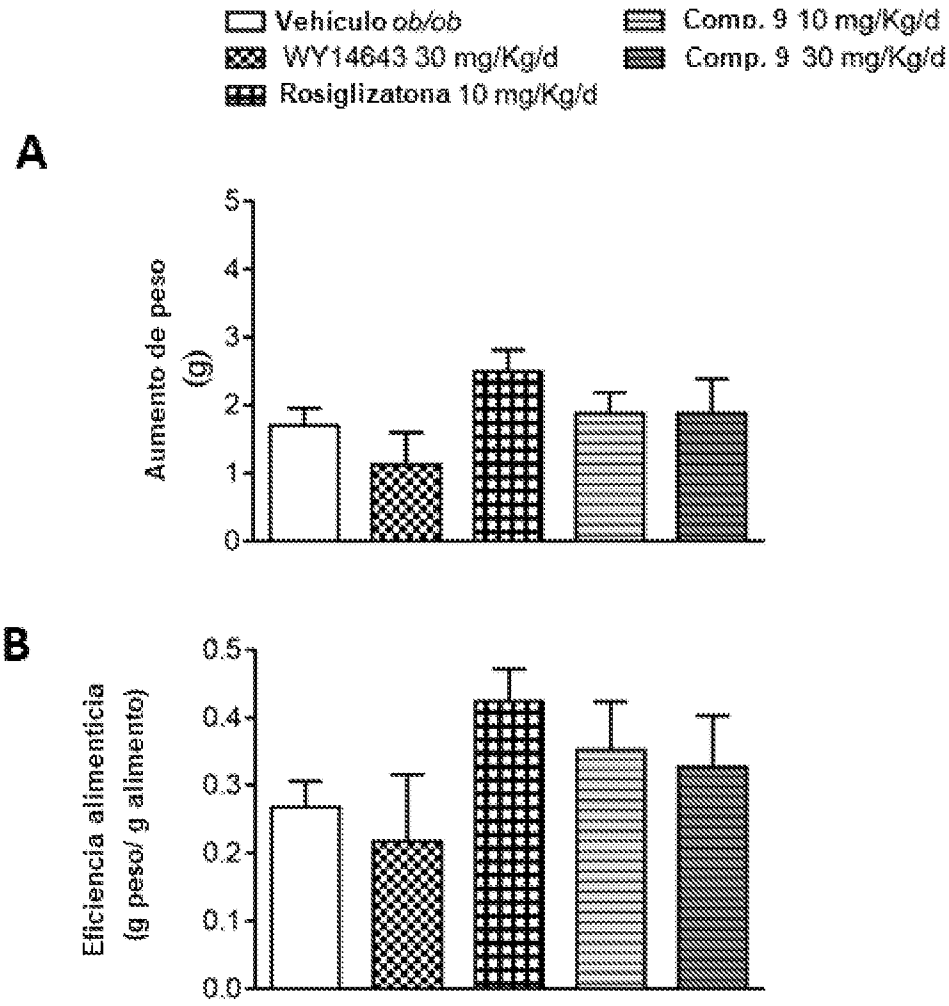

Vehiculo ob/ob
WY14643 30 mg/Kg/d
Rosiglizatona 10 mg/Kg/d
Comp. 9 10 mg/Kg/d
Comp. 9 30 mg/Kg/d
A
Aumento de peso (g)
0
1
2
3
4
5
B
Eficiencia alimenticia (g peso/ g alimento)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5

Fig. 15

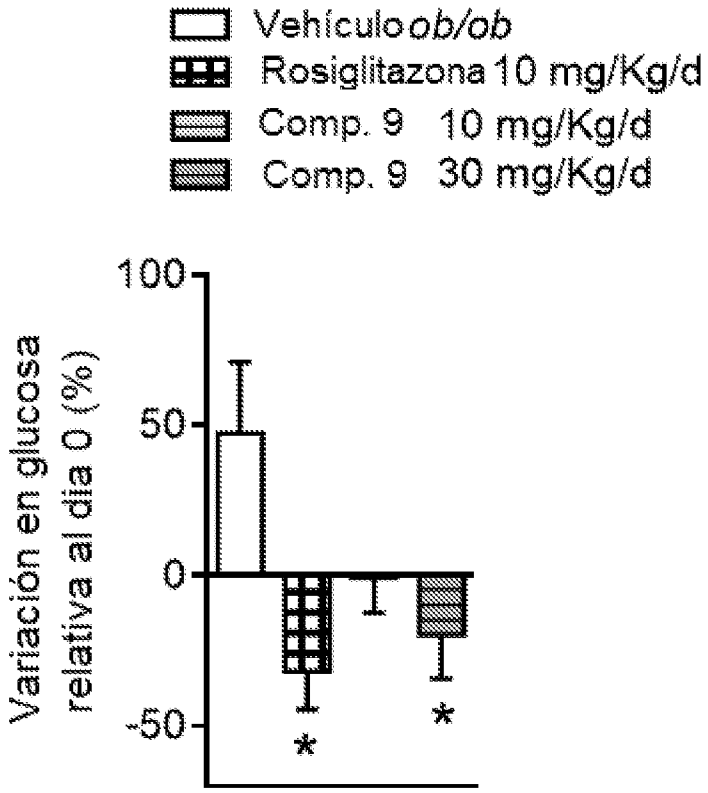
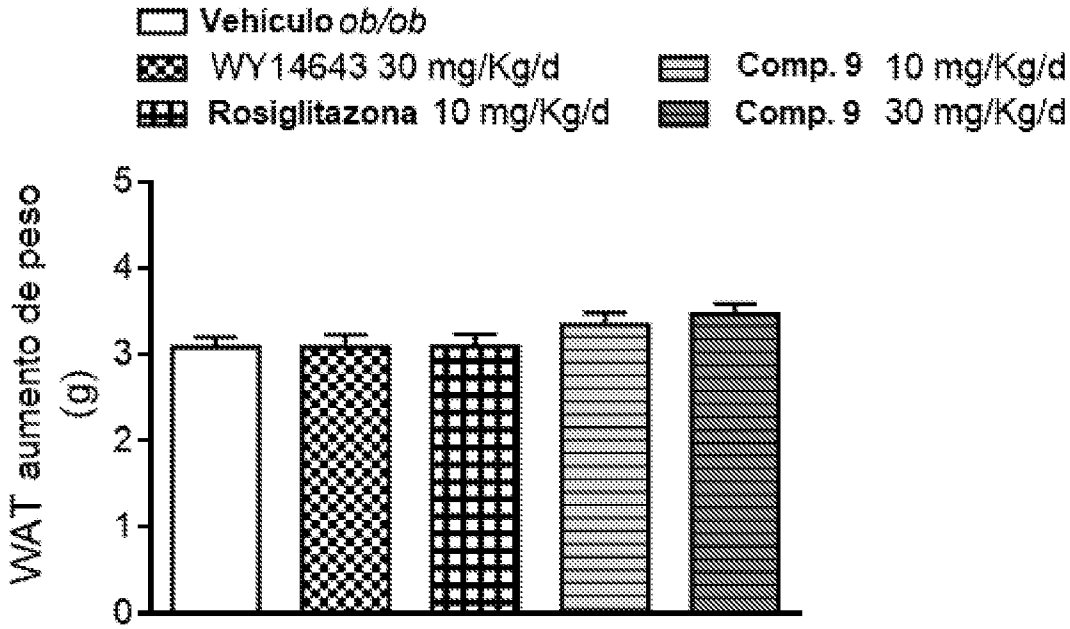


Fig. 16



5

Fig. 17

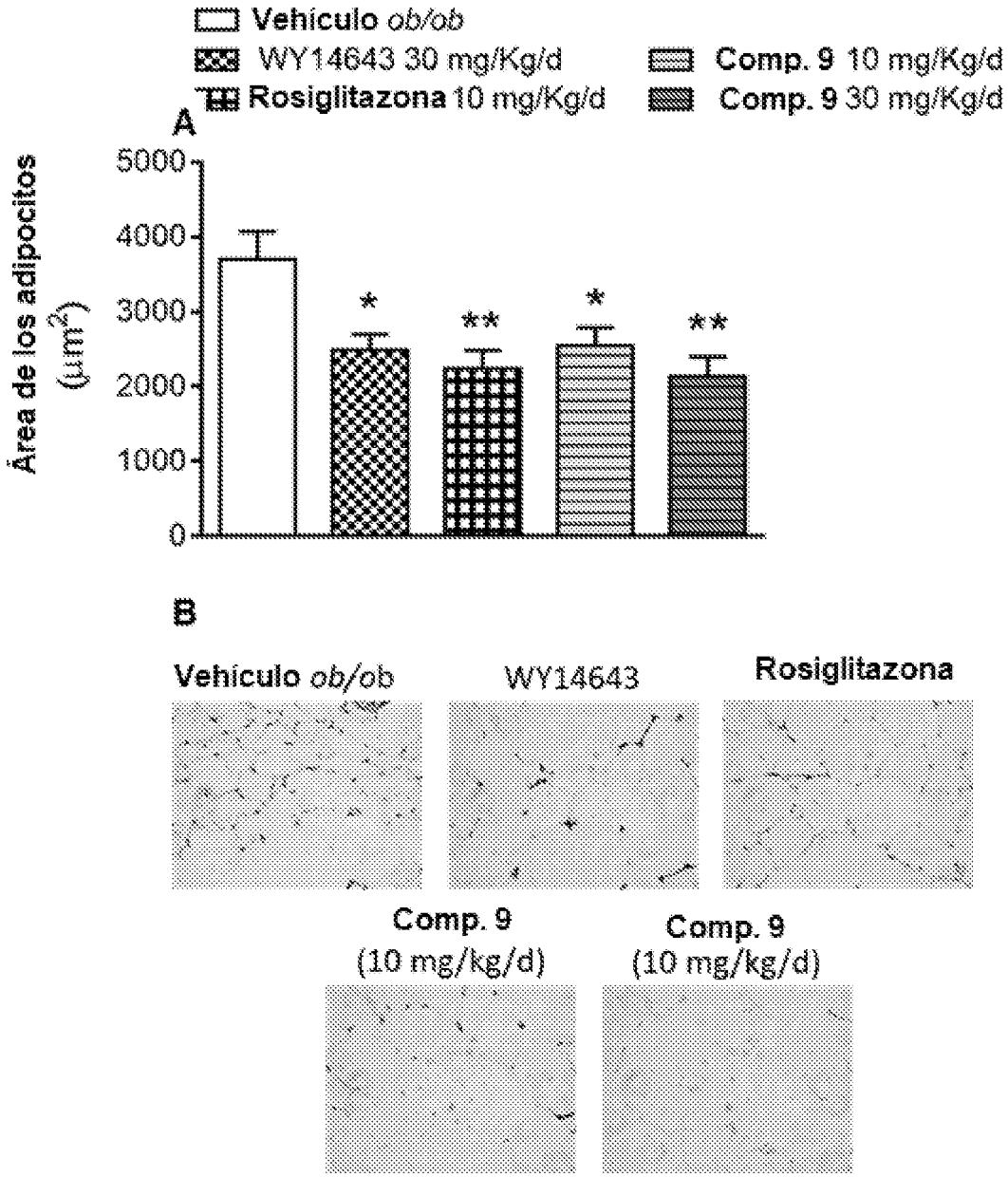

Vehículo ob/ob
WY14643 30 mg/Kg/d
Rosiglitazona 10 mg/Kg/d
Comp. 9 10 mg/Kg/d
Comp. 9 30 mg/Kg/d
A
Área de los adipocitos (µm²)
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
**
*
**
B
Vehículo ob/ob
WY14643
Rosiglitazona
Comp. 9 (10 mg/kg/d)
Comp. 9 (10 mg/kg/d)

Fig. 18

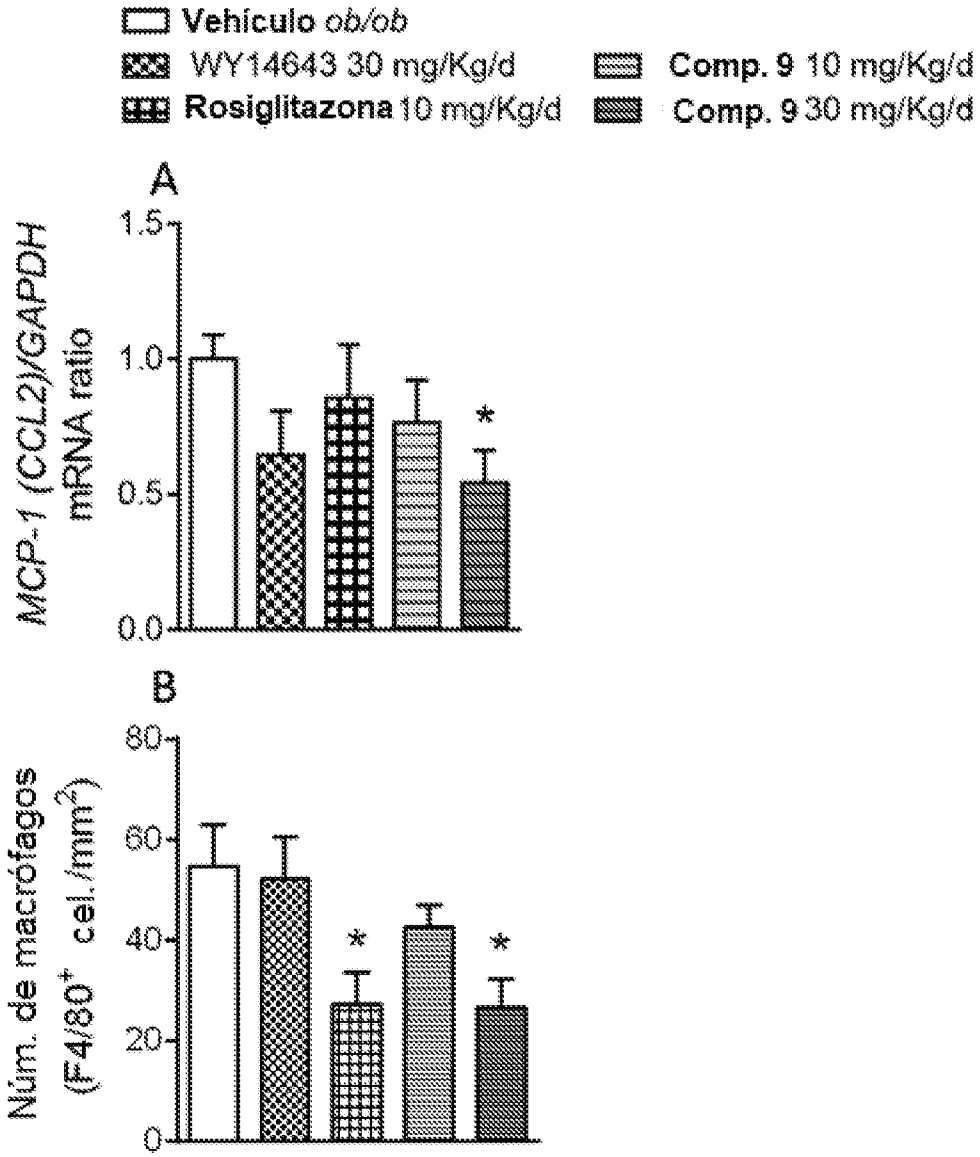

Vehículo ob/ob
WY14643 30 mg/Kg/d
Rosiglitazona 10 mg/Kg/d
Comp. 9 10 mg/Kg/d
Comp. 9 30 mg/Kg/d
A
MCP-1 (CCL2)/GAPDH mRNA ratio
1.5
1.0
0.5
0.0
*
B
Núm. de macrófagos (F4/80+ cel./mm2)
80
60
40
20
0
*
*

Fig. 19

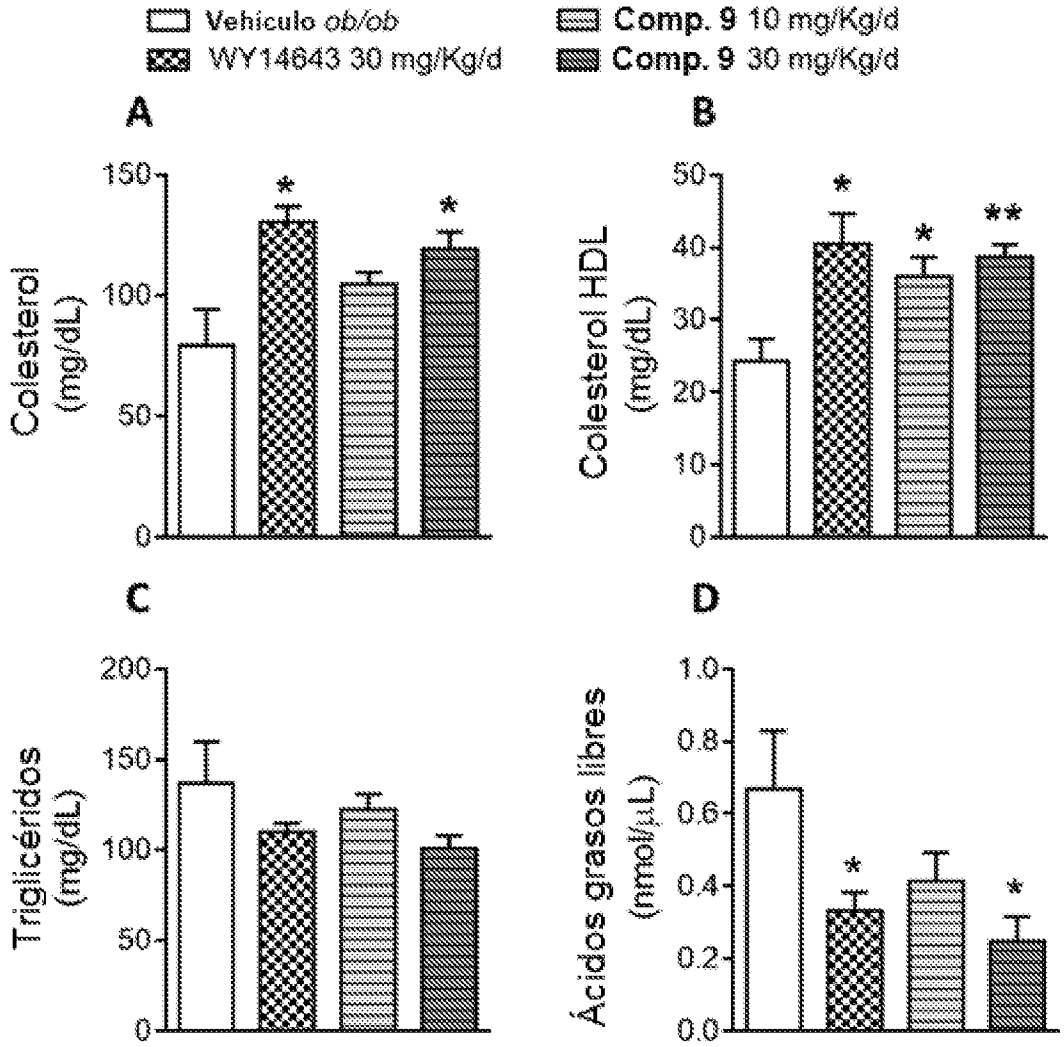

Vehículo ob/ob
WY14643 30 mg/Kg/d
Comp. 9 10 mg/Kg/d
Comp. 9 30 mg/Kg/d
A
Colesterol (mg/dL)
150
100
50
0
*
*
B
Colesterol HDL (mg/dL)
50
40
30
20
10
0
*
*
**
C
Triglicéridos (mg/dL)
200
150
100
50
0
D
Ácidos grasos libres (nmol/µL)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
*

Fig. 20

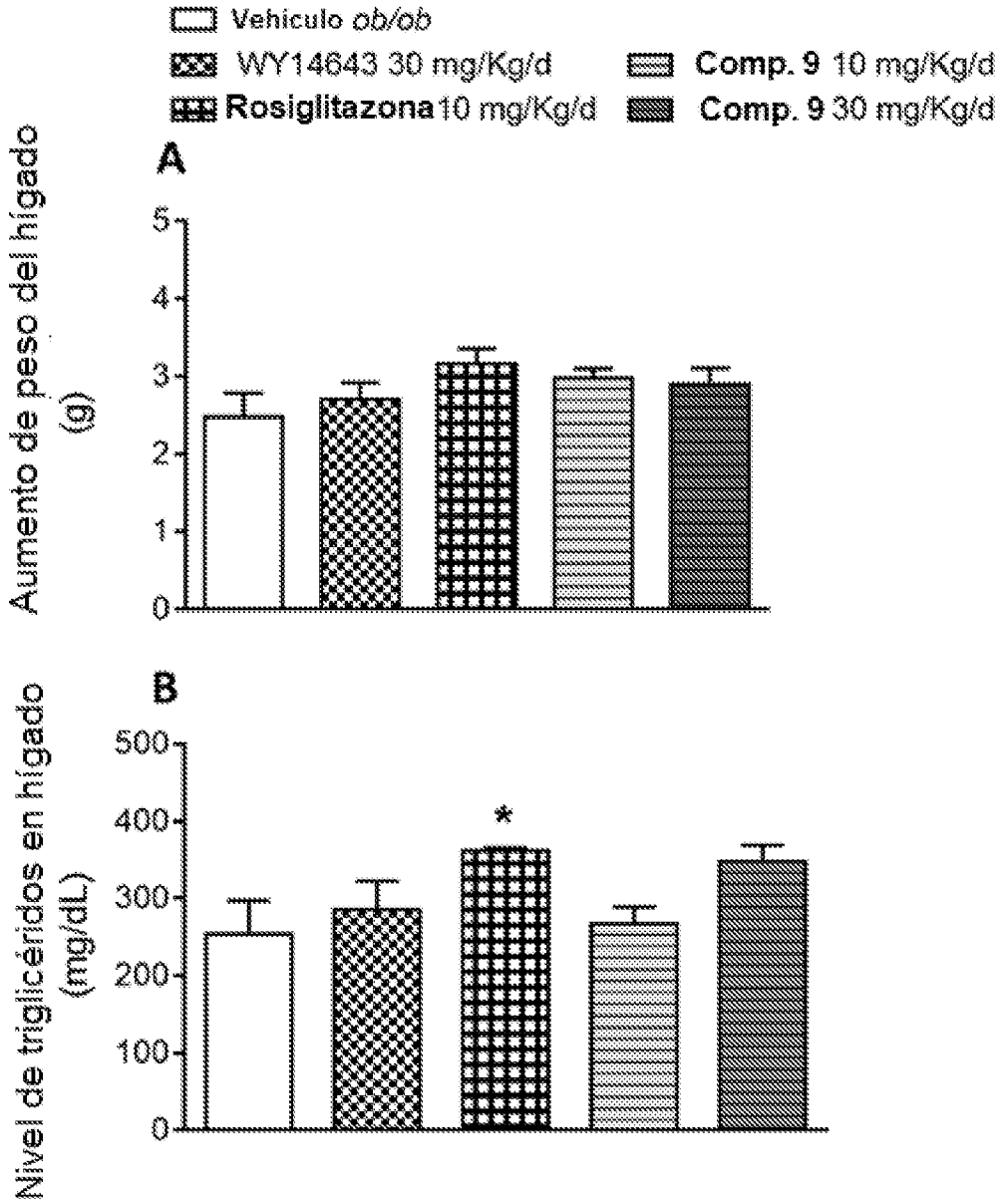
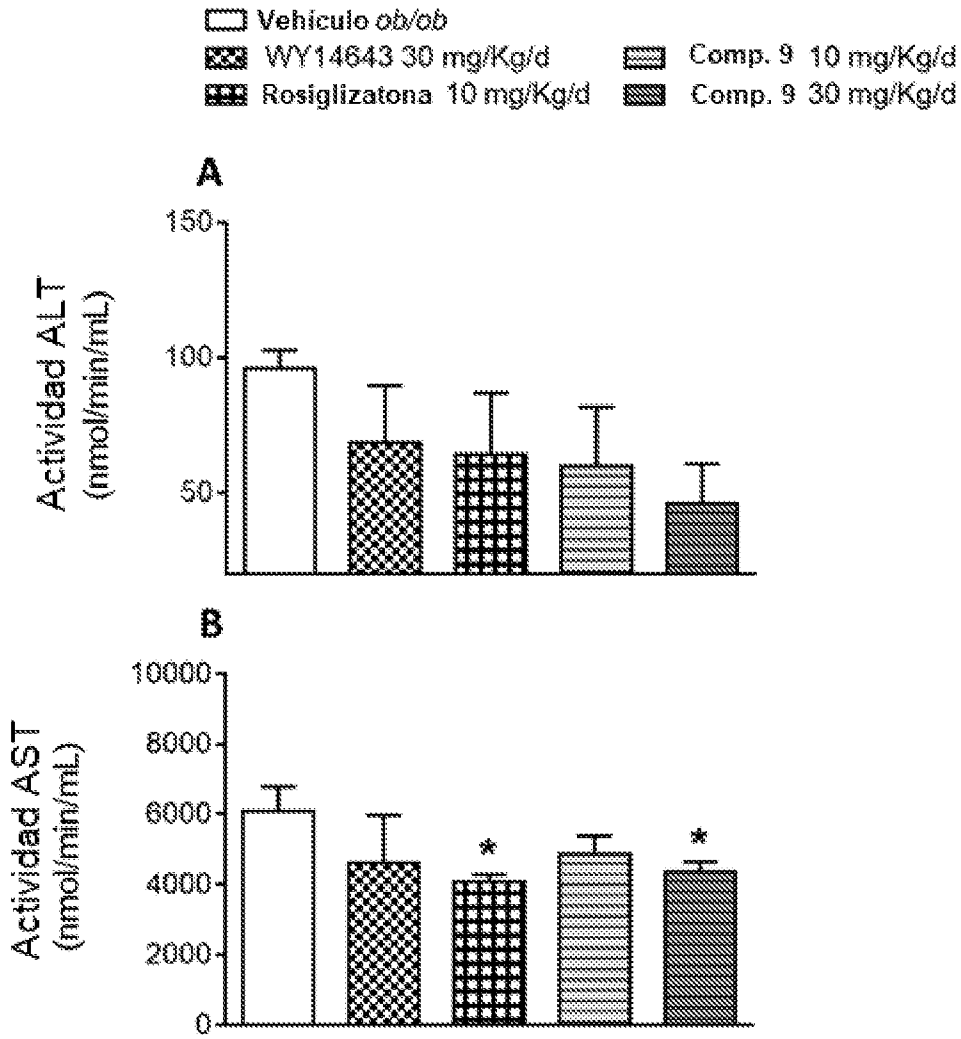

Vehiculo ob/ob
WY14643 30 mg/Kg/d
Comp. 9 10 mg/Kg/d
Rosiglitazona 10 mg/Kg/d
Comp. 9 30 mg/Kg/d
A
Aumento de peso del hígado (g)
0
1
2
3
4
5
B
Nivel de triglicéridos en hígado (mg/dL)
0
100
200
300
400
500
*

Fig. 21


Vehículo ob/ob
WY14643 30 mg/Kg/d
Rosiglizatona 10 mg/Kg/d
Comp. 9 10 mg/Kg/d
Comp. 9 30 mg/Kg/d
A
Actividad ALT (nmol/min/mL)
150
100
50
B
Actividad AST (nmol/min/mL)
10000
8000
6000
4000
2000
0
*
*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070826

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D, A61K, A61P

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

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

EPODOC, INVENES, WIPI, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAN CHEK KUN et al.. Synthetic and natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic syndrome. Expert Opinion on Therapeutic Targets MAR 2017. 28/02/2017, Vol. 21, N° 3, Pages 333-348, ISSN 1472-8222(print) ISSN 1744-7631(electronic), <DOI: doi:10.1080/14728222.2017.1280467> the whole document	1-13
A	WO 0226729 A2 (MERCK & CO INC ET AL.) 04/04/2002, the whole document	1-13

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14/05/2019	**(20/05/2019)**
Name and mailing address of the ISA/ OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Facsimile No.: 91 349 53 04	Authorized officer E. Albarrán Gómez Telephone No. 91 3493038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2018/070826

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PEARCE B C et al.. HYPOCHOLESTEROLEMIC ACTIVITY OF SYNTHETIC AND NATURAL TOCOTRIENOLS. Journal of Medicinal Chemistry 1992. 30/11/1991, Vol. 35, Nº 20, Pages 3595-3606, ISSN 0022-2623 the whole document, in especial page 3599, scheme II, composts 14b and 15 b.	1 -13
A	EP 0421419 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 10/04/1991, the whole document	1-13
A	GONZALEZ M CARMEN et al.. Polycerasoidin and polycerasoidol, two new prenylated benzopyran derivatives from Polyalthia cerasoides. Journal of Natural Products (Lloydia) 1995. 30/11/1994, Vol. 58, Nº 8, Pages 1278-1284, ISSN 0163-3864 the whole document, in especial page 1279, left column, first paragraph.	1-13
A	GONZALEZ M CARMEN et al.. Prenylated benzopyran derivatives from two Polyalthia species. Phytochemistry (Oxford) 1996. 30/11/1995, Vol. 43, Nº 6, Pages 1361-1364, ISSN 0031-9422 the whole document	1-13
P,A	SANZ M -J et al.. A novel dual PPARα and PPARγ agonist inhibit TNFα -induced mononuclear cell recruitment. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 20180801 Blackwell Publishing Ltd nld. 01/08/2018, Vol. 123, Nº Supplement 2, Pages 44, ISSN 1742-7843 (print) Abstract	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ES2018/070826

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0226729 A2	04.04.2002	PE04532002 A1	06.06.2002
		US2002082292 A1	27.06.2002
		US6645997 B2	11.11.2003
		JP2004513090 A	30.04.2004
		EP1324995 A2	09.07.2003
		CA2423141 A1	04.04.2002
		AU2001292874B B2	15.06.2006
		AU9287401 A	08.04.2002
EP0421419 A2	10.04.1991	ZA9007906 B	26.06.1991
		US5217992 A	08.06.1993
		US5348974 A	20.09.1994
		JPH03246222 A	01.11.1991
		HU207442 B	29.04.1991
		HUT54887 A	29.04.1991
		CA2026713 A1	05.04.1991

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070826

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D311/72 (2006.01)
A61K31/355 (2006.01)
A61P3/06 (2006.01)
A61P3/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070826

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C07D, A61K, A61P

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

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
EPODOC, INVENES, WIPI, REGISTRY, HCAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	TAN CHEK KUN et al. Synthetic and natural Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) agonists as candidates for the therapy of the metabolic syndrome. Expert Opinion on Therapeutic Targets MAR 2017. 28/02/2017, Vol. 21, Nº 3, Páginas 333-348, ISSN 1472-8222(print) ISSN 1744-7631(electronic), <DOI: doi:10.1080/14728222.2017.1280467> Todo el documento	1-13
A	WO 0226729 A2 (MERCK & CO INC ET AL.) 04/04/2002, Todo el documento	1 - 13

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
14/05/2019	**20 de mayo de 2019 (20/05/2019)**
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Funcionario autorizado E. Albarrán Gómez Nº de teléfono 91 3493038

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2018/070826

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	PEARCE B C et al. HYPOCHOLESTEROLEMIC ACTIVITY OF SYNTHETIC AND NATURAL TOCOTRIENOLS. Journal of Medicinal Chemistry 1992. 30/11/1991, Vol. 35, Nº 20, Páginas 3595-3606, ISSN 0022-2623 Todo el documento, en especial página 3599, esquema II, compuestos 14b y 15 b.	1 -13
A	EP 0421419 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 10/04/1991, Todo el documento	1-13
A	GONZALEZ M CARMEN et al.. Polycerasoidin and polycerasoidol, two new prenylated benzopyran derivatives from Polyalthia cerasoides. Journal of Natural Products (Lloydia) 1995. 30/11/1994, Vol. 58, Nº 8, Páginas 1278-1284, ISSN 0163-3864 Todo el documento, en especial página 1279, columna izquierda, primer párrafo.	1-13
A	GONZALEZ M CARMEN et al.. Prenylated benzopyran derivatives from two Polyalthia species. Phytochemistry (Oxford) 1996. 30/11/1995, Vol. 43, Nº 6, Páginas 1361-1364, ISSN 0031-9422 Todo el documento	1-13
P, A	SANZ M -J et al.. A novel dual PPARα and PPARγ agonist inhibit TNFα -induced mononuclear cell recruitment. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 20180801 Blackwell Publishing Ltd nld. 01/08/2018, Vol. 123, Nº Supplement 2, Páginas 44, ISSN 1742-7843 (print) Resumen	1-13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070826

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0226729 A2	04.04.2002	PE04532002 A1	06.06.2002
		US2002082292 A1	27.06.2002
		US6645997 B2	11.11.2003
		JP2004513090 A	30.04.2004
		EP1324995 A2	09.07.2003
		CA2423141 A1	04.04.2002
		AU2001292874B B2	15.06.2006
		AU9287401 A	08.04.2002
EP0421419 A2	10.04.1991	ZA9007906 B	26.06.1991
		US5217992 A	08.06.1993
		US5348974 A	20.09.1994
		JPH03246222 A	01.11.1991
		HU207442 B	29.04.1991
		HUT54887 A	29.04.1991
		CA2026713 A1	05.04.1991

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070826

CLASIFICACIONES DE INVENCIÓN

C07D311/72 (2006.01)
A61K31/355 (2006.01)
A61P3/06 (2006.01)
A61P3/10 (2006.01)