



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 633**

51 Int. Cl.:  
**C07H 15/04** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61K 31/7048** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07711956 .8**  
96 Fecha de presentación : **15.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1996603**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2008**

54 Título: **Antagonistas de lípidos A con actividad antichoque séptico, antiinflamatoria, antiisquémica y analgésica.**

30 Prioridad: **22.03.2006 IT MI06A0530**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.01.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.01.2010**

73 Titular/es:  
**Università Degli Studi Di Milano - Bicocca  
Piazza dell'Ateneo Nuovo, 1  
20126 Milano, IT**

72 Inventor/es: **Peri, Francesco;  
Nicotra, Francesco Maria;  
Costa, Barbara, Simona y  
Granucci, Francesca**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 331 633 T3

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

## DESCRIPCIÓN

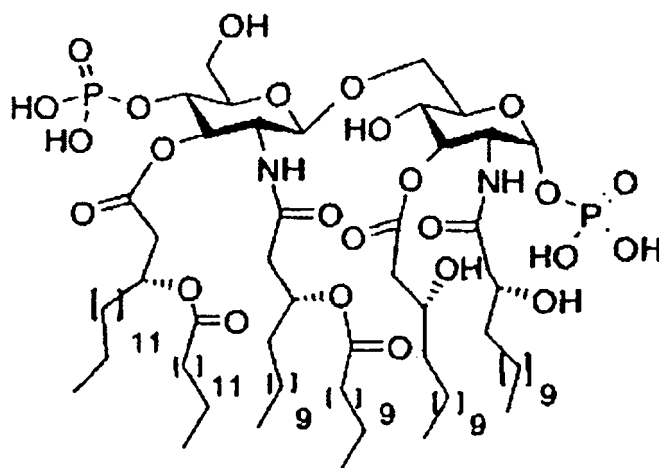
Antagonistas de lípidos A con actividad antichocho séptico, antiinflamatoria, antiisquémica y analgésica.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos capaces de inhibir el efecto tóxico del lípido A, la actividad inflamatoria del  $\lambda$ -carragenano y para prevenir patologías mediadas por el receptor TLR-4.

10 **Antecedentes de la invención**

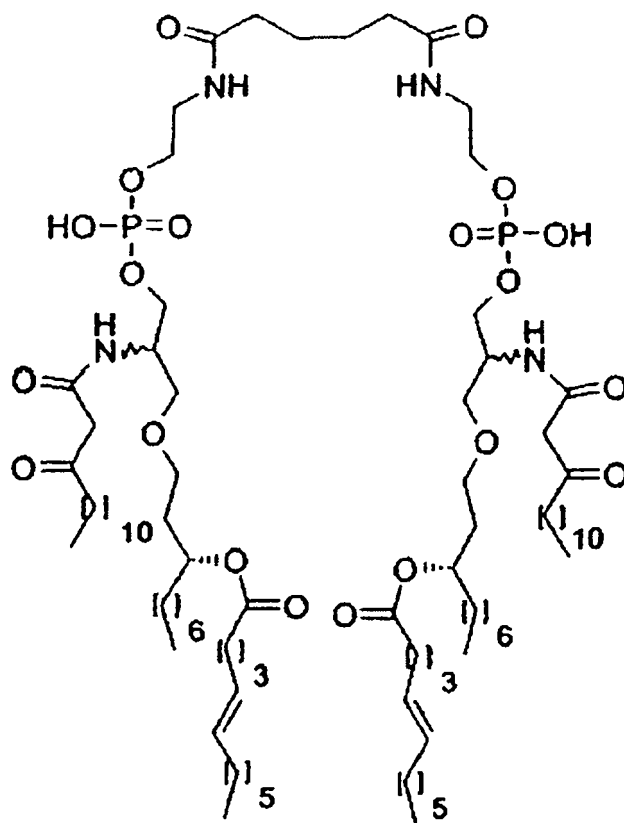
La sepsis y el choque séptico son síndromes clínicos graves relacionados con unas altas tasas de mortalidad provocadas por una respuesta inflamatoria sistémica descontrolada a lipopolisacáridos (LPS) bacterianos en la sangre del paciente afectado. Los LPS son componentes de la pared celular de bacterias Gram-negativas, que consisten en una cadena de oligosacárido hidrófila unida covalentemente a un lipodisacárido denominado lípido A. El lípido A es el resto de anclaje a la membrana del LPS y se cree que es la porción biológicamente activa (principio tóxico) del LPS.

40 **Lípido A**

El lípido A activa la producción de una serie de moléculas antiinflamatorias endógenas, principalmente citoquinas (en particular TNF $\alpha$ ) y quimioquinas, que son mediadores importantes de la inmunidad innata. La cascada de reacciones que conduce a la producción de estos mediadores comienza con la formación de un complejo entre el LPS y una proteína plasmática, la proteína de unión a LPS (LBP); después, el complejo LPS:LBP se une a la proteína CD14, que está libre y también unida a la membrana, para formar un complejo trimolecular CD14:LBP:LPS. En esta etapa el receptor de tipo Toll-4 (TLR-4) se asocia al complejo trimolecular CD14:LBP:LPS y la posterior unión a la proteína MD-2 activa la cascada de señalización que conduce a la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B y a la expresión de citoquinas y genes de quimioquina. Además, la activación de TLR-4 provoca la producción de glutamato, prostaglandinas y óxido nítrico desde las células gliales. Estos agentes entonces son capaces de potenciar aún más la activación glial y la producción de mediadores inflamatorios que sensibilizan las neuronas del cuerno dorsal contribuyendo con ello al dolor neuropático. El papel clave del TLR-4 en la activación de la microglía y, por consiguiente, en la etiología del dolor neuropático se ha demostrado muy recientemente [F.Y. Tanga *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2005, 102, 5856-5861]. Además, las reacciones inflamatorias mediadas por TLR-4 desempeñan un papel importante en las lesiones por reperusión en la isquemia cerebral [C.X. Cao *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, 353, 509-514].

Debido a su papel en el mecanismo molecular descrito anteriormente, se ha invertido una considerable atención al lípido A en farmacología, puesto que es una de las sustancias conocidas con la mayor actividad proinflamatoria. Durante algún tiempo se han empleado lípidos A de diferentes orígenes bacterianos, o sus agonistas sintéticos, que inducen una actividad coestimuladora, mezclados con proteínas antigénicas (u otros antígenos sintéticos con estructura de azúcar) para aumentar la inmunogenicidad de estas últimas para el desarrollo de vacunas. Los primeros se conocen como adyuvantes y son necesarios para inducir la producción de anticuerpos con una valoración suficientemente alta y dirigidos contra el antígeno implicado. Por el contrario, se han empleado compuestos sintéticos capaces de inhibir el LPS y el lípido A (antagonistas) como compuestos de partida para el desarrollo de fármacos contra el choque séptico.

La estructura química de los lípidos A de diverso origen bacteriano se diferencia en el número de ramificaciones y de insaturaciones en las cadenas lipófilas. Sin embargo, estudios sistemáticos han demostrado que algunas características estructurales son comunes a todas las variantes de lípido A [Rietschel, E.T. *et al.*, The FASEB J., 1994, 8, 217-225]. Según su estructura tridimensional, los lípidos A interaccionan de diferentes formas con TLR-4. La estructura esencial responsable del efecto inflamatorio y endotóxico del lípido A comprende un disacárido GlcNAc $\beta$ (1-6) GlcNAc, dos ésteres fosfóricos en las posiciones C-1 y C-4', y un número apropiado de cadenas lipófilas unidas a las posiciones C-2, C-3, C-2' y C-3'. Basándose en esta relación entre estructura y actividad se han preparado análogos de lípidos A sintéticos que han demostrado ser activos como agonistas o antagonistas. Estos compuestos comparten una estructura disacárida, con la única excepción del compuesto ER-112022,



ER-112022

1

que es un dímero fosfolipídico en el que dos grupos fosfato están unidos mediante un espaciador lineal supuestamente dotado con una alta movilidad conformacional. Aunque este compuesto carece de un núcleo disacárido posee una fuerte actividad proinflamatoria, similar a la del lípido A. La actividad biológica del lípido A también se correlaciona con su forma tridimensional. Esta forma está determinada principalmente por el número, la longitud y la disposición de las cadenas lipófilas, así como por el número y la distribución de las cargas negativas sobre los grupos fosfato. Los lípidos A con una distribución asimétrica de las cadenas (de tipo 4+2) tienen una forma tridimensional troncocónica y tienen actividad inflamatoria (agonistas), mientras que los variantes con una distribución simétrica (de tipo 2+2) tienen una forma cilíndrica y propiedades antagonistas. Los lípidos A con forma cónica interaccionan con TLR-4 e inducen un cambio conformacional que activa la transmisión de señales dentro de las células, mientras que los lípidos A con forma cilíndrica se unen al mismo receptor sin inducir ningún cambio conformacional y, por tanto, sin activar ninguna señal. Por último, los lípidos A con una forma intermedia ligeramente cónica, debido a una disposición (3+2) de las cadenas, como el lípido A de *P. gingivalis*, tienen una débil actividad proinflamatoria debida a la activación de otro TLR (TLR-2) y, en algunos casos, por ejemplo en el caso del lípido A de *R. sphaeroides* y *R. capsulatus*, tienen propiedades antagonistas. Estos variantes de lípidos A, denominados habitualmente variantes de lípidos A no tóxicos, están exentos de actividad proinflamatoria y son capaces de inhibir el lípido A de *E. coli in*

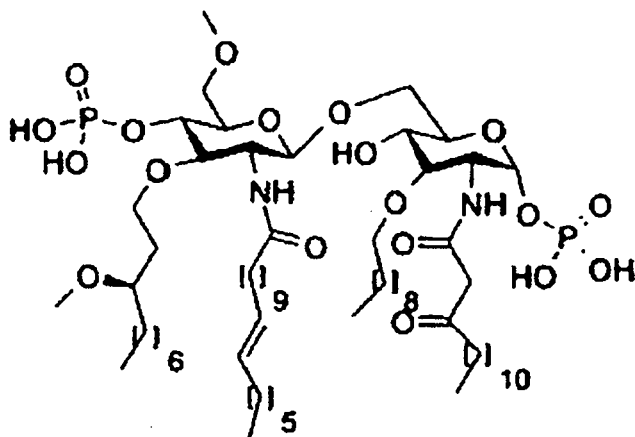
*vitro* e *in vivo*. La estructura química de ambos compuestos conduce al diseño de antagonistas de lípidos A con una disposición de las cadenas simétrica (2+2), entre ellos el compuesto E5564 (2)

5

10

15

20

**E5564****2**

25

30

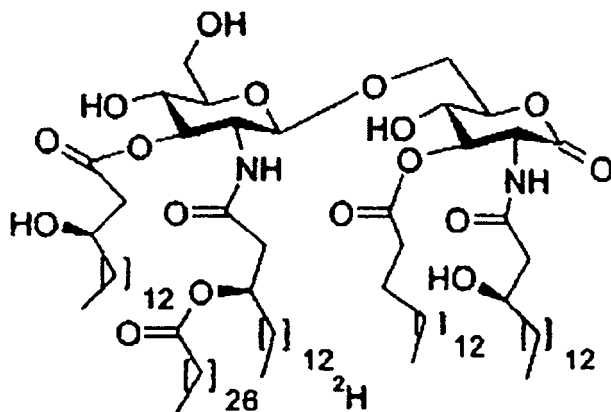
que muestra una potente actividad antagonista y que en la actualidad está en fase clínica. En fechas recientes, se ha descubierto que un análogo sintético del lípido A de la bacteria fijadora de nitrógeno *R. sin-1*, de fórmula (3)

35

40

45

50

**3**

55

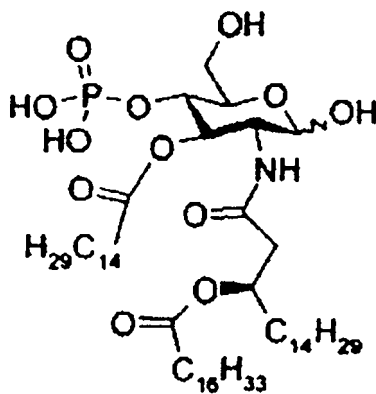
60 en capaz de antagonizar el efecto del lípido A de *E. coli* en experimentos *in vitro* con líneas celulares humanas [A.V. Demchenko *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 6103-6112]. Merece la pena advertir que el disacárido presente en la estructura de este compuesto tiene características exclusivas, es decir, no contiene grupos fosfato y contiene el resto monosacárido 2-aminogluconolactona. Por último, una publicación reciente indica que un disacárido con un enlace N(OMe)  $\beta$ -glicosídico no natural y que tiene una disposición simétrica (2+2) de las cadenas lipófilas C14 unidas a través de enlaces éter a los grupos hidroxilo del disacárido Glc-Glc es capaz de inhibir, de una manera dependiente de la dosis, la acción inflamatoria del lípido A de *E. coli* en macrófagos murinos de la línea celular MT2 [F. Peri *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 2008, 14(1), 190-199].

Se ha indicado que el lípido X, un monosacárido precursor del lípido A, antagoniza el efecto celular del lípido A (B.L. Ray *et al.*, J. Biol. Chem., 1984, 259, 4852-4859). Sin embargo, una publicación posterior indica que la actividad observada no era debida al lípido X en la forma de monosacárido sino a trazas de disacáridos derivadas de su condensación espontánea [H. Aschauer *et al.*, J. Biol. Chem., 1990, 265, 9159- 9164].

5

Se conocen muy pocos compuestos que carezcan de las actividades de mantenimiento de la estructura de disacáridos como antagonistas o agonistas del lípido A. Los análogos del lípido A de tipo monosacárido, entre ellos el compuesto GLA-58, a pesar de la ausencia del segundo resto monosacárido no reductor, conservan actividades miméticas de LPS [R. Tamai, Y. Asai, M. Hashimoto, K. Fukase, S. Kusumoto, H. Ispida, M. Kiso, T. Ogawa, Immunology, 2003, 110, 66-72].

10



GLA-58

30

Un panel de glucosilaminas N-aciladas reductoras que portan un grupo fosfato en C4 y cadenas de amida y éster de ácido 3-hidroxitetradecanoico lineal o ramificado en C2 y C3 fue reconocido por macrófagos murinos como agonistas y antagonistas de LPS. Además, el compuesto GLA-58 demuestra ser activo como antagonista de LPS en células humanas.

35

También se ha indicado recientemente [R.F. Tsuji *et al.*, Clin. Exp. Allergy, 2003, 33, 249-258] que unos poligalactanos conocidos como carragenanos ( $\kappa, \lambda$ ), que son capaces de inducir una inflamación no específica en el ser humano y en animales, inducen la producción de citoquinas en macrófagos que actúan sobre TLR-4, el mismo receptor implicado en la vía inflamatoria del LPS y del lípido A. Las sustancias capaces de inhibir la acción inflamatoria y tóxica del lípido A también son, por tanto, inhibidores potenciales de la acción inflamatoria de los carragenanos.

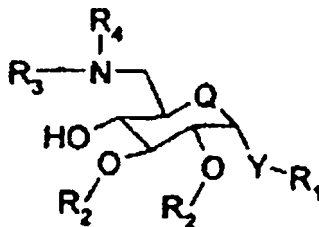
40

#### Descripción de la invención

45

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I)

50



55

(I)

60

en la que:

65

Q representa oxígeno;

Y representa oxígeno;

# ES 2 331 633 T3

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> y fenilo;

R<sub>2</sub> son ambas cadenas de alquilo C<sub>14</sub>;

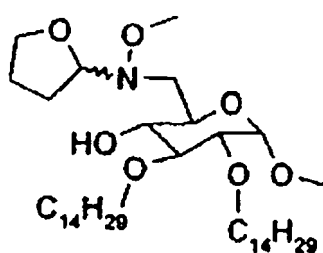
5 R<sub>3</sub> es tetrahidrofuran-1-ilo o ciclopentilo;

R<sub>4</sub> se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o un grupo R<sub>4</sub>'X, en el que

R<sub>4</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> y X es un átomo de oxígeno o azufre;

10 y sus sales de ácidos fisiológicamente aceptables o sus sales de amonio cuaternario.

15 También se prefieren particularmente los siguientes compuestos: metil 6-desoxi-6-[N-(1'-tetrahidrofuranyl)-N'-metoxiamino]-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Ia)

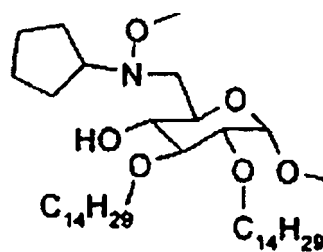


(Ia) ;

30

metil 6-desoxi-6-[N-(ciclopentil)-N'-metoxiamino]-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Ib)

35

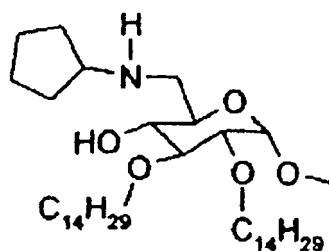


(Ib) ;

50

metil 6-desoxi-6-ciclopentilamino-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Ic)

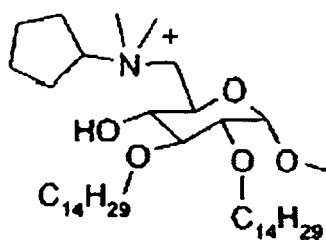
55



(Ic)

## ES 2 331 633 T3

metil 6-desoxi-6-*N,N',N''*-dimetilciclopentilamonio-2,3-di-*O*-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Id)



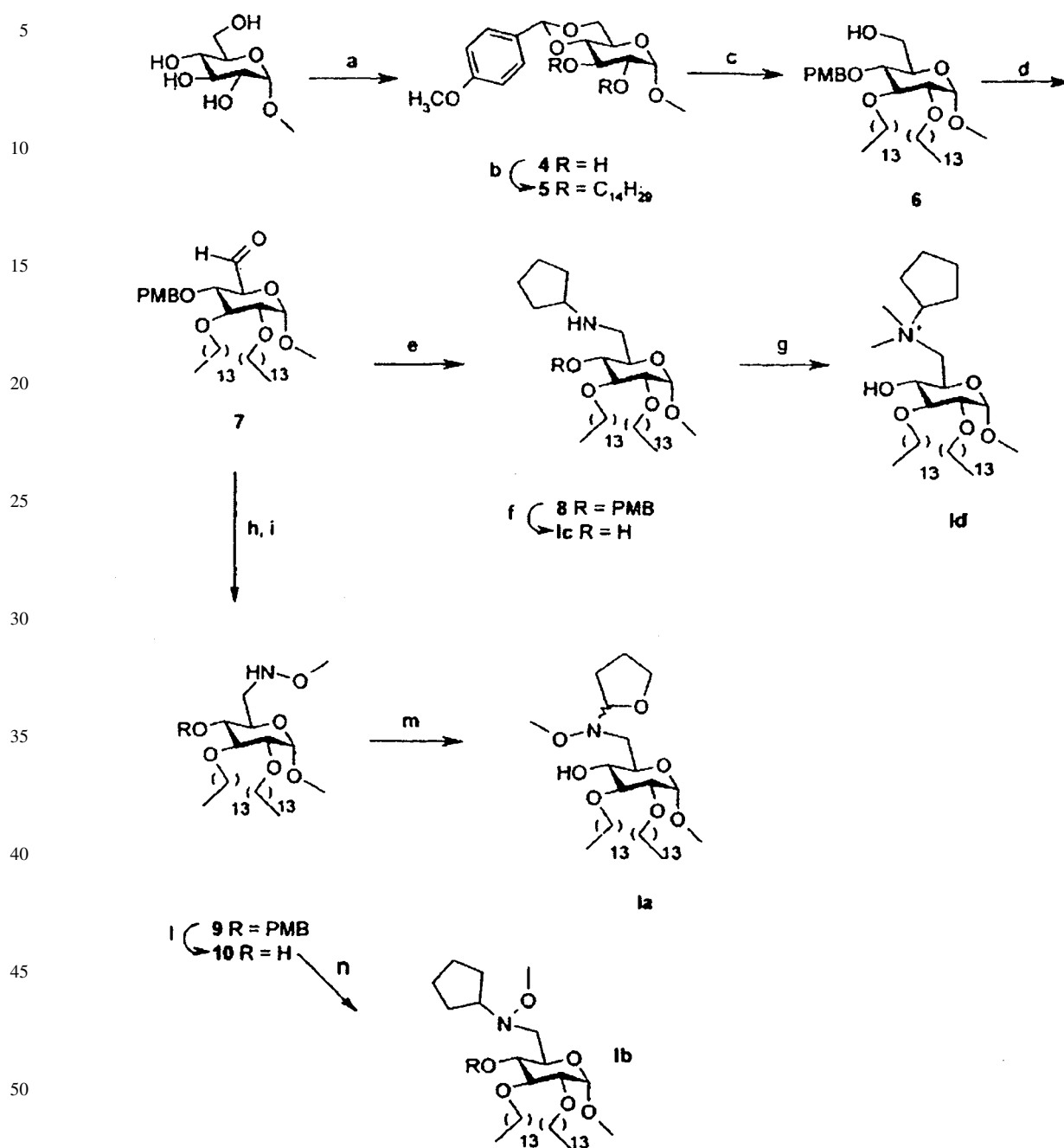
(Id)

Estos compuestos pueden prepararse como se ilustra en el siguiente esquema 1, mediante la conversi3n del metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido disponible en el mercado en metil 4,6-*O*-(4-metoxibenciliden)- $\alpha$ -D-glucopiranosido 4 (rendimiento de 94%) mediante un tratamiento con anisaldehido dimetilacetal (ADMA) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La alquilaci3n de 4 con bromuro de tetradecilo en presencia de NaH produce 5 (rendimiento de 74%), cuyo anillo de bencilideno es abierto regioselectivamente mediante un tratamiento con  $\text{LiAlH}_4$  y  $\text{AlCl}_3$  obteniendo con ello 6 (rendimiento de 86%). La oxidaci3n con peryodinato de Dess-Martin del grupo hidroxilo libre sobre C6 de 6 produce el correspondiente aldehido 7 que puede convertirse directamente sin aislamiento en 8 mediante aminaci3n reductora utilizando ciclopentilamina y  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (rendimiento de 75% a lo largo de dos etapas). La eliminaci3n del grupo C4 *p*-metoxibencilo (PMB) de 8 en condiciones  $\text{H}^+$  produce (Ic) (rendimiento de 80%), que puede convertirse en la correspondiente sal de amonio cuaternario mediante una reacci3n con un yoduro de alquilo; un tratamiento con yoduro de metilo en presencia de carbonato de sodio produce el compuesto (Id) con un rendimiento de 94%. Como alternativa, el aldehido 7 puede hacerse reaccionar con hidrocloreuro de *O*-metilhidroxilamina en piridina, produciendo la correspondiente C6 *O*-metil oxima con un rendimiento de 65% a lo largo de dos etapas. La metiloxima entonces se reduce a metilhidroxilamina 9 mediante un tratamiento con cianoborohidruro de sodio en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (rendimiento de 92%). El grupo  $\text{PMB}$  puede escindirarse con TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para producir 10 (rendimiento de 90%) que, por  $\text{H}^+$ , se hace reaccionar con dihidrofurano (DHF) en presencia del catalizador  $\text{H}^+$  *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS) para producir (Ia) con un rendimiento de 65%. Como alternativa, el compuesto 10 puede hacerse reaccionar con bromociclopentano en presencia de una base, como diisopropiletilamina (DIPEA) para obtener el compuesto (Ib).

El compuesto (Ia) es quimicamente inestable debido a la presencia del grupo *N,O*-acetal en C6 y se obtiene como una mezcla de dos diastereois3meros con estereoquimica opuesta del  $\alpha$  del anillo de tetrahydrofurano. El compuesto (Ib) es m3s estable que el compuesto (Ia) y se obtiene en forma de un is3mero puro.

(Esquema pasa a p3gina siguiente)

## Esquema



Esquema 1. Reactivos y condiciones: a) ADMA, CSA, DMF, 94%; b)  $C_{14}H_{29}Br$ , NaH, DMF, 74%; c)  $LiAlH_4$ ,  $AlCl_3$ ,  $CH_2Cl_2/Et_2O$ , 86%; d) peryodinano de Dess-Martin,  $CH_2Cl_2$ ; e) ciclopentilamina,  $NaBH_3CN$ , AcOH,  $CH_2Cl_2$ , MeOH, 75% a lo largo de dos etapas; f) TFA,  $CH_2Cl_2$ , 80%; g)  $CH_3I$ ,  $Na_2CO_3$ , DMF, 94%; h) hidrocloreuro de *O*-metilhidroxilamina, piridina, 65% de 6; i)  $NaBH_3CN$ , AcOH glacial, 92%; l) TFA,  $CH_2Cl_2$ , 90%; m) DHF, PPTS,  $CH_2Cl_2$ , 65%; n) bromociclopentano, DIPEA.

Otros compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse de una manera similar comenzando a partir de glucopiranososa mediante reacciones adecuadas de funcionalización y de protección-desprotección, que son muy conocidos por los químicos expertos.

Los compuestos de fórmula (I) se comportan como inhibidores del lípido A y de  $\lambda$ -carragenanos, y han demostrado ser capaces de ejercer efectos antiinflamatorios, antiisquémicos y analgésicos. Por tanto, los compuestos de la invención pueden utilizarse para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de estados infla-

matorios, isquemia y dolor, en particular dolor neuropático. Estas composiciones pueden prepararse con técnicas y excipientes convencionales, como aquellas descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed. Mack Pub., N.Y., EEUU.

5 La invención a continuación se ilustrará con más detalle en la siguiente sección experimental.

### Descripción de las figuras

10 Figura 1. Actividad antagonista de los compuestos Ia, Ic y Id sobre la producción de citoquinas estimulada por lípido A en células BMDC, BMØ y D1. La producción de TNF $\alpha$  se midió en los sobrenadantes 24 h después. Desde la derecha: lípido A (0,5  $\mu$ M), células tratadas sólo con lípido A; DMSO: células incubadas en presencia de medio completo más DMSO; inhibidor 50  $\mu$ M, células tratadas sólo con los monosacáridos Ia, Ic y Id; otras columnas, lípido A + compuestos Ia, Ic y Id en dosis crecientes. Los datos representan las medias y las desviaciones estándar de pocillos por triplicado. Esto es una representación de tres experimentos independientes. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

15 Figura 2. Selectividad por TLR-4 del monosacárido Id. En los paneles superiores, la actividad antagonista del compuesto Id se investigó ensayando su capacidad para interferir con la producción de IL-1 $\beta$  24 h después de la estimulación con lípido A. La IL-1 $\beta$  se midió en los sobrenadantes mediante ELISA. Lípido A (0,5  $\mu$ M), células tratadas sólo con lípido A; NT: células incubadas en presencia de medio completo; DMSO: células incubadas en presencia de medio completo más DMSO; inhibidor 50  $\mu$ M, células tratadas sólo con el monosacárido Id; otras columnas: lípido A + compuesto Id en dosis crecientes. Los datos representan las medias y las desviaciones estándar de pocillos por triplicado. Esto es una representación de tres experimentos independientes. En los paneles inferiores, la producción de TNF $\alpha$  se mide mediante ELISA 24 h después de la estimulación con CpG (selectivo para TLR-9) o PAM<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> (selectivo para TLR-2) en presencia de compuesto Id. NT: células incubadas en presencia de medio completo más DMSO; otras columnas: células tratadas con CpG o PAM<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> en presencia o en ausencia del compuesto Id a la concentración indicada. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

25 Figura 3. El compuesto Id no induce la muerte de M $\Phi$  y DC. Células DC y M $\Phi$  se dejaron sin tratar o se trataron durante 24 h con el compuesto Id a las concentraciones indicadas. Las células entonces se analizaron mediante FACS para la presencia de células doble positivo para anexina V y yoduro de propidio (PI). Panel superior, porcentaje de células doble positivo para anexina V y PI. Panel inferior, porcentaje de células doble negativo para anexina V y PI.

30 Figura 4. Actividad antagonista selectiva de Id sobre el receptor TLR-4. Células HEK-293 transfectadas de forma estable con el gen humano TLR-4A (izquierda) o TLR9 (derecha) se trataron respectivamente con lípido A solo o con lípido A en presencia del monosacárido Id o con CpG sólo o con CpG en presencia de monosacárido Id. La activación de NF- $\kappa$ B se evaluó en el extracto nuclear 2 h después y se expresa como densidad óptica (OD) a 450 nm. NT: células no tratadas. Los datos representan las medias y las desviaciones estándar de pocillos por triplicado. Esto es una representación de tres experimentos independientes. \*, p<0,001 frente a células NT; °, p<0,001 frente a lípido A solo (ANOVA; ensayo de Tukey).

35 Figura 5. Efecto del compuesto Id administrado a diario en ratones CCI durante 1 semana desde el día después de la cirugía sobre la hiperalgesia térmica (A) y la alodinia mecánica (B). \*, P<0,001 frente a CCI (ANOVA; ensayo de Tukey).

40 Figura 6. Efecto del compuesto Id (10 mg/kg) administrado i.p., 30 min antes de la oclusión de la carótida bilateral sobre la potencia espectral total media de EEG de la corteza evaluado como la diferencia ( $\Delta$ %) desde el valor preisquémico en jerbos. \*\*\*, P<0,001 comparado con el grupo de simulación, el mismo tiempo; \$\$\$, P<0,001 comparado con el grupo con vehículo, mismo tiempo (ANOVA de dos vías, seguido de un ensayo de Bonferroni).

45 Figura 7. Efecto de diferentes dosis del compuesto Id sobre el edema inducido por carragenano en ratones medido 4 h después de la exposición y expresado como diferencia entre el volumen de la pata tratada frente a la pata contralateral. El tratamiento con indometacina (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) representa el control positivo.

50 Figura 8. Efecto del tratamiento con el compuesto Id en ratones sobre la producción de óxido nítrico medida en un homogeneizado de pata 4 h después de la exposición y expresado como contenido en nitrito/nitrato, los productos finales del metabolismo del óxido nítrico.

### Sección experimental

#### 60 Química

#### Procedimientos generales

65 Todos los disolventes se secaron sobre tamices moleculares (4 A, Fluka) durante al menos 24 h antes del uso. Cuando se requirieron condiciones secas, las reacciones se realizaron bajo una atmósfera de argón. Una cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas de gel de sílice 60 F254 (Merck) con detección de UV, o utilizando una disolución de revelado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc./EtOH/H<sub>2</sub>O (5:45:45), seguido de un calentamiento a 180°C. La cromatografía

## ES 2 331 633 T3

en columna de resolución rápida se realizó sobre gel de sílice de malla 230-400 (Merck). Se utiliza como eluyente mezclas de éter de petróleo (intervalo de punto de ebullición 40-60°C) y acetato de etilo. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se registraron en un instrumento MERCURY 400 MHz Varian a 300 K. Los desplazamientos químicos se han indicado en ppm campo abajo del TMS como patrón interno; las señales de carbono de las cadenas  $\text{C}_{14}$  lineales en C-2 y C-3 se han omitido en la asignación de los espectros de carbono.

Los espectros de masas se registraron en un instrumento de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR) (modelo APEXII, Bruker Daltonics), equipado con un imán 4,7 T (Magnex).

Las rotaciones ópticas se midieron a temperatura ambiente, utilizando la línea D de sodio, en un polarímetro electrónico P3002 (A. Krüss, Alemania).

Etapas a)

Metil 4,6-*O*-(4-metoxibenciliden)- $\alpha$ -D-glucopiranosido (4)

Una disolución de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido (10 g, 51,5 mmol) en dimetilformamida (DMF, 50 ml) se añadió a una cantidad catalítica de ácido canforsulfónico (CSA) y anisaldehído dimetilacetal (ADMA, 10 ml, 51,5 mmol) y la mezcla se mantuvo bajo agitación magnética y a un vacío bajo para eliminar el metanol formado durante la reacción de condensación. Después de 40 min el disolvente se eliminó mediante evaporación. El residuo se añadió a una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  y la mezcla difásica resultante se mantuvo bajo agitación vigorosa durante una hora. El precipitado resultante se filtró y se lavó con una disolución de bicarbonato enfriada en hielo (100 ml). El residuo se trituró con hexano para producir el compuesto 4 como un sólido blanco (15 g, 94%). 4:  $R_f = 0,31$  (EtOAc/MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  7:2:1).

Etapas b)

Metil 4,6-*O*-(4-metoxibenciliden)-2,3-di-*O*-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (5)

Una disolución de 4 (8 g, 25,6 mmol) en DMF (80 ml) se añadió con agitación a hidruro de sodio en porciones (suspensión al 60% en aceite mineral, 6,4 g, 160 mmol). Después se añadió bromuro de tetradecilo (38 ml, 128 mmol) gota a gota y se continuó la agitación a 60°C durante al menos 12 horas, después la mezcla se enfrió y se añadió a metanol (20 ml), y la disolución resultante se mantuvo en agitación durante 20 minutos más para hidrolizar el exceso de hidruro de sodio. Los disolventes se retiraron mediante evaporación y el residuo se disolvió en diclorometano (500 ml), y después se añadió a una disolución acuosa de ácido cítrico (400 ml). Después de la separación de la fase acuosa, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. Después de la purificación del residuo mediante una cromatografía de resolución rápida (eluyente: éter de petróleo/AcOEt 85:15) se obtuvo el compuesto 5 como un sólido oleoso incoloro (13,3 g, 74%). 5:  $R_f = 0,32$  (éter de petróleo/AcOEt 9:1);  $[\alpha]_D^{23} = +23^\circ$  (c = 1 en  $\text{CHCl}_3$ ); RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,40-6,85 ( $\text{A}_2\text{X}_2\text{q}$ , 4H, aromático), 5,48 (s, 1H,  $\text{OCH}_3$ ), 4,77 (d,  $J = 3,7$  Hz, H-1), 4,24 (dd,  $J = 9,7, 4,4$  Hz, 1H, H-6a), 3,80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,77-3,60 (m, 8H), 3,47 (t,  $J = 9,3$  Hz, 1H), 3,42 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,34 (dd,  $J = 9,3, 3,7$  Hz, 1H, H-2), 1,5-1,6 (m, 4H, H- $\beta$ ), 1,22 (sa, 44H,  $\text{CH}_2$ ), 0,85 (t,  $J = 5,8$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ ); RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 161,2 ( $\text{C}_{ar}$ ), 127,4 ( $\text{C}_{ar}$ ), 128,4 ( $\text{C}_{ar}$ ), 114,0 ( $\text{C}_{ar}$ ), 105,1, 98,4 (C-1), 83,4, 80,8, 74,5 ( $\text{OCH}_2$ ), 73,5 ( $\text{OCH}_2$ ), 71,6 ( $\text{OCH}_2$ ), 71,2, 70,2 (C-6), 69,6, 57,7 ( $\text{OCH}_3$ ), 55,6 ( $\text{OCH}_3$ ), 32,4, 30,8, 30,5, 30,1, 30,1, 30,0, 29,9, 29,8, 26,4, 23,1, 14,6; MS (MALDI-TOF):  $m/z$ : 705,6  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 727,5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .

Etapas c)

Metil 4-*O*-(4-metoxibencil)-2,3-di-*O*-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (6)

El compuesto 5 (1,0 g, 1,41 mmol) se disolvió en  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2:1 (70 ml) bajo una atmósfera de argón, después se añadió gota a gota con  $\text{LiAlH}_4$  (1 M en THF, 7,2 ml) y  $\text{AlCl}_3$  (1,16 g, 8,72 mmol) en éter etílico (25 ml) y la mezcla resultante se agitó a reflujo durante 4 horas. Después de enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente, el residuo se diluyó con AcOEt (300 ml) y agua (300 ml). La fase orgánica se separó de la fase acuosa, se lavó con salmuera (3 x 200 ml), se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El residuo se purificó a través de una cromatografía de resolución rápida (eluyente: éter de petróleo/AcOEt 7:3) para obtener el compuesto 6 puro (860 mg, 86%); 6:  $R_f = 0,25$  (éter de petróleo/AcOEt 8,5:1,5);  $[\alpha]_D^{25} = +46^\circ$  (c = 1 en  $\text{CHCl}_3$ ); RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,36 (m, 2H, aromático), 6,92 (m, 2H, aromático), 4,86-4,57 (ABq, 2H,  $J = 10,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ -(4-OMePh)), 4,75 (d, 1H,  $J = 3,5$  Hz, H-1), 3,90-3,54 (m, 11H, H-3, H-5, H-6a, H-6b, H- $\alpha$ ), 3,41 (dd, 1H,  $J = 9,8, 9,0$  Hz, H-4), 3,37 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,27 (dd, 1H,  $J = 3,6, 9,7$  Hz, H-2), 1,5-1,6 (m, 4H, H- $\beta$ ), 1,22 (sa, 44H,  $\text{CH}_2$ ), 0,85 (t, 6H,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ). RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 159,2 ( $\text{C}_{ar}$ ), 130,2 ( $\text{C}_{ar}$ ), 129,47 ( $\text{C}_{ar}$ ), 113,9 ( $\text{C}_{ar}$ ), 98,3 (C-1), 81,3, 80,7, 73,9 ( $\text{OCH}_2$ ), 73,5 ( $\text{OCH}_2$ ), 71,6 ( $\text{OCH}_2$ ), 71,1, 70,2 (C-6), 69,6, 55,6 ( $\text{OCH}_3$ ), 55,6 ( $\text{OCH}_3$ ), 32,4, 30,8, 30,5, 30,1, 30,1, 30,1, 30,0, 29,9, 29,8, 26,4, 23,2, 14,6 ( $\text{CH}_2$ ); MS (MALDI-TOF):  $m/z$ : 707,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 729,4  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 745,3  $[\text{M}+\text{K}]^+$ .

## ES 2 331 633 T3

Etapa d)

*Metil 4-O-(4-metoxibencil)-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucohexodialdo-1,5-piranosido (7)*

5 Una disolución del compuesto 6 (800 mg, 1,13 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (35 ml) se añadió a peryodinano de Dess-Martin (720 mg, 1,70 mmol) bajo una atmósfera de argón. Después de una hora, el producto bruto se diluyó con diclorometano (200 ml) y se añadió a una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1/1 (v/v) (200 ml). Después de una agitación vigorosa, las dos fases se separaron y la fase orgánica se lavó con agua (200 ml), después se secó con sulfato de sodio y el residuo se retiró mediante evaporación. El residuo oleoso (aldehído) se utilizó tal cual sin  
10 purificación para la siguiente reacción. 7:  $R_f = 0,30$  (petróleo/AcOEt 7,5:2,5).

Etapa e)

15 *Metil 6-desoxi-6-ciclopentilamino-4-O-(4'-metoxibencil)-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (8)*

Una disolución agitada del compuesto 7 (1,690 g, 2,4 mmol), ciclopentilamina (970  $\mu\text{l}$ , 9,7 mmol),  $\text{NaCNBH}_3$  (640 mg, 9,7 mmol) y AcOH (500  $\mu\text{l}$ ) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (2:1 v/v, 30 ml) se calentó a  $60^\circ\text{C}$  durante 2 h bajo una atmósfera de argón; después de esto un análisis de TLC (tolueno/EtOAc 7:3) reveló que la reacción se hubo completado. Los  
20 disolventes entonces se evaporaron al vacío, el residuo se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml) y se lavó con bicarbonato acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se retiró mediante evaporación. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de resolución rápida sobre gel de sílice (EtOAc/MeOH 9,5:0,5) para producir 8 (1,392 g, rendimiento de 75%) como un polvo amarillo pálido. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 0,95$  (m, 6H), 1,21 (m, 44H), 1,40-1,60 (m, 12H), 2,62 (dd, 1H,  $J = 12,1, 6,8$  Hz), 2,84 (dd, 1H,  $J = 12,1, 2,8$  Hz), 3,00 (quintete, 1H,  $J = 6,8$  Hz), 3,26 (dd, 1H,  $J = 9,6, 3,4$  Hz), 3,31 (t, 1H,  $J = 9,3$  Hz), 3,37 (s, 3H), 3,50-4,0 (m, 6H), 3,79 (s, 3H), 4,55-4,80 (ABq, 2H), 4,71 (d, 1H,  $J = 3,5$  Hz), 6,80-7,20 ( $\text{A}_2\text{X}_2$ , 4H); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 14,6, 23,1, 24,4, 26,4, 26,7, 29,8, 29,9-30,1$  (señales de  $\text{CH}_2$  de la cadena lineal  $\text{C}_{14}$ ), 31,0, 32,4, 49,5, 55,59, 55,64, 59,9, 69,6, 72,0, 74,0, 74,8, 79,4, 81,1, 81,9, 98,1, 114,0, 129,9, 130,8, 159,4; HRMS (FT-ICR): calc. para  $\text{C}_{48}\text{H}_{88}\text{NO}_6$ : 774,6612 [M+1]; encontrado: 774,6604.  
30

Etapa h)

*Metil 4-O-(4-metoxibencil)-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucohexodialdo-1,5-piranosido-6-O-metiloxima*

35 El aldehído 7 (800 mg, 1,13 mmol) se disolvió en piridina (12 ml) y se añadió a hidrocloreuro de *O*-metilhidroxilamina (142 mg, 1,7 mmol). Después de 1,5 h el disolvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo se purificó mediante una cromatografía de resolución rápida (eluyente: éter de petróleo/AcOEt 9:1), para obtener el compuesto del título (540 mg, 65%).  $R_f = 0,70$  (éter de petróleo/AcOEt 7,5:2,5); RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 7,17 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz, H-6), 7,13-6,77 ( $\text{A}_2\text{X}_2$ q, 4H,  $J = 8,6$  Hz, aromático), 4,71 (d, 1H,  $J = 3,4$  Hz, H-1), 4,65, 4,44 (ABq, 2H,  $J = 10,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ -(4-OMePh)), 4,10 (dd, 1H,  $J = 9,9, 6,3$  Hz, H-3), 3,82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,72 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,33 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,45-3,78 (m, 5H), 3,20-3,28 (m, 2H), 1,50-1,60 (m, 4H, H- $\beta$ ), 1,22 (sa, 44H,  $\text{CH}_2$ ), 0,85 (t, 6H,  $J = 5,8$  Hz,  $\text{CH}_3$ ); RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 159,4 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 147,3 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 130,3 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 129,9 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 113,9 (C6), 98,4 (Cl), 81,4, 80,4, 79,7, 76,0, 76,5, 72,1, 68,5, 62,1 ( $\text{NOCH}_3$ ), 55,9 ( $\text{OCH}_3$ ), 55,9 ( $\text{OCH}_3$ ), 32,3, 31,0, 30,4, 30,1, 30,1, 30,1, 30,0, 30,0, 29,9, 29,8, 26,7, 26,4, 23,1, 14,6 ( $\text{O}(\text{CH}_2)_{13}\text{CH}_3$ ); MALDI-TOF (DHB):  $m/z$ : 757,1 [M+Na] $^+$ , 773,3 [M+K] $^+$ .  
45

Etapa i)

50 *Metil 6-metoxilamino-4-O-(4-metoxibencil)-2,3-di-O-tetradecil-6-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (9)*

Una disolución del compuesto de la etapa h) (500 mg, 0,68 mmol) en ácido acético glacial (35 ml) se añadió a cianoborohidruro de sodio (214 mg, 3,4 mmol) y la disolución resultante se agitó durante 4 horas. El disolvente entonces  
55 se retiró mediante evaporación y el residuo se purificó mediante una cromatografía de resolución rápida (eluyente: éter de petróleo/AcOEt 8:2) para obtener el compuesto 9 (460 mg, 92%). 9:  $R_f = 0,42$  (éter de petróleo/AcOEt 7,5:2,5); RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) = 7,25 (m, 2H, aromático), 6,83 (m, 2H, aromático), 5,60 (sa, 1H, NH), 4,82, 4,55 (ABq, 2H,  $J = 10,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ -(4-OMePh)), 4,72 (d, 1H,  $J = 3,5$  Hz, H-1), 3,90-3,55 (m, 5H, 4H- $\alpha$ , H-3), 3,80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,49 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,38 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,30-3,20 (m, 4H, H-2, H-4, H-5, H-6a), 2,84 (dd, 1H,  $J = 13,2, 7,7$  Hz, H-6b); RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 159,4, 130,7, 129,8, 114,5, 98,0, 97,9, 82,0, 81,3, 79,9, 74,9, 74,1, 72,1, 67,1, 61,6, 61,6, 55,6, 55,6, 55,4, 55,4, 52,7, 32,3, 31,0, 30,5, 30,1, 30,1, 29,9, 29,7, 26,46, 23,15, 14,6; MALDI-TOF:  $m/z$ : 758,1 [M+Na] $^+$ , 774,1 [M+K] $^+$ .  
60

65

## ES 2 331 633 T3

Etapa l)

*Metil 6-metoxilamino-2,3-di-O-tetradecil-6-desoxi- $\alpha$ -D-glucopiranosido (10)*

5 El compuesto 9 (200 mg, 0,27 mmol) se disolvió en ácido trifluoroacético (TFA), después se añadió a CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1/1, 20 ml) a 0°C y la disolución resultante se agitó durante una hora a esta temperatura. Los disolventes se retiraron mediante evaporación al vacío y el residuo se purificó mediante una cromatografía de resolución rápida (eluyente: AcOEt al 35% en éter de petróleo) obteniendo con ello el compuesto 10 puro (150 mg, 90%). 10:  $R_f$  = 0,42 (éter de petróleo/AcOEt 7,5:2,5); RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 4,76 (d, 1H,  $J$  = 3,5 Hz, H-1), 3,89 (m, 1H, H- $\alpha$ ), 3,82 (m, 1H, H-5), 3,63 (m, 1H, H- $\alpha$ ), 3,60-3,50 (m, 2, H-3, H-4), 3,54 (s, 1H, OCH<sub>3</sub>), 3,32 (dd, 1H,  $J$  = 3,1, 13,5 Hz, H-6a), 3,27 (dd, 1H,  $J$  = 3,5, 9,5 Hz, H-2), 3,00 (dd, 1H,  $J$  = 7,2, 13,5 Hz, H-6b), 1,5-1,6 (m, 4H, H- $\beta$ ), 1,22 (sa, 44H, CH<sub>2</sub>), 0,85 (t, 6H,  $J$  = 5,8 Hz, CH<sub>3</sub>); RMN de <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 98,2 (C-1), 81,2, 80,9, 74,9, 73,4, 72,1, 67,3, 61,8, 55,5, 53,7, 32,3, 31,0, 30,5, 30,1, 30,1, 29,9, 29,7, 26,46, 23,15, 14,6; MALDI-TOF (DHB):  $m/z$ : 639,4 [M+Na]<sup>+</sup>, 655,1 [M+K]<sup>+</sup>.

15

Etapa m)

*Metil 6-desoxi-6-[N-(1'-tetrahidrofuranil)-N'-metoxiamino]-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (1a)*

20

A una disolución del monosacárido 10 (174 mg, 0,28 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco se le añadieron *p*-toluensulfonato de piridinio (7 mg, 0,028 mmol) y dihidrofurano (64  $\mu$ l, 0,42 mmol) bajo una atmósfera de argón y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de este tiempo, el reactivo de partida se convirtió completamente en el aducto de *N,O*-bis-THF según se evaluó mediante un análisis de TLC (tolueno/EtOAc 7:3). El disolvente se retiró mediante evaporación y el residuo se disolvió en AcOH/THF/H<sub>2</sub>O 4:4:1 (9 ml). La conversión del aducto de *bis*-THF en (1a) fue seguida por TLC y se completó después de 6 h. Los disolventes entonces se retiraron mediante evaporación al vacío y el residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de resolución rápida sobre gel de sílice (AcOEt/éter de petróleo, gradiente de polaridad que comienza en 2,5:7,5) produciendo (1a) como un polvo blanco (129 mg, rendimiento 68%). RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 0,85 (t, 6H,  $J$  = 5,8 Hz), 1,22 (m, 44H), 1,50-1,60 (m, 4H), 1,72 (m, 2H), 1,91 (m, 2H), 2,78 (ta, 1H, H-6), 3,11 (ta, 1H, H-4), 3,23 (dd, 1H,  $J$  = 9,4, 3,6 Hz, H-6), 3,40 (s, 3H, NOCH<sub>3</sub>), 3,50-3,70 (m, 3H), 3,90 (ma, 2H, H-4'), 4,20 (ma, 1H, H-1'), 4,73 (d, 1H,  $J$  = 3,6 Hz, H-1); RMN de <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 97,5, 92,03, 80,65, 79,20, 76,42, 72,08, 70,84, 61,27, 59,92, 58,71, 53,89, 30,60, 29,0-28,0 (conjunto de señales de CH<sub>2</sub>), 21,39, 12,84;  $[\alpha]_D^{20}$  = + 42,45° (c = 0,5, MeOH); HRMS (FT-ICR): calc. para C<sub>40</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>7</sub>: 685,5857; encontrado: 708,5710 [M+Na]<sup>+</sup>; Análisis elemental calc. (%) para C<sub>40</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>7</sub>: C 70,03, H 11,61, N 2,04; encontrado: C 70,07, H 11,57, N 2,01.

35

Etapa n)

40 *Metil 6-desoxi-6-[N-(ciclopentil)-N'-metoxiamino]-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (1b)*

El compuesto 10 (25 mg, 0,04 mmol) se disolvió en DMF anhidra (1 ml) bajo una atmósfera de argón y se añadió a ciclopentilbromuro (45  $\mu$ l, 0,4 mmol) y diisopropiletilamina (DIPEA, 70  $\mu$ l, 0,4 mmol). La mezcla se agitó durante 20 horas a 70°C, después el disolvente se retiró mediante evaporación al vacío y el residuo se diluyó con diclorometano (10 ml) y se lavó tres veces con salmuera. La fase orgánica entonces se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se retiró mediante evaporación. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de resolución rápida utilizando éter de petróleo/acetato de etilo 9/1 como eluyente. Rendimiento: 10%; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 4,72 (d, 1H,  $J$  = 3,5 Hz, H-1), 4,10 (dd, 1H,  $J$  = 9,0, 5,0 Hz), 3,81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,70-3,50 (m, 7H), 3,44 (s, 3H, NOCH<sub>3</sub>), 3,41 (t, 1H,  $J$  = 8,7 Hz), 3,22 (dd, 1H,  $J$  = 9,1, 3,5 Hz, H-2), 1,5-1,6 (m, 4H, H- $\beta$ ), 1,22 (sa, 44H, CH<sub>2</sub>), 0,85 (t, 6H,  $J$  = 5,8 Hz, CH<sub>3</sub>). Masas (ESI):  $m/z$  = 684,61 [M+H]<sup>+</sup>, 706,59 [M+Na]<sup>+</sup>.

50

Etapa f)

55 *Metil 6-desoxi-6-ciclopentilamino-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (1c)*

El compuesto 8 (1,400 g, 1,9 mmol) se disolvió en TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1 v/v, 20 ml) y se agitó durante 1 hora. Después de esto la hidrólisis de PMB se completó, según se evaluó mediante un análisis de TLC (EtOAc/MeOH, 9:1). Los disolventes se retiraron mediante evaporación al vacío, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y se lavó con bicarbonato acuoso saturado y salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se retiró mediante evaporación. El residuo se purificó mediante una cromatografía en columna de resolución rápida sobre gel de sílice (EtOAc/MeOH 9,5:0,5) para producir (1c) (0,993 g, rendimiento 80%) como un polvo amarillado. RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) = 0,95 (m, 6H), 1,21 (m, 44H), 1,40-1,60 (m, 12H), 2,59 (sa, 1H), 2,81 (dd, 1H,  $J$  = 11,9, 7,6 Hz), 2,97 (dd, 1H,  $J$  = 11,9, 4,9 Hz), 3,09 (quintete, 1H,  $J$  = 6,6 Hz), 3,26 (dd, 1H,  $J$  = 9,3, 3,5 Hz), 3,40 (s, 3H), 3,40-3,60 (m, 5H), 3,71 (m, 1H), 3,81 (m, 1H), 4,72 (d, 1H,  $J$  = 3,6 Hz); RMN de <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 14,6, 23,1, 24,33, 24,37, 26,4, 26,5, 29,8, 29,9-30,1 (señales de CH<sub>2</sub> de la cadena lineal C<sub>14</sub>), 30,8, 32,3, 33,1, 33,4, 51,7, 55,6, 60,3, 68,6, 71,9, 74,0, 75,6, 80,5, 81,2, 98,5;  $[\alpha]_D^{20}$ : +18,4 (c 0,5, CHCl<sub>3</sub>); HRMS (FT-ICR): calc. para C<sub>40</sub>H<sub>80</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 654,6031 [M+Na]<sup>+</sup>: 676,5850; encontrado: 654,6009; 676,5872.

65

## ES 2 331 633 T3

Etapa g)

### Metil 6-desoxi-6-*N,N',N''*-dimetilciclopentilamonio-2,3-di-*O*-tetradecil- $\alpha$ -*D*-glucopiranosido (Id)

5 Una disolución del compuesto (Ic) (250 mg, 0,38 mmol), yoduro de metilo (50  $\mu$ l, 0,76 mmol) y carbonato de sodio (120 mg) en DMF seca (7 ml) se agitó bajo una atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 12 h. Después de esto la reacción se completó (TLC, EtOAc/MeOH 7:3). El disolvente se retiró mediante evaporación al vacío, el residuo se disolvió en cloroformo (15 ml) y se lavó con salmuera. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se retiró mediante evaporación. Se obtuvo el compuesto puro (Id) (241 mg, rendimiento 93%)  
10 como un polvo blanco. RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 0,80 (ta, 6H,  $J$  = 6,8 Hz), 1,21 (m, 44H), 1,51 (m, 4H), 1,66 (m, 1H), 1,80 (m, 2H), 2,15 (m, 1H), 3,13 (dd, 1H,  $J$  = 9,8, 3,5 Hz), 3,21 (s, 3H), 3,23 (s, 3H), 3,32 (ta, 1H,  $J$  = 9,2 Hz), 3,42 (s, 3H), 3,40-3,55 (m, 4H), 3,68 (ta, 1H,  $J$  = 6,9 Hz), 3,91 (sa, 1H), 4,05 (ta, 1H,  $J$  = 9,0 Hz), 4,13 (ta, 1H,  $J$  = 8,5 Hz), 4,19 (d, 1H,  $J$  = 14,1 Hz), 4,66 (d, 1H,  $J$  = 3,5 Hz); RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 14,6, 23,1, 24,33, 24,37, 26,4, 26,5, 29,8, 29,9-30,1 (señales de  $\text{CH}_2$  de la cadena lineal  $\text{C}_{14}$ ), 30,8, 32,3, 50,5, 57,8, 66,1, 67,3, 71,7, 72,3, 74,0, 76,7, 79,7, 80,2, 99,6;  $[\alpha]^{20}_{\text{D}}$ : +21,6 (c 0,5,  $\text{CHCl}_3$ ); HRMS (FT-ICR): calc. para  $\text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{NO}_5^+$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 682,6344; encontrado: 682,6354. Análisis elemental calc. (%) para  $\text{C}_{42}\text{H}_{84}\text{NO}_5^+$ : C 73,84, H 12,39, N 2,05; encontrado: C 73,78, H 12,11, N 1,99.

20 *Farmacología*

### *Materiales y métodos*

#### *Células dendríticas, macrófagos y medio de cultivo*

25 Se obtuvieron células BM $\Phi$  y DC de células de médula ósea y se dividieron en dos cultivos separados. Para la preparación de DC se cultivaron células de médula ósea en IMDM completo suplementado con 10% de sobrenadante de células tumorales B16 transducidas con GM-CSF [R. Soiffer, T. Lynch, M. Mihm, K. Jung, C. Rhuda, J.C. Schmolinger, F.S. Hodi, L. Lieber, P. Lam, S. Mentzer, S. Singer, K.K. Tanabe, A.B. Cosimi, R. Duda, A. Sober, A. Bhan, J. Daley, D. Neuberg, G. Parry, J. Rokovich, L. Richards, J. Drayer, A. Berns, S. Clift, L.K. Cohen, R.C. Mulligan, G. Dranoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95(22), 13141-13146]. Se añadió medio fresco cada 2 días. Después de 7-10 días de cultivo las células se analizaron para la expresión de CD11c y se emplearon en ensayos en los que 90% fueron CD11c positivo. Para la preparación de BM $\Phi$  se cultivaron células de médula ósea en IMDM completo suplementado con 10% de sobrenadante de células NIH3T3 transducidas con M-CSF. También en este caso se añadió medio fresco cada 2 días. Después de 7-10 días de cultivo las células se analizaron para la expresión de Mac1 y se emplearon en ensayos en los que al menos 90% fueron Mac1 positivo. Se cultivaron las células D1 en IMDM suplementado con 10% de sobrenadante de células tumorales B16 transducidas con GM-CSF.

40 *Ensayos celulares*

Las células D1, BMDC y M $\Phi$  se cultivaron en placas de 48 pocillos a una concentración de 200000 células/pocillo en 200  $\mu$ l de medio. Una o dos horas después de haberlas introducido en las placas se trataron con diferentes cantidades de compuestos Ic y Id durante 30 min y después se estimularon con lípido A de *Escherichia coli* (F583, mutante Rd Sigma, 0,5  $\mu$ M) durante 18 h.

#### *Ensayos de células HEK-293-hTLR-4A o -hTLR9A*

50 Se cultivaron en placa células (InvivoGen, San Diego, CA, EEUU) en placas de 5 pocillos a una concentración de  $9 \times 10^6$  células/pocillo en 5 ml de medio. Entonces se añadió el monosacárido Id al medio y después de 2 horas se añadió el lípido A de *Escherichia coli* o CpG (0,5  $\mu$ M) a células transfectadas con TLR-4 o TLR9, respectivamente. Después de 2 h las células se recogieron para la medida de NF- $\kappa$ B.

55 *Ensayo del factor de transcripción NF- $\kappa$ B*

El análisis del factor de transcripción se realizó con un kit de ELISA (Active Motif, Rixensart, Bélgica) que permite la detección de la activación de NF- $\kappa$ B mediante una combinación de la unión de un oligonucleótido específico de NF- $\kappa$ B y la posterior detección de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B con un anticuerpo específico, según las instrucciones del fabricante.

#### *Dolor neuropático*

65 Se anestesiaron ratones macho C57BL/6J con pentobarbital sodio (65 mg/kg, i.p.) y se sometieron a cirugía para inducir un dolor neuropático. Brevemente, el nervio ciático común se expuso a nivel del muslo medio y, próximas a la trifurcación de los nervios ciáticos, se ataron tres ligaduras hasta que se observó una breve contracción en la pata trasera

## ES 2 331 633 T3

respectiva. Se emplearon animales de simulación (exposición del nervio ciático pero sin ligadura) como controles. La respuesta al dolor del animal se controló antes de la cirugía, en el día 7 (24 h después de la última administración). El compuesto (Id) se administró i.p. a 5 mg/kg una vez diaria comenzando el día después de la cirugía. Se ensayó la hipersensibilidad al calor según el procedimiento de Hargreaves utilizando el ensayo plantar (Ugo Basile, Varese, Italia). Se midió la alodinia mecánica utilizando el ensayo de Von Frey.

### *Isquemia cerebral en jerbos mongoles macho (Meriones unguiculatus)*

Después de implantar electrodos de EEG, los jerbos se dividieron en diferentes grupos basándose en el tratamiento asignado. Se registró su electroencefalograma (EEG) durante 1 h al día, durante 3 días, para determinar la potencia espectral relativa y total basal. Las señales se registraron y se procesaron para el análisis espectral de la transformada de Fourier rápida mediante un programa informático para PC (PowerLab, AD Instruments, Pty, Ltd., Australia). También se realizaron registros de EEG durante 7 días después de la isquemia. Después de los registros de EEG basales, cada jerbo de nuevo se anestesió ligeramente y se indujo una isquemia de 10 min mediante la oclusión de las arterias carótidas comunes bilaterales. La isquemia se verificó cualitativamente sobre el papel mediante el alisamiento completo del EEG. Un grupo de animales (operados de modo simulado) se sometió al mismo procedimiento quirúrgico excepto que las arterias carótidas no se cerraron. El compuesto (Id) se administró i.p. a los animales a la dosis de 10 mg/kg 30 minutos antes de la inducción de la isquemia.

### *Experimentos y resultados*

Tres compuestos representativos de la invención, los compuestos Ia, Ic y Id, se ensayaron para su capacidad para interferir con la activación de células dendríticas (DC) y macrófagos (MΦ) inducida por el lípido A. Estas dos clases de leucocitos están directamente implicados en el refuerzo y el control de las respuestas inflamatorias y, tras su interacción con productos microbianos, como LPS, producen grandes cantidades de TNFα, uno de los principales mediadores de la inflamación y el choque séptico. En este contexto, la activación de TLR-4 por LPS es uno de los estímulos más potentes para el cebado de DC.

En vista del papel principal de la activación temprana de DC y MΦ para dirigir las reacciones inflamatorias, los compuestos Ia, Ic y Id se ensayaron para su capacidad para antagonizar la actividad estimuladora del lípido A en macrófagos derivados de médula ósea (BMΦ) y DC derivadas de médula ósea (BMDC) interfiriendo con su capacidad para inducir la producción de TNFα. Como fuente de DC también se utilizaron células D1, una línea celular DC dependiente del factor del crecimiento a largo plazo (GM-CSF) [C. Winzler *et al.*, J. Exp. Med., 1997, 185, 317-327]. Las células BMΦ, BMDC y D1 se estimularon con lípido A (0,5 μM) después de una preexposición a los compuestos Ia, Ic y Id, y la cantidad de TNFα liberada en el sobrenadante se midió mediante ELISA. Como se muestra en la figura 1, los monosacáridos Ic y Id interfieren con la acción del lípido A de una manera dependiente de la dosis. El compuesto Id muestra una menor actividad mientras que el monosacárido 10, que carece del anillo de tetrahidrofurano, es totalmente inactivo (los datos no se muestran). En general, los compuestos Ia, Ic y Id no muestran ninguna función inflamatoria directa, puesto que no son capaces de estimular la producción de citoquinas. El compuesto Id es más potente que Ic que, a su vez, es mejor inhibidor que el compuesto Ia. Además, el compuesto Id muestra la mayor solubilidad en el medio acuoso utilizado en los ensayos.

El compuesto Id entonces se estudió con más detalle controlando la producción de una segunda citoquina inflamatoria, IL-1β. La síntesis de IL-1β y TNFα fue inhibida en células BMΦ y D1, y el efecto fue proporcional a la concentración de Id. Para evaluar la selectividad por TLR-4 se investigó la producción de TNFα en presencia del compuesto Id en respuesta a la estimulación a través del motivo CpG del ADN bacteriano reconocido por TLR2 [H. Hemmi *et al.*, Nature, 2000, 408, 740-745] y tripalmitoil cisteína (Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>), que es específica para TLR2 [S. Agrawal *et al.*, J. Immunol., 2003, 171(10), 4984-4989]. La producción de TNFα no fue inhibida por Id en las cascadas inflamatorias mediadas por TLR9 y TLR2 (figura 2), lo cual indica un nivel pertinente de selectividad.

El potencial citotóxico de los compuestos Ia, Ib y Ic también se investigó. Los compuestos de la invención contienen una parte polar (el resto de azúcar) unido a cadenas lipófilas y, por tanto, puede actuar como detergente y destruir a las células generando poros en las membranas plasmáticas. La toxicidad de los compuestos Ia, Ib y Ic se investigó con el ensayo de PI y se investigó el potencial apoptótico con el ensayo de anexina V. Tanto DC como MΦ no mostraron un porcentaje apreciable de células muertas después de 48 h de incubación con Id a unas concentraciones que varían de 10 a 100 μM (figura 3).

Otra prueba directa de que el compuesto Id ejerce su acción de forma selectiva sobre el receptor TLR-4 se obtiene con experimentos con un sistema de células HEK 293 transfectadas con TLR-4 y TLR9 [J.C. Chow, J. Biol. Chem., 1999, 274(16), 10689-10692]. En estas células, la activación de NF-κB dependiente de TLR puede medirse con facilidad después de la estimulación. La activación de la vía de señalización de TLR-4 conduce a la translocación nuclear de NF-κB y a la producción de citoquinas inflamatorias. Las células HEK 293 transfectadas con TLR-4 y TLR9 se incubaron, respectivamente, con lípido A (0,5 μM) o CpG (0,5 μM), después de una preexposición al compuesto Id, y la activación de NF-κB se midió 2 h después. Como se muestra en la figura 4, el monosacárido Id es capaz de contrarrestar, de forma significativa, el efecto del lípido A en células transfectadas con TLR-4, mientras que es inactivo a la dosis máxima de 50 μM para contrarrestar el efecto de CpG sobre TLR9 HEK 293.

## ES 2 331 633 T3

La administración repetida del compuesto Id a ratones neuropáticos una vez diaria durante una semana, comenzando el día después de la lesión del nervio ciático, indujo un alivio significativo de ambas señales de dolor neuropático: hiperalgesia térmica (una menor latencia a la retirada frente a un estímulo térmico) y alodinia mecánica (percepción del dolor después de la aplicación de un estímulo mecánico que normalmente es inocuo), como se muestra en la figura 5.

El compuesto Id también es capaz de antagonizar significativamente el alisamiento de EEG inducido por isquemia, comenzando desde el día 1 después de la recirculación. En la figura 6 se muestra un análisis de EEG cuantitativo de jerbos tratados con el compuesto Id. Un ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo de dosis, tiempo e interacción entre los grupos evaluados durante la isquemia y 1 hora, 1 día, 3 días y 7 días después de la recirculación. El grupo con vehículo presentó una disminución significativa en la potencia de EEG en todos los intervalos ensayados.

### *Actividad in vivo en ratones*

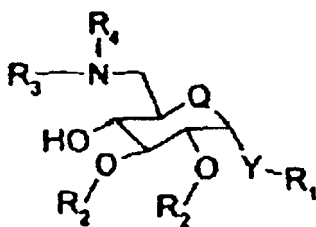
La actividad antiinflamatoria del compuesto Ia se evaluó con el ensayo de edema de carragenano en ratos macho C57BL/6J (Harlan, Italia) de 9 semanas de edad, mantenidos bajo condiciones convencionales de temperatura, humedad y ciclo de luz/oscuridad y se dejó que se aclimatasen durante al menos una semana antes del ensayo. Los ratones se anestesiaron con pentobarbital sodio (60 mg/kg, i.p.) y se indujo una inflamación aguda mediante la administración intraplantar de 20  $\mu$ l de  $\lambda$ -carragenano (disolución fisiológica al 2%). Los animales control recibieron una administración intraplantar de disolución fisiológica. El compuesto Ia (disuelto en etanol al 10% en disolución fisiológica) se administró por vía intraperitoneal 30 minutos antes del carragenano a dosis diferentes (3, 10 y 30 mg/kg, 100  $\mu$ l/10 g de peso corporal). Los animales control recibieron una administración análoga de vehículo. Un grupo de animales recibieron indometacina (5 mg/kg, i.p.) como compuesto antiinflamatorio conocido para la comparación de la eficacia.

Se midió el volumen de la pata con un pletismómetro antes y 2 horas después de la administración de carragenano. La diferencia entre el volumen de la pata ipsilateral y contralateral representa el edema antiinflamatorio expresado como  $\mu$ l. Los resultados se indican en la figura 7.

Se midió la producción de óxido nítrico *ex vivo* en homogeneizado de pata como un marcador significativo de la inflamación, mediante un procedimiento fluorimétrico basado en la determinación del nivel de nitritos/nitratos, que son los productos finales del metabolismo de NO [Misko *et al.*, Anal. Biochem., 1993, 214, 11-16]. Los resultados se indican en la figura 8.

## REIVINDICACIONES

## 1. Compuestos de fórmula general (I)



(I)

en la que:

Q representa oxígeno;

Y representa oxígeno;

R<sub>1</sub> se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> y fenilo;

R<sub>2</sub> son ambas cadenas de alquilo C<sub>14</sub>;

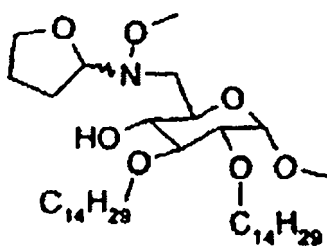
R<sub>3</sub> es tetrahidrofuran-1-ilo o ciclopentilo;

R<sub>4</sub> se selecciona de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> o un grupo R<sub>4</sub>'X, en el que

R<sub>4</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> y X es un átomo de oxígeno o azufre;

y sus sales de ácidos fisiológicamente aceptables o sus sales de amonio cuaternario.

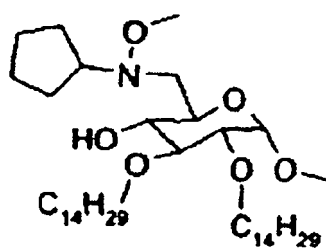
2. Un compuesto seleccionado de: metil 6-desoxi-6-[N-(1'-tetrahidrofuranil)-N'-metoxiamino]-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Ia)



(Ia)

;

metil 6-desoxi-6-[N-(ciclopentil)-N'-metoxiamino]-2,3-di-O-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Ib)



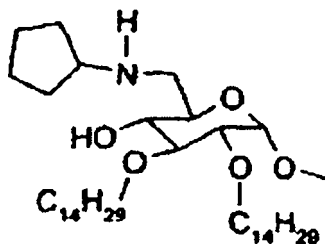
(Ib)

;

## ES 2 331 633 T3

metil 6-desoxi-6-ciclopentilamino-2,3-di-*O*-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Ic)

5



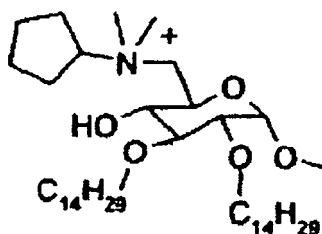
10

(Ic) ;

15

metil 6-desoxi-6-*N,N,N'*-dimetilciclopentilamonio-2,3-di-*O*-tetradecil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Id)

20



25

(Id)

30

3. Compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para su uso como medicamentos.

35

4. El uso de los compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

40

5. El uso de los compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para la preparación de composiciones farmacéuticas analgésicas.

6. El uso de los compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la isquemia cerebral.

45

7. Composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, mezclado con excipientes y/o vehículos adecuados.

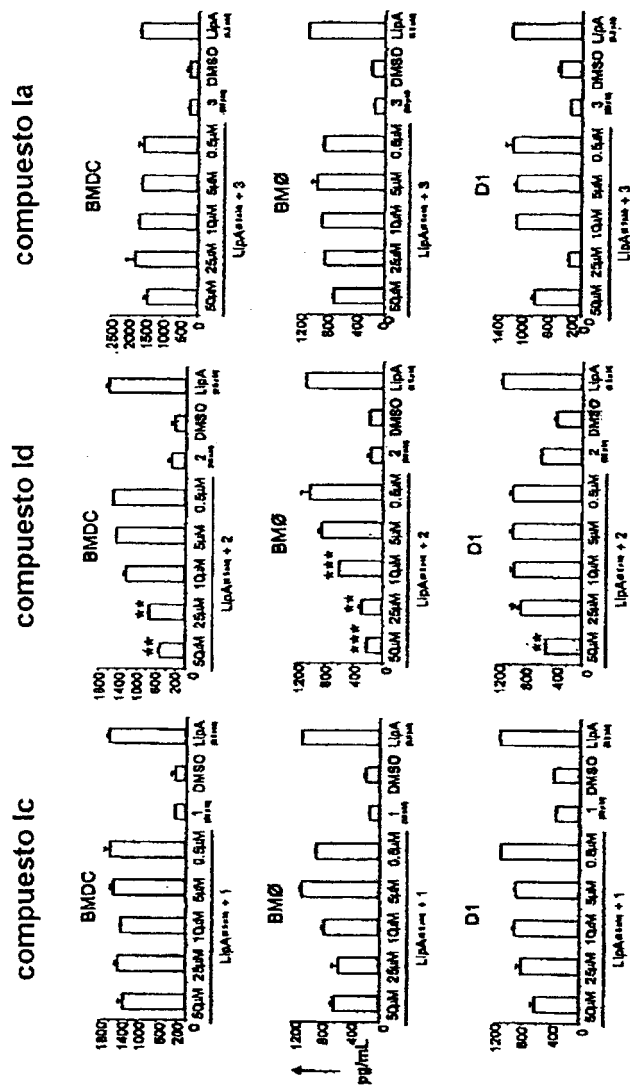
50

55

60

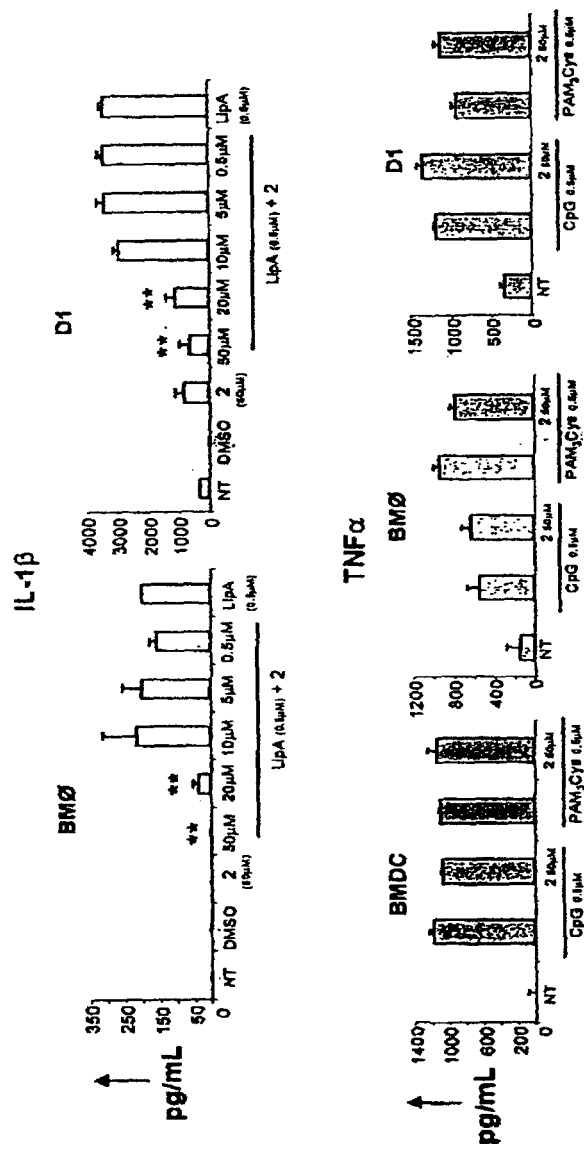
65

Figura 1



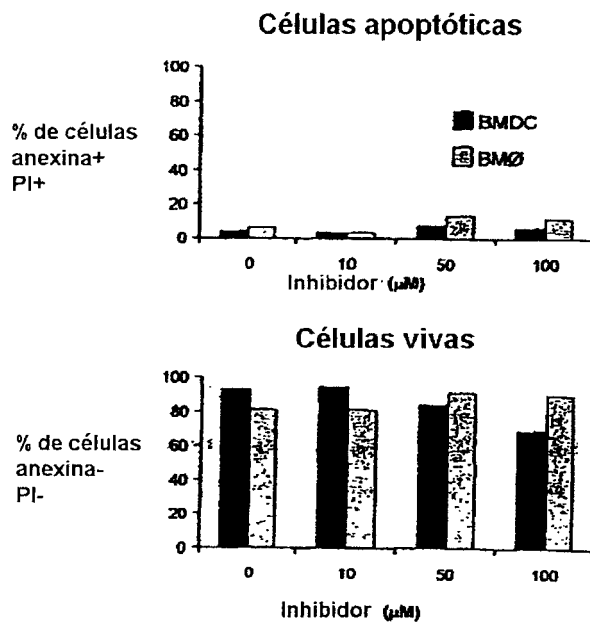
Actividad antagonista de los compuestos **la**, **lc** y **ld** sobre la producción de citoquinas estimulada por lípido A en células **BMDC**, **BMØ** y **D1**

Figura 2



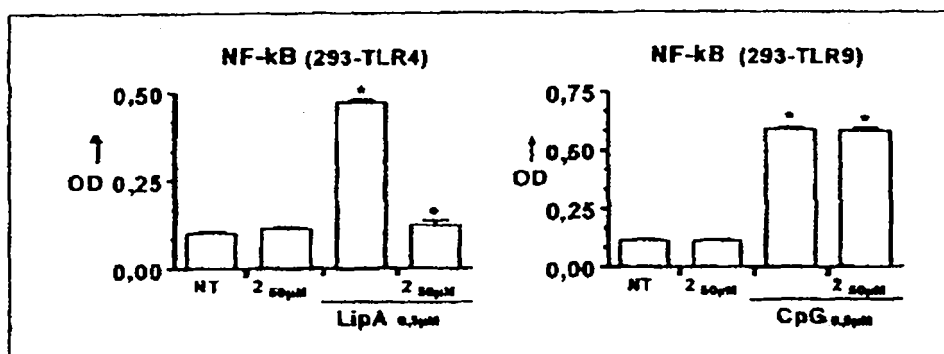
Inhibición de la producción de IL-1 $\beta$  inducida por lipido A y selectividad por TLR-4 del monosacárido Id

Figura 3



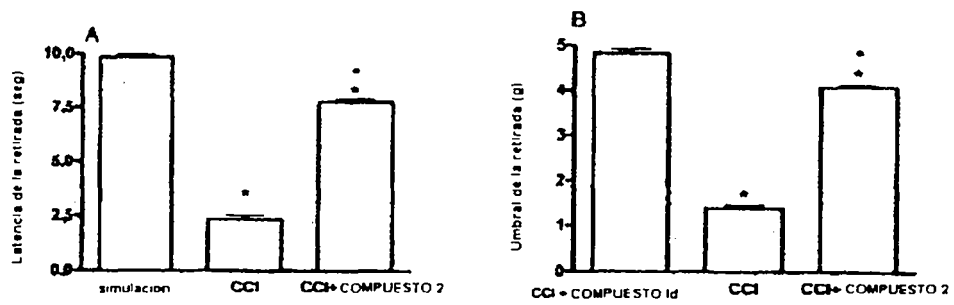
Ensayos de toxicidad de anexina y yoduro de propidion con el compuesto Id

Figura 4



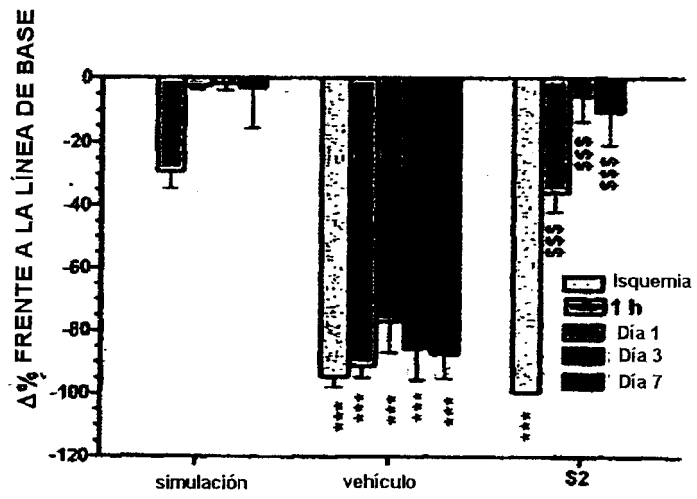
El compuesto Id tiene actividad antagonista sobre TRL-4 pero no sobre TLR-9.

Figura 5



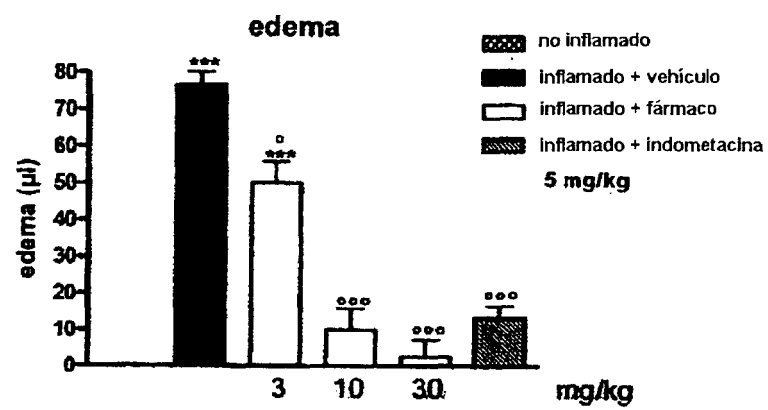
Efecto del compuesto 1d sobre la hiperalgesia térmica (A) y la alodinia mecánica (B)

Figura 6



Efecto del compuesto Id sobre EEG de la corteza

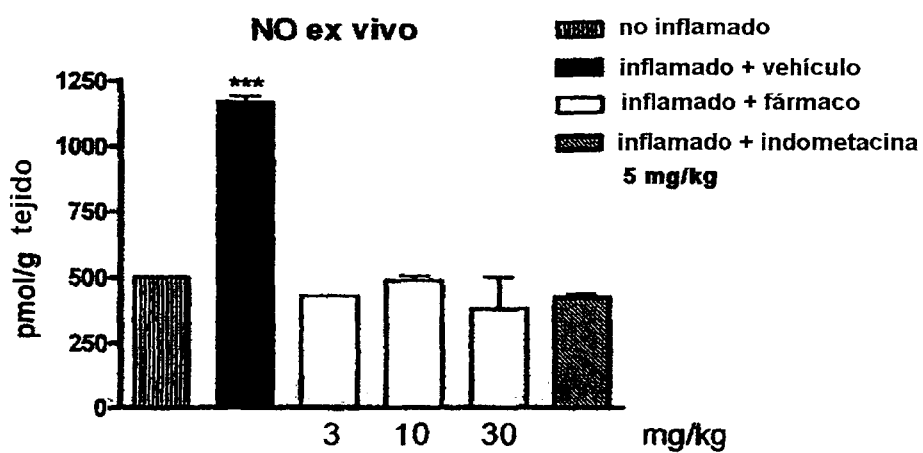
Figura 7



\*\*\*p<0,001 frente a no inflamado. \*p<0,001 frente a inflamado+vehículo (ANOVA; ensayo de Tukey)

### Ensayo de edema de carragenano en ratas

Figura 8



\*\*\* $p < 0,001$  frente a no inflamado (ANOVA; ensayo de Tukey)

Evaluación de la producción de NO en ratas