

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 267**

51 Int. Cl.:

C07H 15/207 (2006.01)

A61K 31/7034 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2009 E 09765996 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2280986**

54 Título: **Análogos sintéticos manósidos fosfatidil-mio-inositol con actividad inhibidora de la respuesta inflamatoria**

30 Prioridad:

23.05.2008 FR 0853357

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.12.2013

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) (50.0%)**

3, rue Michel Ange

75016 Paris, FR y

UNIVERSITÉ D'ORLEANS (50.0%)

72 Inventor/es:

QUESNIAUX RYFFEL, VALERIE;

MARTIN, OLIVIER y

FRONT, SOPHIE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 436 267 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).

Análogos sintéticos manósidos fosfatidil-mio-inositol con actividad inhibidora de la respuesta inflamatoria**Descripción****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos derivados sintéticos de fosfatidil – *mioinositol* manósidos (denominado en adelante PIM), a su procedimiento de preparación y utilización en la prevención o al tratamiento de una enfermedad asociada a la sobreexpresión de citoquinas o de quimioquinas, en particular TNF y / o IL – 12.

10 La invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende al menos un derivado sintético de PIM.

15 En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes [] remiten a la lista de referencias presentada al final del documento.

Estado de la técnica

20 La inhibición de la expresión de las citoquinas proinflamatorias como el TNF y la interleucina 12p40 (denominada en adelante como IL – 12) involucradas en las numerosas respuestas inflamatorias, constituye una necesidad médica real.

25 Las indicaciones relacionadas con la expresión de estas citoquinas incluyen enfermedades inflamatorias, alérgicas y autoinmunes como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, la psoriasis, la diabetes mellitas, el lupus eritematoso, el choque séptico y las inflamaciones pulmonares y agudas.

30 Las moléculas utilizadas normalmente en estas indicaciones son esteroides. Numerosos agentes bloqueantes como el TNF (anticuerpos o receptores solubles) se han comercializado desde el 2000. Cuatro tipos de moléculas inhiben la secreción de la IL – 12 cuyos anticuerpos son objeto de la patente / solicitud de patente [1].

35 Sin embargo, los esteroides tienen efectos secundarios que limitan la aplicación. Los anticuerpos monoclonales o receptores solubles son proteínas costosas que requieren inyecciones subcutáneas. Además, estos anticuerpos pueden tener efectos no deseables en la resistencia a las infecciones, como se ha demostrado para los anticuerpos anti TNF que pueden inducir la reactivación de la tuberculosis latente. El ácido hialurónico descrito como inhibidor de la producción de la IL – 12, tiene un peso molecular muy elevado, no está molecularmente definido y es difícilmente sintetizable [2].

40 Existe por tanto una necesidad médica real para encontrar nuevos inhibidores de citoquinas proinflamatorias como el TNF y la IL – 12 que palie estos defectos.

Los fosfatidil – *mioinositol* manósido (denominados en adelante PIM), son los precursores de lipoglicanos complejos como, por ejemplo, los lipoarabinomananos (LAM) y los lipomananos (LM), extraídos de las paredes de las micobacterias. Según su estructura, los PIM pueden tener diferentes actividades inmunomoduladoras.

45 Los PILAM, proceden de una especie avirulenta de rápido crecimiento como las *M. smegmatis*, moléculas proinflamatorias que estimulan la producción del TNF y de la IL – 12. En cambio, los LAM cubiertos con residuos de manosilo (ManLAM), proceden de las micobacterias de lento crecimiento como las *M. tuberculosis* y la *M. bovis* BCG, moléculas antiinflamatorias capaces de inhibir la producción de la IL – 12 y el TNF y capaces de aumentar la producción de la IL – 10 por las células dendríticas o por las líneas monocíticas. [8].

50 Los PILAM, estimulan los macrófagos a través de los receptores Toll-like (TLR) – 2, receptores implicados en la inmunidad innata y estimulan la vía de señalización del NF – kB [9]. Se atribuyen los efectos antiinflamatorios de ManLAM a su enlace con los receptores de manosa [10] o a DC-SIGN [11].

55 Los LM, precursores biosintéticos de los LAM, están compuestos por un esqueleto de hidratos de carbono con un núcleo constituido de D – manosa y un punto de anclaje de fosfatidilinositol manósido (denominado en adelante PIM) en el extremo reducido manana del dicho núcleo. Los LM están desprovistos del dominio D – arabinano y de cofias encontradas en los LAM [12]. Los LM son proinflamatorios pero los inventores han descrito recientemente que los LM de diferentes orígenes bacterianos, incluyendo a la *M. bovis* BCG, la *M. tuberculosis*, la *M. chelonae* y la *M. Kansasii*, también presentan importantes propiedades antiinflamatorias [13]. En particular, los LM tri- y tetra – acilados de *Mycobacterium bovis* BCG inducen a la estimulación de los macrófagos y la expresión de citoquinas proinflamatorias a través de TLR2, de TLR4 y de la proteína adaptadora MyD88 [14], mientras que los LM diacilados y, hasta un cierto nivel los LM triacilados, inhiben la producción de las citoquinas inflamatorias por los macrófagos estimulados a través de la vía TLR4, independientemente de la TLR2 [15]. Por lo tanto, el grado de acilación influye en el efecto modulador de los LM de *M. bovis*. Los autores propusieron que la acilación diferencial de los LM de la pared miobacteriana puede representar un medio adicional para regular la respuesta inflamatoria del huésped.

Los PIM son moléculas de bajo peso molecular (aproximadamente 1.000 – 2.500) generalmente con 1 a 4 cadenas aciladas, un residuo fosfatidil – *mioinositol* y 1 a 6 residuos de manosa. Por lo tanto, los PIM naturales pueden presentarse en diferentes formas con un número variable de residuos de manosa y acilo.

Entre los PIM naturales, los fosfatidil – *mioinositol* dimanósido (denominado en adelante PIM₂) y fosfatidil – *mioinositol* hexamanósido (denominado en adelante PIM₆) son los más comunes en la *Mycobacterium bovis* BCG y en la *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Se muestra en la Figura 1 un ejemplo de estructura de PIM₆ en su estado natural. Se tiene en cuenta que en estas estructuras naturales, los residuos de manosilo son transportados por el D – mioinositol en las posiciones 2 y 6.

Se han atribuido recientemente numerosas funciones a los PIM.

Se ha demostrado que los PIM son los agonistas de TLR2 [3] y son reconocidos por las células T CD4⁺ CD8⁻ α / β humanas en el contexto de las células que presentan antígenos que expresan CD1b [4]. Se estableció la interacción de la alta afinidad entre las proteínas CDb1 y las cadenas laterales aciladas de PIM₂ [5]. La fracción fosfatidilinositol parece desempeñar un papel central en el proceso de enlace de los PIM a las proteínas CD1b. Por otra parte, se ha demostrado que los PIM₂ pueden aumentar el reclutamiento de células NKT (Natural Killer T cells), que desempeñan un papel crucial en la respuesta granulomatosa [6], [7].

Se ha descubierto que las cepas de *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y *Mycobacterium smegmatis* 607 contenían esencialmente dos familias de PIM, los dimanósidos (PIM₂) y hexamanósidos (PIM₆) [7]. Se observan PIM₁, PIM₃, PIM₄ y PIM₅ en cantidades reducidas que sugieren que estos son los intermediarios biosintéticos. Se sintetizan los PIM a partir del fosfatidilinositol por adición secuencial de residuos de manosa en posiciones específicas. Se conocen ahora los tres genes que codifican las manosil transferasas implicadas en la adición de tres primeras unidades de α – Manp. La etapa de iniciación, catalizada por la enzima pimA [16], consiste en la transferencia de un residuo α – Manp al *mioinositol* del fosfatidilinositol para formar PIM₁. La adición de un segundo residuo α – Manp al – inositol del fosfatidilinositol para formar PIM₂, está catalizado por la enzima pimB [17]. La elongación se produce gracias al pimC [18] para crear PIM₃ por adición de un tercer residuo α – Manp.

Se han purificado y caracterizado diferentes formas aciladas de PIM, en particular las de PIM₂ y PIM₆ [7]. Se han descrito cuatro principales formas aciladas (mono – o tetra – aciladas) para PIM₂ y PIM₆ (AC₁ - a AC₄ – PIM₂ y PIM₆; véase la Tabla 1). Se ha puesto igualmente en evidencia su actividad biológica consistente en la estimulación de macrófagos para producir citoquinas.

Tabla 1: Formas principales aciladas de PIM₆ puestas en evidencia *M. bovis* BCG.

	m/z	Fragmento Acilo	Gro		Manp	Myo-Ins	%
			1	2			
Ac ₁ PIM ₆	1543.6	C ₁₆	C ₁₆				
	1585.7	C ₁₉	C ₁₉				
Ac ₂ PIM ₆	1781.8	C ₁₆ , C ₁₆	C ₁₆	C ₁₆			35
	1823.9	C ₁₆ , C ₁₉	C ₁₆	C ₁₉			65
Ac ₃ PIM ₆	2062.1	2C ₁₆ , C ₁₉	C ₁₆	C ₁₉	C ₁₆		100
Ac ₄ PIM ₆	2300.3	3C ₁₆ , C ₁₉	C ₁₆	C ₁₉	C ₁₆	C ₁₆	56
	2342.4	2C ₁₆ , 2C ₁₉	C ₁₆	C ₁₉	C ₁₆	C ₁₉	44

Se ha determinado la abundancia relativa de las diferentes especies para cada forma acilada a partir de la integración de las señales monoisotópicas correspondientes [19].

Los inventores han mostrado previamente que PIM₂ y PIM₆ inducen una activación reducida de macrófagos para secretar TNF por TLR2 y el adaptador MyD88, cualquiera que sea su estructura acilada [7], [19].

Sin embargo, como los PIM son los precursores de LM, y en vista de la reciente demostración de los inventores, según la cual el LM diacilado y triacilado posee un efecto antiinflamatorio fuerte, han determinado que, algunos PIM naturales, incluyendo los PIM₆ di – y tri – acilados, son los inhibidores de la liberación por los

macrófagos de citoquina proinflamatoria. Este trabajo es objeto de la solicitud de patente francesa N° 06 / 10136 publicada el 20 de noviembre de 2006 con el número FR 2908658.

Se han descrito las síntesis totales de PIM₂ y PIM₆ [20]. Los inventores ya han realizado la síntesis de los PIM₁ diacilados y han mostrado la inhibición de la liberación de citoquinas proinflamatorias.

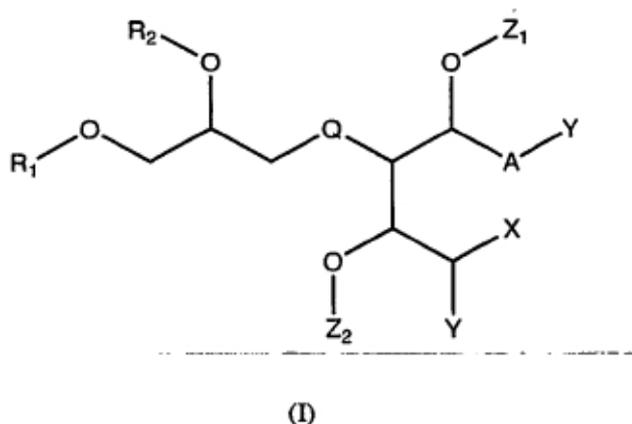
Como se ha indicado anteriormente, existe una necesidad médica real para descubrir nuevos inhibidores de citoquinas proinflamatorias como el TNF y la IL – 12 para paliar los defectos, inconvenientes y obstáculos de los inhibidores del trabajo anterior como los esteroides o los anticuerpos monoclonales.

Los derivados sintéticos de PIM pueden constituir una alternativa interesante para responder a esta necesidad.

Así pues, existe por lo tanto, una necesidad real de nuevos derivados sintéticos de PIM que sean a la vez fáciles de sintetizar, de aplicar y que posean un bajo coste, que tengan propiedades inhibidoras de la expresión de citoquinas proinflamatorias o incluso superiores a los inhibidores del trabajo anterior.

Descripción de la invención

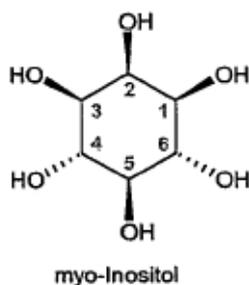
La presente invención tiene precisamente como objetivo responder a esta necesidad proporcionando nuevos compuestos de fórmula general. (I):



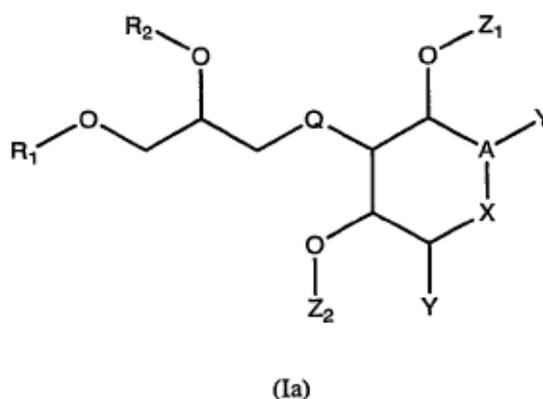
en la que:

- R₁ y R₂ representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno, un radical alquilo C₁ – C₂₀, un radical acilo C₁ – C₂₀, siendo entendido siempre y cuando uno de los sustituyentes R₁ o R₂ sea un átomo de hidrógeno y el otro sustituyente sea diferente al de hidrógeno;
- Z₁ y Z₂ representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa, y galactosa siendo entendido siempre y cuando uno de los sustituyentes Z₁ o Z₂ sea un átomo de hidrógeno y el otro sustituyente sea diferente al de hidrógeno;
- Q representa a – OP (O)₂O –, – OCO₂ –, NHCO₂ –, NHCONH –;
- Y representa un átomo de hidrógeno, un radical hidroxilo, un radical alcoxi en C₁ – C₆ – (CH₂)_n – OH donde n es un número entero igual a 1, 2 o 3, siendo entendido siempre y cuando Y sea un radical hidroxilo; y Z₁ y Z₂ no representen a los dos grupos de un átomo de hidrógeno;
- A representa – CH₂ –;
- X representa un átomo de hidrógeno;
- o A y X forman un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones en el que
 - A representa un – CH –,
 - X representa un – CH₂ –, – CH (OH) –, un átomo de oxígeno, un –NR₃ – en el que R₃ es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C₁ – C₆ o un radical acilo en C₁ – C₂₀, siendo entendido siempre y cuando
 - A y X formen un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones,
 - X = – CH (OH) –,
 - Z₁ y Z₂ representen, independientemente el uno del otro, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa y galactosa el ciclo de 6 miembros tenga una configuración *mioinositol* con Z₁ o Z₂ en posición 1 y representen, al menos un azúcar o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

En el contexto de la invención, se entiende por *miinositol* la siguiente estructura con numeración indicada según las recomendaciones de la *International Union of Biochemistry* (1988).



15 Según un método de realización de la invención, los compuestos de la invención en los que A y X forman un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones, pueden tener la fórmula (Ia)



35 en la que:

- R₁ y R₂, Z₁ y Z₂ Q e Y son aquellos definidos anteriormente;
- A representa — CH—;
- X representa un — CH₂—, — CH(OH)—, un átomo de oxígeno, un —NR₃— en el que R₃ es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C₁ — C₆ o un radical acilo en C₁ — C₂₀,

siendo entendido siempre y cuando

- X = — CH(OH)—,
- Y = — OH, y
- Z₁ y Z₂ representen, independientemente el uno del otro, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa y galactosa el ciclo de 6 miembros tenga una configuración *miinositol* con Z₁ o Z₂ en posición 1 y representen,

al menos un azúcar o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Un ejemplo de este método de realización puede ser un compuesto en el que A y X forman un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones en el que

- R₁ y R₂ representan, independientemente uno del otro, un radical acilo en C₁ — C₂₀;
- Z₁ representa un átomo de hidrógeno;
- Z₂ representa la manosa;
- Q representa a — OP(O)₂—;
- A representa — CH—;
- X representa un — CH(OH)—,
- Y representa un radical hidroxilo;
- El ciclo de 6 eslabones tiene una configuración *miinositol* con Z₁ o Z₂ en posición 1

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Otro ejemplo de este método de realización puede ser un compuesto en el que A y X forman un enlace para conducir un ciclo de 6 eslabones, dicho compuesto puede ser un compuesto en el que

- 5 ▪ R1 y R2 representan, independientemente el uno del otro, un radical acilo en C1 – C20
- Z1 representa la manosa;
- Z2 representa un átomo de hidrógeno;
- Q representa a – OP (O)2O -;
- A representa – CH -;
- 10 ▪ X representa un - CH (OH) -;
- Y representa un radical hidroxilo;
- El ciclo de 6 eslabones tiene una configuración mioinositol con Z1 en posición 1
- o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

15 Cuando A y X forman un enlace para conducir un ciclo de 6 eslabones, los compuestos de la invención pueden igualmente ser, por ejemplo, compuestos en los que:

- R1 y R2 son aquellos definidos anteriormente;
- Q representa a – OP (O)2O -;
- 20 ▪ A representa – CH -;
- X representa un - CH (OH) -;
- Y representa un radical hidroxilo;
- Z1 y Z2 representan, independientemente el uno del otro, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa y galactosa el ciclo de 6 miembros tiene una configuración mioinositol con Z1 o Z2 en posición 1 y representan,

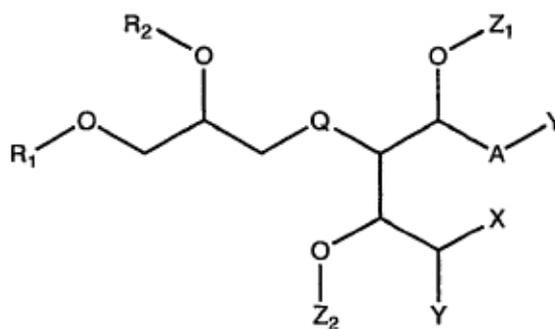
25 al menos un azúcar o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

 Siempre, en el caso donde A y X forman un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones, los compuestos de la invención pueden aún ser, por ejemplo, compuestos en los que

- 30 ▪ R1 y R2, Z1 y Z2 Q e Y son aquellos definidos anteriormente;
- Q representa a – OP (O)2O -;
- A representa – CH -;
- 35 ▪ X representa un –NR3 – en el que R3 es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C1 – C6 o un radical acilo en C1 – C20,

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

40 Según otro método de realización de la invención, los compuestos de la invención pueden tener la fórmula (Ib)



(Ib)

en la que:

- 60 ▪ R1 y R2, Z1 y Z2 Q e Y son aquellos definidos anteriormente;
- A representa – CH2-;
- X representa un átomo de hidrógeno o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

65 Se ha observado inesperadamente que los derivados sintéticos de los PIM según la invención permiten separar la propiedad de estos derivados para actuar como agonista de los receptores TLRs implicados en la respuesta inmunitaria y por lo tanto separar la actividad pro y antiinflamatoria de estos nuevos PIM.

Por una parte, los derivados de PIM según la invención tienen bajo peso molecular (aproximadamente 1.000). Están bien definidos molecularmente y su síntesis es más fácil que la de los PIM naturales. Por otra parte, no son citotóxicos.

5 Además, estos derivados poseen una actividad inmunomoduladora al menos comparable, preferiblemente mayor a la de los PIM naturales.

10 El término "alquilo" referido en la presente invención, es un radical de carbono lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, opcionalmente sustituido, que comprende de 1 a 20 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 15 átomos de carbono, por ejemplo de 1 a 6 átomos de carbono. Como dato orientativo, se pueden citar los radicales metilo, etilo, propilo, butilo, isobutilo, ventilo, hexilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecanilo, tridecanilo, tetradecanilo, pentadecanilo, hexadecanilo, heptadecanilo, octadecanilo, nonadecanilo, eicosanoilo y sus isómeros ramificados.

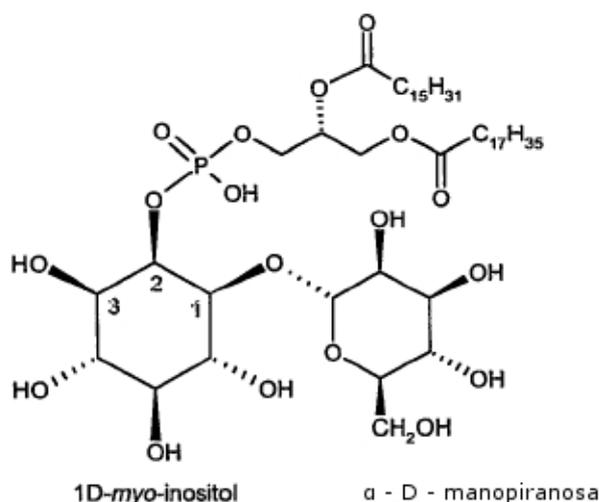
15 El término "acilo" referido en la presente invención, es un radical - COR' en el que R' es un radical alquilo tal y como se ha definido anteriormente. El grupo acilo puede igualmente significar grupo tuberculosteárico.

20 El término "alcoxi" referido en la presente invención, es un radical - OR' en el que R' es un radical alquilo tal y como se ha definido anteriormente.

25 En el contexto de la presente invención, el término "sales farmacéuticamente aceptables" comprenden las sales preparadas con ácidos o bases no tóxicas, en función de los sustituyentes presentes en los compuestos. Cuando los compuestos de la invención poseen funciones ácidas, las sales correspondientes pueden obtenerse por adición de una base orgánica o inorgánica en el compuesto con una forma neutralizada en presencia eventualmente de un disolvente en su forma preferente inerte. Pueden ser ejemplos de sales de adición, las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, amino (orgánico) o magnesio. Cuando los compuestos de la invención poseen funciones básicas, las sales pueden obtenerse por adición de un ácido orgánico o inorgánico eventualmente en un disolvente en su forma preferente inerte. Pueden ser ejemplos de sales de adición de ácido inorgánico las sales derivadas de ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrógeno carbónico, fosfórico, monohidrógeno fosfórico, dihidrógeno fosfórico, sulfúrico, monohidrógeno sulfúrico e iodhídrico. Pueden ser ejemplos de sales de adición de ácido orgánico, las sales derivadas de ácido acético, propiónico, isobutírico, maléico, malónico, benzóico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencensulfónico, p - toilsulfónico, cítrico, tartárico, metansulfónico. Están también representadas por esta invención, las sales de aminoácidos como el arginato, y sales de ácidos orgánicos como los ácidos glucurónico o galacturónico.

35 Los compuestos de la fórmula general (I), (Ia) y (Ib) pueden estar en una forma racémica o enriquecida en un enantiómero o enriquecida en un estereoisómero.

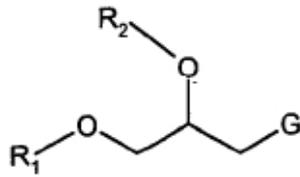
40 Uno de los compuestos preferidos de la invención es el compuesto de la fórmula (Ia) que presenta la siguiente estructura (isoPIM₁ - C16C18):



60 La invención se refiere también al procedimiento para preparar compuestos según la invención como los definidos anteriormente, en el que:

65 a) se condensa un derivado di - O - acilado o di - O - alquilado del glicerol de la fórmula (III)

5



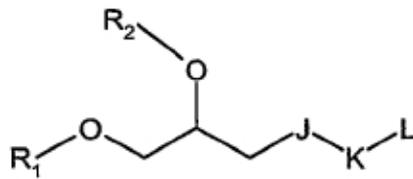
en la que

(III)

10

- G = OH o NH₂
- R₁ y R₂, tienen las mismas definiciones que anteriormente con un agente de fosfitilación, de fosforilación o de carbonización para dar un intermediario de la fórmula (IV)

15



20

(IV)

en la que

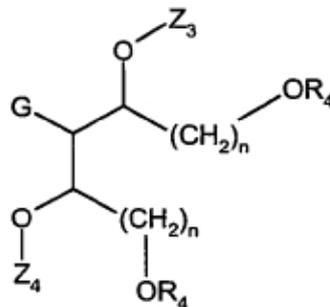
25

- J = OH o NH₂,
- K = P – Obn, P(O)n o C = O,
- L = grupo saliente
- R₁ y R₂, tienen las mismas definiciones que anteriormente;

30

b) el intermediario (IV) se condensa con un derivado de polioli o un aminopoliol de la fórmula general (V)

35



40

(V)

45

en la que

50

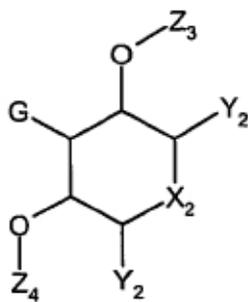
- G = OH o NH₂,
- Z₃ y Z₄, representan independientemente el uno del otro, un hexopiranososa con configuración mano, glico o galacto y llevan los grupos protectores de acetilo o metoxiacetilo o un grupo bencilo, siendo entendido siempre que al menos uno de los grupos Z₃ y Z₄ represente un azúcar protegido.
- R₄ representa un grupo protector seleccionado del grupo que contiene un grupo bencilo o un radical alcoxiacetilo en C1 – C6,

55

o se condensa el intermedio (IV) con un compuesto cíclico de la fórmula general (VI)

60

65



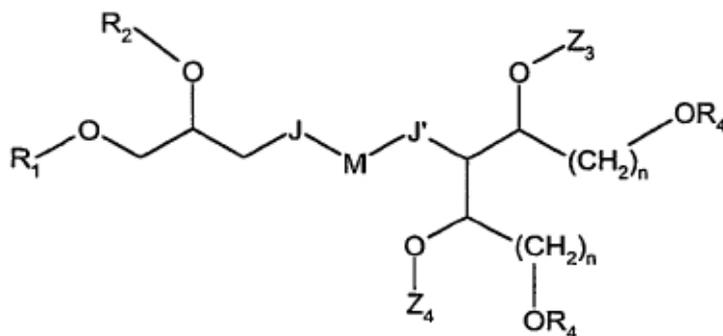
(VI)

en la que

- G = OH o NH₂,
- Z₃ y Z₄, tienen las mismas definiciones que anteriormente
- Y₂ = H o un grupo - OR₄ o un grupo - (CH₂)_n OR₄ en el que R₄ tienen las mismas definiciones que anteriormente
- X₂ = - CH₂, - CHOR₄, - NR₃, u O en el que R₃ es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C1 - C6 o un radical acilo en C1 - C20 y R₄ representa un grupo protector, como un grupo bencilo o un radical alcoxiacetilo en C1 - C6

eventualmente en presencia de un agente de acoplamiento;

c) eventualmente, se somete el compuesto obtenido de la etapa b) a una reacción de oxidación para dar un compuesto de la fórmula general (VII)

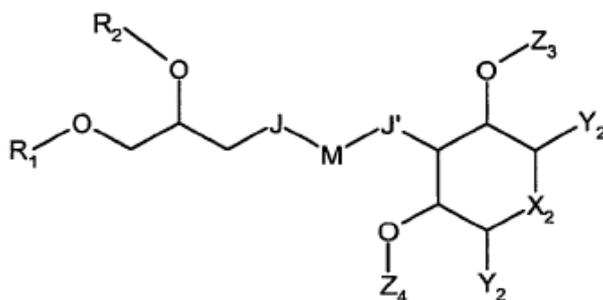


(VII)

en la que

- J y J' = OH o NH
- M = P(O)OBn o C=O
- Z₃ Z₄, R₁, R₂, R₄ tienen las mismas definiciones que anteriormente

o un compuesto de la fórmula general (VIII)



(VIII)

en la que

- J y J' = OH o NH
- M = P (O) OBn o C = O
- X₂ Y₂, Z₃, R₁, R₂ R₄ tienen las mismas definiciones que anteriormente

d) se somete el producto de la fórmula general (VII) o de la fórmula general (VIII) a una desprotección en dos etapas que consiste primero en el tratamiento con una alquilamina seleccionada del grupo formado por t – butilamina para cortar selectivamente los grupos acetilos o metoxiacetilos para luego someter los productos desacetilados a una hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilos.

Como ejemplo de agente de fosfitilación, se pueden citar la clorobis (diisopropilamina) fosfina, la benciloxidiclorofosfina, la bis (benciloxi) – N, N – dietilaminofosfina y compuestos relacionados.

Como ejemplo de agente de fosforilación, se pueden citar el difenilclorofosfato, el dibencilo fosforocloridato, el xililenoclorofosfato y compuestos relacionados.

Como agente de carbonización, se pueden citar el carbonildiimidazol, el trifosgeno y los compuestos relacionados.

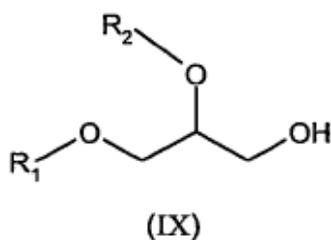
Por “grupo protector” se refiere a un grupo que permite la transformación de un grupo funcional en un grupo que será inerte en las condiciones de reacción seleccionadas para evitar las reacciones secundarias si se producen en la siguiente síntesis. Como tal se puede citar, por ejemplo, al grupo bencilo, al grupo t – butildimetilsililo, al grupo acetilo o al grupo metoxiacetilo.

Por “grupo saliente” se refiere a un grupo susceptible de ser sustituido por un reactivo nucleófilo como por ejemplo, los haluros o los tosilatos.

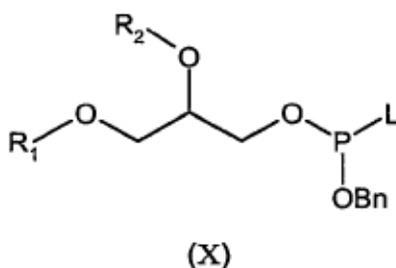
En el contexto de la presente invención, “agente de acoplamiento o agente de enlace” se refiere a un agente que permite la condensación de un derivado de ácido fosfórico o de un ácido carboxílico con un alcohol o un amino para formar los enlaces de ésteres o de amidas correspondientes. Como tal, se pueden citar por ejemplo, la dicitohexilcarbodiimida (DCC) y la N – etil N – dimetilamino – propilcarbodiimida (EDCI).

En un método de realización de la invención, los compuestos de la fórmula (I) en la que Q representa – OP (O)₂, pueden igualmente prepararse según un procedimiento en el que:

- a) se condensa un derivado di – O – acilado o di – O – alquilado del glicerol de la fórmula (IX)

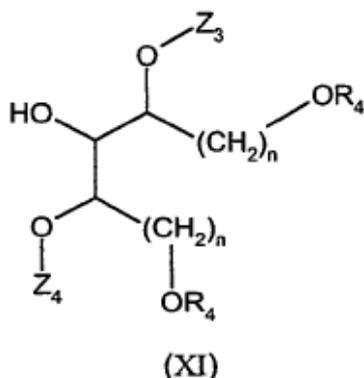


en la que R₁ y R₂ tienen las mismas definiciones que anteriormente con un agente de fosfitilación para dar un intermediario de la fórmula (X)



en la que L = grupo saliente

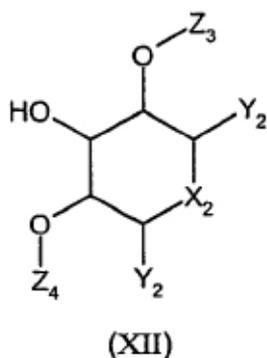
- b) entonces se condensa al intermediario con un derivado de un poliol de la fórmula general (XI)



en la que

- 20
- Z3 y Z4, representan independientemente uno del otro, un hexopiranososa con configuración mano, glico o galacto y llevan los grupos protectores de acetilo o metoxiacetilo o un grupo bencilo, con la condición de que al menos uno de los grupos Z3 y Z4 represente un azúcar protegido.
 - R4 representa un grupo protector seleccionado del grupo que contiene un grupo bencilo o un radical alcoxiacetilo en C1 – C6,

o un compuesto cíclico de la fórmula general (XII)



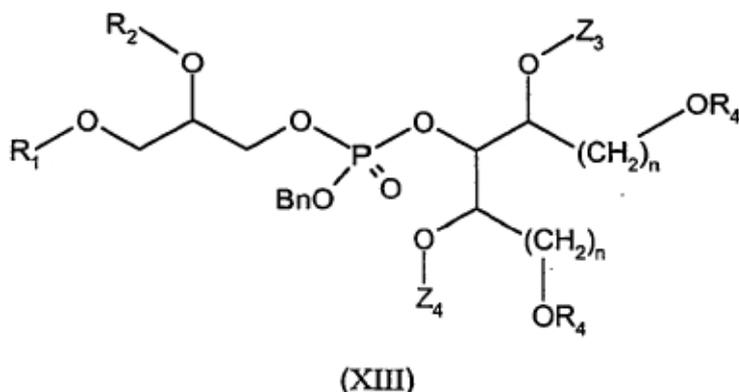
en la que

- 40
- Z3 y Z4, tienen las mismas definiciones que anteriormente
 - Y2 = H o un grupo – OR4 o un grupo – (CH2)n OR4 en el que R4 tiene la misma definición que anteriormente y n puede tomar los valores de 1 a 3
 - X2 = - CH2, - CHOR4, - NR3, u O en el que R3 y R4 tienen la misma definición que anteriormente
 - en presencia de un agente de acoplamiento seleccionado del grupo formado por 1H – tetrazol

45

50

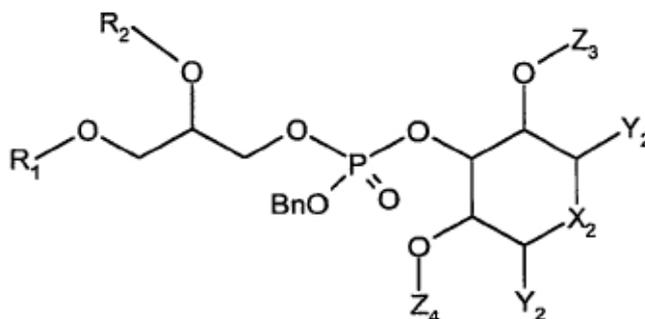
c) A continuación se somete el fosfito intermediario a una reacción de oxidación para dar un compuesto de la fórmula general (XIII)



65

en la que Z3, Z4, R1, R2, R4 tienen las mismas definiciones que anteriormente

o un compuesto de la fórmula general (XIV)



(XIV)

en la que X_2 , Y_2 , Z_3 , Z_4 , R_1 , R_2 tienen las mismas definiciones que anteriormente

d) A continuación se someten los compuestos (XIII) y (XIV) obtenidos en la etapa c) a una desprotección en dos etapas que consiste primero en el tratamiento con una alquilamina como la *t*-butilamina para cortar selectivamente los grupos acetilos o metoxiacetilos para luego someter los productos desacetilados a una hidrogenación catalítica para eliminar los grupos bencilos.

Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según la invención tal y como se define anteriormente y cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición según la invención puede comprender, además, componentes muy conocidos por los expertos en el campo farmacéutico, como los agentes estabilizantes, agentes emulsionantes, agentes de tonicidad, agentes conservadores, colorantes, excipientes, aglutinantes y lubricantes particularmente.

La composición farmacéutica según la invención puede utilizarse para prevenir o tratar los trastornos o enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

Otro objeto de la invención consiste en la utilización de una composición descrita anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una enfermedad asociada a la sobreexpresión de citoquinas o de quimioquinas, particularmente de TNF y / o de la IL - 12 en un sujeto.

Por sujeto se refiere a un mamífero, preferiblemente un humano.

La enfermedad asociada a la sobreexpresión de citoquinas o quimioquinas, particularmente del TNF y / o de la IL - 12 comprende:

- A) Las enfermedades inmunes o autoinmunes seleccionadas del grupo formado por la artritis reumatoide, la diabetes mellitas, el lupus eritematoso sistémico o la enfermedad de Basedow.
- B) El rechazo del injerto.
- C) Las infecciones virales y / o parasitarias.
- D) Los choques resultantes de una infección crónica o aguda de origen bacteriano, viral y / o parasitario.
- E) Las enfermedades inflamatorias seleccionadas del grupo formado por las enfermedades crónicas (sarcoidosis, enfermedad inflamatoria del intestino, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn) y las enfermedades inflamatorias vasculares (síndrome de defibrinación, arteriosclerosis, enfermedad de Kawazaki).
- F) Enfermedades neurodegenerativas seleccionadas del grupo formado por las enfermedades desmielinizantes (esclerosis múltiple y mielitis transversa aguda), las enfermedades extrapiramidales y la cerebelosas (lesiones del sistema corticoespinal o los trastornos de los ganglios basales).
- G) Las patologías malignas que implican tumores secretores de TNF o que implican al TNF, seleccionadas del grupo formado por leucemia (aguda, mielocítica, linfocítica o mielodisplásica crónica), linfoma (de Hodgkin o maligno (Burkitt)).
- H) Hepatitis inducida por alcohol.

La invención se refiere además a la utilización de un compuesto como el que se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada a la sobreexpresión de citoquinas o de quimioquinas, particularmente del TNF y / o de la IL - 12, dicha enfermedad comprende:

- A) Las enfermedades inmunes o autoinmunes seleccionadas del grupo formado por la artritis reumatoide, la diabetes mellitas, el lupus eritematoso sistémico o la enfermedad de Basedow.
- B) El rechazo del injerto.

C) Las infecciones virales y / o parasitarias.

D) Los choques resultantes de una infección crónica o aguda de origen bacteriano, viral y / o parasitario.

E) Las enfermedades inflamatorias seleccionadas del grupo formado por las enfermedades inflamatorias y las enfermedades inflamatorias vasculares.

F) Enfermedades neurodegenerativas seleccionadas del grupo formado por las enfermedades desmielinizantes, las enfermedades extrapiramidales y la cerebelosas.

G) Las patologías malignas que implican tumores secretores de TNF o que implican al TNF, seleccionadas del grupo formado por leucemia y linfoma.

H) Hepatitis inducida por alcohol.

En su forma preferente, dicho medicamento se destina a la prevención o al tratamiento de una enfermedad inflamatoria en el sujeto.

Dicho medicamento puede administrarse por inyección (vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, etc), por vía nasal, oral, transdérmica o por inhalación. Dependiendo del modo de administración, dicho medicamento puede prepararse como soluciones, emulsiones, comprimidos, polvos, pomadas, lociones, geles, supositorios o aerosoles.

En dicho medicamento, la concentración del compuesto de la fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable no es limitante y está comprendida preferiblemente entre el 0,1 % y el 100 % (p / p) y más preferiblemente entre el 0,5 % y el 20 % .

Resultarán evidentes otras ventajas de la invención para los expertos en la disciplina con la lectura de los ejemplos descritos a continuación y por las figuras que los acompañan.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 representa una estructura de PIM₆ natural que comprende tres grupos acilos cuya cadena alquila es lineal y en C₁₆ y un grupo acilo cuya cadena alquila está ramificada y en C₁₉.
- Las Figuras 2a, 2b y 2c representan el esquema sintético del compuesto del ejemplo 1 isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91; Figura 2a), del compuesto del ejemplo 2 isoPIM₁- C₁₆C₁₈ (SFPIM219; Figura 2b) y los compuestos de los ejemplos 3 y 4 PIM – 2 - mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t4) y PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8) (Figura 2c).
- La Figura 3 representa la inhibición de la expresión de TNF por los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia de la forma "isómero" de PIM₁ isoPIM₁PIM1-2C₁₆ (SFPIM91), si se compara con los PIM naturales Ac2PIM₆, y el PIM₁ sintético (SFPIM135), valorados en 1,3 y 10 µg / mL.
- La Figura 4 representa la ausencia de citotoxicidad del isoPIM₁PIM1-2C₁₆ (SFPIM91), valorados en 1,3 y 10 µg / mL.
- La Figura 5 representa la inhibición de la expresión de la IL – 6 por los macrófagos primarios estimulados al LPS con o sin IFN – γ, en presencia del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) si se compara con los PIM naturales Ac2PIM₆ y Ac2PIM₆ y el PIM₁ sintético (SFPIM135) en 10 µg / mL.
- La Figura 6 representa la inhibición de la expresión de la IL – 12p40 por los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) si se compara con los PIM naturales Ac2PIM₆ y Ac3PIM₃ y el PIM₁ sintético (SFPIM135) en 1 µg / mL.
- La Figura 7 representa la inhibición de la expresión de KC por los macrófagos estimulados con LPS en presencia de PIM₁ sintético (SFPIM135) y del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) en 10 µg / mL.
- La Figura 8 representa la inhibición por el PIM₁ sintético (SFPIM135) y del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) de la respuesta de las vías respiratorias a una administración local de endotoxina. La abreviatura "AUC" significa área bajo la curva.
- La Figura 9 representa la inhibición por el PIM₁ sintético (SFPIM135) y del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) del reclutamiento de células inflamatorias, principalmente de neutrófilos en el espacio bronco alveolar en respuesta a la endotoxina.
- La Figura 10 representa la inhibición por el PIM₁ sintético (SFPIM135) y del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) de la secreción de quimioquina KC que participa en el reclutamiento de los neutrófilos en el lavado bronco alveolar en respuesta a la endotoxina.
- La Figura 11 representa la inhibición por el PIM₁ sintético (SFPIM135) y del isoPIM₁PIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91) de la secreción de TNF en el lavado bronco alveolar en respuesta a la endotoxina.
- La Figura 12 representa la inhibición de la expresión de TNF por los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia de la forma "isómero" de PIM₁isoPIM₁ – C₁₆C₁₈ (SFPIM219) valorado en 1,3 y 10 µg / mL.
- La Figura 13 representa la ausencia de citotoxicidad del isoPIM₁ – C₁₆C₁₈ (SFPIM219) valorado en 1,3 y 10 µg / mL.
- La Figura 14 representa la inhibición de la expresión de la IL – 12p40 por los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia de la forma "isómero" de PIM₁isoPIM₁ – C₁₆C₁₈ (SFPIM219) valorado en 1,3 y 10 µg / mL.
- La Figura 15 representa la inhibición de la expresión de TNF por los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia de PIM₁ sintético (SFPIM135), isoPIM₁ – C₁₆C₁₈ (SFPIM219) y los compuestos PIM – 2 - mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) y PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8), valorados en 1,3, 10 y 30 µg / mL.

- La Figura 16 representa la viabilidad de los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia de PIM₁ sintético (SFPIM135), isoPIM₁ – C₁₆C₁₈ (SFPIM219) y los compuestos PIM – 2 - mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) y PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8), valorados en 1,3, 10 y 30 µg / mL.
- La Figura 17 representa la inhibición de la expresión de la IL – 12p40 por los macrófagos primarios estimulados con LPS en presencia de PIM₁ sintético (SFPIM135), isoPIM₁ – C₁₆C₁₈ (SFPIM219) y los compuestos PIM – 2 – mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) y PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8), valorados en 1,3, 10 y 30 µg / mL.

EJEMPLOS

10 Disolventes y reactivos

El diclorometano (CH₂CL₂) y el tolueno se destilan en atmósfera de argón en CaH₂, el tetrahidrofurano (THF) se destila en atmósfera de argón en sodio y benzofenoma. El dietiléter se destila en atmósfera de argón en CaH₂ y se conserva entre 0 – 4 °C en argón en tamices moleculares 4Å. Los otros disolventes utilizados proceden del fabricante Carlo – Erba.

15 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se llevan a cabo los espectros ¹H y ¹³C en un dispositivo Bruker DPX250 o en un dispositivo Bruker AV400. Los desplazamientos químicos (δ) de los espectros RMN ¹H se calibran según el testigo tetrametilsilano (TMS) por un valor de δ 0,00 ppm. Los δ de los espectros RMN ¹³C se calibran en el valor de referencia del disolvente tal y como se describe en Gottlieb et al, J. Org. Chem., 1997, 62, 7512. Los espectros ³¹P se realizan en un dispositivo Bruker AV400 y se calibran según una referencia externa que contiene un 80 % de ácido fosfórico (H₃PO₄) (δ = 0,00 ppm). Los espectros ¹⁹F se registran en un dispositivo Bruker AV400 equipado con una sonda multinuclear automática y se calibran según una referencia externa que contienen BF₃ eterato (δ = 0,00 ppm). Se realizaron las mediciones a 25° C en tubos de 5 mm de diámetro. Los espectros se realizan en disolventes deuterados del fabricante Aldrich o SDS.

30 Cromatografía

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizan en placas de aluminio “ TLC Silica gen 60F₂₅₄” de Merck. Los compuestos se describen en una lámpara de UV y / o se mojan en un revelador de ácido fosfomolibdico en ácido sulfúrico y etanol tras un calentamiento con una pistola térmica. Las cromatografías en columna se realizan en gel de sílice (Silica gel 60 (40 – 63 µm) de Merck.

35 Espectrometría de masas

Masa ESI: Se analizaron las muestras en un espectrómetro Perkin Elmer Sciex API 300 en disolventes de calidad “para análisis”. Masa de alta resolución: Se analizaron las muestras en el centro de medidas físicas de la Universidad Blaise Pascal en Aubière.

EJEMPLO 1:

45 1) Síntesis del isoPIM1 – 2C₁₆ (SFPIM91):

Dimetilacetel del L – alcanfor (compuesto 2, Figura 2a)

SFPIM – 97

Preparación según Lindberg et al. *Tetrahedron*, 2002, 58, 1387 – 1398 [24]. El ácido sulfúrico H₂SO₄ (194 µL) se añadió a una solución de L – alcanfor comercial (> 95 % Fluka) (20 g, 0,131 mol) en una mezcla de trimetil ortoformiato (95 mL, 0,908 mol, 6,9 eq) y metanol (20 mL). Tras 48 h de agitación, la mezcla se neutralizó por la adición de metóxido de sodio (NaOMe) (400 mg) y se evaporaron los disolventes. Se recogió el residuo por destilación al vacío (25 mbar) a 125 °C para dar lugar al compuesto 2 (21 g, 81 %) en forma de líquido incoloro. Espectro de ¹H RMN conforme.

1, 2 – O – (L – 1, 7, 7 – trimetilbiciclo [2, 2, 1] hept – 6 – ilideno) – D – mioinositol (compuesto 3, Figura 2a)

60 SFPIM – 10

Preparación según Lindberg et al. *Tetrahedron*, 2002, 58, 1387 – 1398 [24]. El ácido sulfúrico H₂SO₄ (173 µl) se añadió a una solución del compuesto 2 (8,06 g, 0,041 mol, 2,4 eq) y a mioinositol comercial > 99 % (Aldrich) (3,1 g, 0,0017 mol) en dimetil sulfóxido (DMSO) (34 ml). La mezcla resultante se agitó 3 h a 75 °C, después se neutralizó por adición de Et₃N (1 mL) y se concentró al vacío a 80 °C. Se añadieron al residuo del DMSO (3 ml), cloroformo (CHCl₃) (52 ml), metanol (MeOH) (3,2 ml), agua (H₂O) (1 ml) y ácido p – toluensulfónico (APTS) (11, 6 mg). La

mezcla de reacción se agitó durante 18 h, después se neutralizó por la adición de Et₃N (0,4 ml). El precipitado así formado se filtró mediante vidrio sinterizado y se lavó con CHCl₃ (2 x 40 ml). El producto bruto se volvió a cristalizar en metanol (MeOH) (que contiene 0,1 % Et₃N) para dar el compuesto **3** (1,738 g, 32 %) en forma de sólido blanco. Conforme al espectro de ¹H RMN.

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1, 2, - O – (L – 1, 7, 7 – trimetilbiciclo [2, 2, 1] hept – 6 – ilideno– D – mioinositol (compuesto 4, Figura 2a)

SFPIM – 72

Se añadió el hidruro de sodio (NaH) (1,16 g, 0,048 mol, 12 eq, 60 % en dispersión en aceite mineral) en atmósfera de argón a una solución previamente enfriada a 0 °C del compuesto **3** (1,266 g, 4,02 mmol) en DFM anhidro (30 ml). Tras 15 min de agitación a 0 °C, el bromuro de bencilo (2,9 ml, 0,024 mmol, 6 eq) se añadió gota a gota, luego, la mezcla de reacción se agitó 24 h a temperatura ambiente (aproximadamente a 20 °C). A continuación se enfrió a 0 °C, luego, el exceso de NaH se destruyó por adición de MeOH (3 ml) y el medio se diluyó con tolueno (250 ml). La fase orgánica se lavó con agua (100 ml), después con una solución de NaCl saturada (3 x 100 ml), más tarde se secó en MgSO₄. Se evaporaron los disolventes y una purificación por cromatografía en columna en gel de sílice (hexano / éter dietílico 8 / 1) dando lugar al compuesto **4** (2,15 g, 80 %) en forma de jarabe incoloro.

C₄₄H₅₀O₆ (M = 674,89 g / mol).

RMN¹H (400 MHz, CDL₃) δ 0,86 (s, 3H, CH₃), 0,87 (s, 3H, CH₃), 1,09 (s, 3H, CH₃), 1,22 – 1,33 (m, 3H), 1,34 – 1,45 (b, 1H), 1,47 (s, 0,5H), 1,50 (s, 0,5H), 1,68 – 1,76 (m, 2H), 1,9 – 2,02 (m, 2H), 3,44 (dd, 1H, H5, J₅₋₆ = 8,2 Hz, J₄₋₅ = 9,6 Hz), 3,74 (dd, 1H, H4, J₄₋₃ = 7,2 Hz), 3,77 (t, 1H, H1, J₁₋₂ = 4,2 Hz), 3,84 (dd, 1H, H6, J₁₋₆ = 8,4 Hz), 3,96 (dd, 1H, H3, J₂₋₃ = 6,2 Hz), 3,44 (dd, 1H, H5, J₅₋₆ = 8,2 Hz, J₄₋₅ = 9,6 Hz), 4,30 (dd, 1H, H2), 7,20 – 7,45 (m, 20H, 4Ph).

RMN¹³C (100 MHz, CDL₃) δ 10,27 (CH₃), 20,52 (CH₃), 20,75 (CH₃), 27,76 (CH₂), 29,89 (CH₂), 45,08 (CH₂), 45,31 (CH), 48,08 (Cq), 51,67 (Cq), 72,55 (CH₂, CH₂Ph), 73,19 (CH, C2), 74,00 (CH₂, CH₂Ph), 75,08 (CH₂, CH₂Ph), 75,25 (CH₂, CH₂Ph), 76,32 (CH, C3), 77,50 (CH, C1), 80,86 (CH, C6), 82,22 (CH, C5), 83,31 (CH, C4), 117,77 (Cq), 127,55 – 128,44 (CH, Ph), 138,55 – 138,89 (Cq, Ph, 4 líneas).

SM – IS: M calculada 674,36; encontrada: 675,5 [M + H]⁺, 692,5 [M + NH₄]⁺, 697,5 [M + Na]⁺, 713,5 [M + K]⁺.

3,4,5,6 – 4 – O – bencil– D – mioinositol (compuesto 5, Figura 2a)

SFPIM – 17

El compuesto **4** (1,53 g, 2,26 mmol) se suspendió en una solución acuosa de ácido acético al 80 % (75 ml) y el medio se agitó a 100 °C durante 4 h. Se evaporaron los disolventes al vacío para luego coevaporarlos con tolueno. Se purificó el residuo por cromatografía en columna en gel de sílice (tolueno / acetona 35 / 1 con un gradiente hasta 10 / 1) para dar lugar al compuesto **5** (1,029 g, 84 %) en forma de sólido blanco.

C₃₄H₃₆O₆ (M = 540,66 g / mol).

RMN¹H (400 MHz, CDL₃) δ 2,53 (d, 1H, OH – 1, J_{1-OH} = 4,8 Hz), 2,64 (s, 1H, OH – 2), 3,42 – 3,51 (m, 3H, H3, H1, H5), 3,83 (dd, 1H, H6, J₆₋₅ = 9,6 Hz, J₁₋₆ = 9,6 Hz), 3,97 (dd, 1H, H4, J₃₋₄ = 9,6 Hz, J₄₋₅ = 9,6 Hz), 4,17 (dd, 1H, H2, J₂₋₃ = 2,8 Hz, J₂₋₁ = 2,8 Hz), 4,65 – 4,96 (m, 8H, 4 CH₂Ph), 7,25 – 7,4 (m, 20 H, 4 x 5 CH_{Ar}).

RMN¹³C (100 MHz, CDL₃) δ 69,33 (CH, C2), 71,87 (CH, C1), 72,84 (CH₂, CH₂Ph), 75,71 (CH₂, CH₂Ph), 75,82 (CH₂, CH₂Ph), 76,07 (CH₂, CH₂Ph), 80,11 (CH, C3), 81,45 (CH, C6), 81,74 (CH, C4), 83,33 (CH, C5), 127,73 – 128,67 (CH, Ph, 9 líneas), 137,89 (Cq, Ph), 138,62 (2Cq, Ph), 138,73 (Cq, Ph).

MS – IS: M calculada 540,25; encontrada: 541,5 [M + H]⁺, 558,5 [M + NH₄]⁺, 563,5 [M + Na]⁺, 579,5 [M + K]⁺.

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 – O – metoxibencil – D – mioinositol (compuesto 6, Figura 2a)

SFPIM104

Se calentó una suspensión del compuesto **5** (301 mg, 0,557 mmol) y de óxido de dibutilestaño (193 mg, 0,557 mmol, 1eq.) en tolueno (5 ml) durante 18 h a 140 °C en atmósfera de argón utilizando una trampa de Dean Stark para recuperar el agua formada. El medio se concentró al vacío y el residuo se disolvió en DMF anhidro con fluoruro de cesio (CsF) (172 mg, 1,11 mmol) y cloruro de 4 – metoxibencilo (76 µl, 0,557 mmol, 1 eq). La reacción se agitó durante 7 h y media y, a continuación, se evaporaron los disolventes a sequedad para dejar un residuo sólido blanco que se disolvió parcialmente en acetato de etilo (20 ml). El sólido residual se retiró a través de filtros de vidrio sinterizado y el filtrado se evaporó a sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 7 / 3) para dar lugar al compuesto **6** (262 mg, 71 %) en forma de sólido blanco.

C₄₂H₄₄O₇ (M = 660,81 g / mol).

RMN¹H (499 MHz, CDCL₃) δ 2,43 (s, 1H, OH), 3,27 y 3,28 (2 dd, 2H, H1 y H3, J₁₋₆ = J₃₋₄ = 9,6 Hz, J₁₋₂ = J₂₋₃ = 2,8 Hz), 3,69 (s, 3H, CH₃), 3,89 y 3,91 (2 dd, 2H, H4 y H6), 4,09 (dd, 1H, H2, J₂₋₃ = J₂₋₁ = 2,8 Hz), 4,53 (s, 2H, CH₂Ph), 4,61 (s, 2H, CH₂Ph), 4,72 – 4,83 (m, 63 H, 3 x CH₂Ph), 6,74 y 6,76 (2s, 2H, CH_{Ar} PMB), 7,17 – 7,3 (m, 23H, CH_{Ar}).

RMN¹³C (100 MHz, CDCL₃) δ 55,3 (CH₃), 67,59 (CH, C2), 72,44 (CH₂), 72,76 (CH₂), 75,95 (CH₂), 75,98 (2 x CH₂), 79,55 y 79,86 (2 CH, C1 y C3), 81,27 y 81,29 (2 CH, C4 y C6), 83,26 (CH, C5), 127,61 – 129,59 (CH_{Ar}, 8 líneas), 130,10 (Cq), 138,05 (Cq), 138,77 (Cq), 138,83 (Cq), 138,88 (Cq), 159,42 (Cq).

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 – O – (2, 3, 4, 6 – 4 – acetil – α – D – manopiranosil) – D – mioinositol (compuesto 7, Figura 2a)*SFPIM63*

5 Se canuló una solución del compuesto **6** (457 mg, 0,69 mmol, 1 eq) en CH₂Cl₂ (10 ml) en atmósfera de argón en una solución del compuesto **1** (845 mg, 2,08 mmol, 3 eq) en CH₂Cl₂ (10 ml). La mezcla reactiva se agitó en presencia de tamices moleculares 4Å durante 20 min y, a continuación, se enfrió a -20 °C. Se añadió triflato de plata (1,066 g, 4,15 mmol, 6 eq) y se agitó el medio reactivo durante 1 h hasta que la temperatura aumentó a 20 °C. La reacción se neutralizó añadiendo trietilamina (1 ml), y, a continuación, se diluyó con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (30 ml), seguida de NaCl (30 ml) y se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 3 / 1) para dar lugar al compuesto **7** (309 mg, 21 %).

C₄₈H₅₄O₁₅ (M = 870,96 g / mol).

15 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,38 – 7,20 (m, 20H, CH_{Ar}), 5,43 (dd, 1H, H3', J_{3'-2'} = 2,6 Hz, J_{3'-4'} = 10 Hz), 5,34 (dd, 1H, H2', J_{2'-1'} = 1 Hz), 5,27 (dd, 1H, H4', J_{4'-5'} = 10 Hz), 5,07 (d, 1H, H1', J_{1-2'} = 1 Hz), 4,86 (s, 4H, 2 CHB₂Ph), 4,85 (d, 1H, CH₂Ph, J = 10,8 Hz), 4,80 (d, 1H, CH₂Ph, J = 10,8 Hz), 4,75 (d, 1H, CH₂Ph, J = 11,2 Hz), 4,68 (d, 1H, CH₂Ph, J = 11,2 Hz), 4,29 (m, 3H, H2, H5', H6A'), 4,03 (m, 2H, H6B', H4 o H6), 3,95 (dd, 1H, J₅₋₄ = J₅₋₆ = 9,6 Hz), 3,54 (dd, 1H, H1 o H3, J = 2,8 y 10 Hz), 3,45 (dd, 1H, H4 o H6), 3,43 (dd, 1H, H3 o H1), 2,08 (s, 3H, CH₃Ac), 2,06 (s, 3H, CH₃Ac), 2,03 (s, 3H, CH₃Ac), 2,00 (s, 3H, CH₃Ac).

20 RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 170,74, 169,94, 169,91, 169,72, 138,68, 138,64, 138,33, 137,87, 128,65 – 127,75, 99,85 (C1'), 83,12, 81,27, 81,07, 80,42, 80,13, 76,28, 76,07, 76,01, 73,15, 69,64 (C2'), 69,54 (C5'), 69,20 (C3'), 68,92 (C2), 66,65 (C4'), 63,16 (c6'), 20,86, 20,78.

MS – IS: M calculada 870,65; encontrada 888,5 [M + NH₄]⁺, 893,5 [M + Na]⁺, 909,0 [M + K]⁺.

25

1, 2 – dipalmitoil – 3 – O – bencil – sn – glicerol (compuesto 8, Figura 2a)*SFPIM77*

30 Se añadieron el clorhidrato de carbodiimida (EDC) (dimetilamino – propil) (847 mg, 4,42 mmol, 3 eq) y la DMAP (54 mg, 0,44 mmol, 0,3 eq) a una solución de 3 – O – bencil – sn – glicerol (268 mg, 1,47 mmol, 1 eq) y de ácido palmítico (943 mg, 3,68 mmol, 2,5 eq) en atmósfera de argón en CH₂Cl₂ anhidro (20 ml). La mezcla reactiva se agitó durante 18 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y, a continuación, se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución de HCl 1N (50 ml), agua (50 ml) y, a continuación, con una solución de NaCl saturada (50 ml) y se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 6 / 1) para dar lugar al compuesto **8** (909 mg, 93 %) en forma de sólido blanco.

C₄₂H₇₄O₅ (M = 659,06 g / mol).

40 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 3H, CH₃), 1,25 (b, 48H, 24 CH₂), 1,59 (b, 4H, 2 x 2H3"), 2,28 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 2,32 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,59 (d, 2H, 2H3a), 4,19 (dd, 1H, H1aA, J_{1aA-1aB} = 12 Hz, J_{1aA-2a} = 6,4 Hz), 4,35 (dd, 1H, H1aB, J_{1aB-2a} = 3,6 Hz), 4,53 (AB, 2H, CH₂Ph, J = 12,2 Hz), 5,24 (m, 1H, H2a), 7,32 (m, 5H, CH_{Ar}).

MS – IS: M calculada 658,55; encontrada: 660,0 [M + H]⁺, 677,0 [M + NH₄]⁺, 682,0 [M + Na]⁺.

45

1, 2 – O – Dipalmitoil – sn – glicerol (compuesto 9, Figura 2a)*SFPIM82*

50 El compuesto **8** (890 mg, 1,35 mmol) se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂ / EtOH (1 / 1,5, 25 ml). Se añadió un exceso de paladio en carbono (Pd / C 10 %) y la reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno (balón). La mezcla reactiva se calentó a 40 °C para conseguir una mejor disolución del producto esperado y, a continuación, se retiró el catalizador mediante la filtración con una membrana millipore. El sólido se aclaró 3 veces con 20 ml de mezcla de CH₂Cl₂ / EtOH (1 / 1) previamente calentada a 4 °C. Los disolventes residuales se evaporaron al vacío para dar lugar al compuesto esperado **9** (757 mg, 99 %) en forma de sólido blanco.

55 C₃₅H₆₈O₅ (M = 568,93 g / mol).

60 RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 6H, 2 CH₃, J = 6,8 Hz), 1,26 (m, 48H, 24 CH₂), 1,62 (m, 4H, 2H3"), 1,99 (t, 1H, OH, J = 6,5 Hz), 2,32 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 2,35 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,73 (dd, 2H, 2H3a, J = 5 y 6,2 Hz), 4,23 (dd, 1H, H1aA, J_{1aA-1aB} = 12 Hz, J_{1aA-2a} = 5,5 Hz), 4,35 (dd, 1H, H1aB, J_{1aB-2a} = 4,5 Hz), 5,08 (m, 1H, H2a).

MS – IS: M calculada 568,51; encontrada: 570,0 [M + H]⁺, 587,0 [M + NH₄]⁺, 592,0 [M + Na]⁺.

60

(S) – 2, 3 – Dipalmitoiloxipropilbencil (N, N – diisopropilamino) fosforamidita (compuesto 11, Figura 2a)*SFPIM83*

65 El compuesto **9** (200 mg, 0,352 mmol), previamente secado durante 18 h al vacío en P₂O₅, se disolvió en CH₂Cl₂ anhidro (15ml) y se le añadió una solución de bis(N, N – diisopropilamino) bencilfosfina (0,84 M, 938 μ l,

0,788 mmol, 2,24 eq) (compuesto 10). La mezcla reactiva se enfrió a 0 °C y se le añadió 1H – tetrazol sólido (32 mg, 0,458 mmol, 1,3 eq). Tras 1 h y media de agitación, el disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etileno 9 / 1 con 3 % de Et₃N) para dar lugar al compuesto **11** (259mg, 92 %) en forma de jarabe incoloro.

$C_{48}H_{88}NO_6P$ (M = 806,21 g / mol).

RMN ¹H (250 Mhz, CDCl₃) δ 0,88 (app t, 6 H, 2CH₃), 1,16 – 1,30 (m, 60H, 24 CH₂, 4 x CH₃ isopropil), 1,60 (m, 4H, 2CH₂), 2,29 (t, 4H, 2CH₂, J = 7,5 Hz), 3,55 – 3,85 (m, 4H, 2CH isopropil, 2H3a), 4,17 (ddd, 1H, H1_{AB}, J_{1aB-1aA} = 12 Hz, J_{1aB-2a} = 6,3 Hz, J_{1aB-P} = 3 Hz), 4,34 (ddd, 1H, H1_{aA}, J_{1aA-2a} = J_{1aA-P} = 4,5 Hz), 4,71 (m, 2H, C₂Ph), 5,19 (m, 1H, H2a), 7,2 – 7,4 (m, 5H, 5CH_{Ar}).

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 – O – (2, 3, 4, 6 – 4 – O – acetil – α – D – manopiranosil) – 2 – O – [(S) – 2, 3 – dipalmitoiloxipropil] (bencil) fosforil] – D – mioinositol (compuesto 12, Figura 2a)

SFPIM87

El compuesto **11** (259 mg, 0,321 mmol, 2,8 eq) y el compuesto **7** (100 mg, 0,115 mmol) se coevaporaron juntos con tolueno anhidro (2 x 10 ml) y, a continuación, se secaron durante 30 min al vacío de alto grado antes de ser disueltos, en atmósfera de argón, en CH₂Cl₂ anhidro (12 ml). Se añadió 1H – tetrazol sólido (26 mg, 0,386 mmol, 3,2 eq) a 0 °C y, tras 1 h y media de agitación a temperatura ambiente, la mezcla reactiva se enfrió a -40 °C. Se añadió gota a gota una solución de ácido metacloroperbenzóico (m – CPBA) (50 %, 79 mg, 0,230 mmol, 2 eq) en CH₂Cl₂ anhidro. Tras las 2 horas de agitación que permitieron al medio reactivo alcanzar la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), la reacción se detuvo añadiendo una solución acuosa al 10 % de Na₂S₂O₃ (65 ml) y la mezcla se extrajo con dietil éter (Et₂O) (130 ml). La fase orgánica se lavó con una solución acuosa al 5 % de NAHCO₃ (3 x 65 ml) y, a continuación, se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 4 / 1) para dar una parte del primer p – estereoisómero del compuesto **12** (42 mg), una parte de la mezcla de isómeros (23 mg) y una parte del segundo isómero del compuesto **12** (38 mg) (rendimiento global 56 %).

$C_{90}H_{127}O_{22}P$ (M = 1591,88 g / mol).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 173, 36, 172,97, 170,72, 170,15, 169,89, 169,53, 138,36, 138,33, 137,90, 137,30, 136,00 (d), 135,67 (d), 128,82 – 172,08, 83,22, 81,12, 80,89, 78,75 (d), 76,11, 76,07, 76,01, 75,91, 72,99, 69,90, 69,82, 69,39, 69,33, 69,16, 67,45, 67,39, 65,91, 65,43, 62,89, 62,28, 34,33, 34,16, 32,06, 29,84, 29,79, 29,65, 29,50, 29,46, 29,28, 29,27, 24,98, 22,82, 20,96, 20,83, 20,74, 14,25.

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 – O – α – D – manopiranosil – 2 – O – [(S) – 2, 3 – dipalmotoiloxipropil] (bencil) fosforil] – D – mioinositol (compuesto 13, Figura 2a)

SFPIM90

Se añadió una solución de hidróxido de sodio 0,1 M preparada recientemente (1 ml, 0,1 mmol, 4eq) a una solución del compuesto **12** (40 mg, 0,025 mmol) en tetrahidrofurano (THF) (3 ml). La mezcla reactiva se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y, a continuación, se diluyó con CH₂Cl₂ (10 ml). La fase orgánica se lavó con H₂O y, a continuación, se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó para dar lugar al compuesto esperado **13** (36 mg, 100 %). Los espectros RMN del producto bruto indican la presencia de aproximadamente un 30 % de producto aun acetilado.

1 – O – α – D – manopiranosil – 2 – O – [(S) – 2, 3 – dipalmitoiloxipropil] fosforil] – D – mioinositol (compuesto 14, Figura 2a)

SFPIM91

El compuesto **13** (36 mg, 0,025 mmol) obtenido anteriormente se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂ / EtOH / ácido acético (4 / 5 / 0,5 ml). Se añadió un exceso de paladio en carbono (Pd / C 10 %) y la reacción se agitó durante 6 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno (balón). El catalizador se retiró por filtración mediante una membrana millipore y se aclaró 3 veces con 20 ml de mezcla de CH₂Cl₂ / EtOH (1 / 1). Los disolventes residuales se evaporaron al vacío y se coevaporaron con tolueno para dar lugar al compuesto **14** (25 mg, 100 %) en forma de sólido blanco.

2) Preparación de cultivos primarios de macrófagos:

Se obtuvieron células múridas de médula ósea del fémur de ratones salvajes. Las células obtenidas se cultivaron (10⁶ / ml) durante 7 días en un medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) complementado con 20 % de suero equino y 30 % de medio celular condicionado L929 [22]. Transcurridos tres días de la renovación del medio, la preparación celular comprendía una población homogénea de macrófagos.

3) Estimulación de los macrófagos de ratones salvajes mediante LPS en presencia y en ausencia de isómero de PIM isoPIM₁ – 2C₁₆ (SFPIM91)

Se cultivaron los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones salvajes en placas de cultivo de 96 pocillos de 10^5 células por pocillo y, a continuación, se estimularon con LPS (100 ng / ml, *Escherichia. Coli*, serotipo O111 : B4, SIGMA) con o sin PIM análogo (1 – 10 μ g / ml). Todas las preparaciones de PIM análogo liofilizadas empleadas son solubilizadas en DMSO y adicionadas a los cultivos a una concentración final máxima no citotóxica de 1 %.

Tras una estimulación de 24 horas, los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y analizados en cuanto a su contenido en citoquina TFN – α , IL – 6, IL – 12p40 y KC mediante ELISA (DUOSET R&D) y en cuanto a su contenido en nitrito mediante la prueba de Griess.

Los resultados mostraron que la forma “isomérica” de PIM₁ isoPIM₁ – 2C₁₆ (SFPIM91) inhibió fuertemente la síntesis de TFN – α inducidos en los macrófagos estimulados con LPS, en comparación con los PIM naturales Ac2PIM₆ y Ac2PIM₆, y el PIM₁ sintético (SFPIM135) (Figura 3). Se obtuvieron resultados similares para el NO. Un test de citotoxicidad MTT en los mismos macrófagos en presencia de diferentes partes de PIM permitió demostrar la ausencia de citotoxicidad de las diferentes preparaciones para las células (Figura 4). La expresión de IL – 6 mediante macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de interferón – γ y también se inhibió (Figura 5). La secreción de IL – 12p40 en respuesta a LPS ya se había inhibido fuertemente en concentraciones de 1 μ g / ml de PIM o de IsoPIM (Figura 6). Del mismo modo, la producción de quimioquina KC, implicada en el reclutamiento de células inflamatorias como los neutrófilos, también se redujo fuertemente en presencia de PIM₁ (SFPIM135) o más fuertemente de isoPIM₁ – 2C₁₆ (SFPIM91) (Figura 7).

En la medida en la que las preparaciones de PIM₂ y de PIM₆ fueron identificadas inicialmente como estimulantes de la secreción de TFN y de IL – 12p40 por cultivos primarios de macrófagos, las preparaciones de isómero de PIM se probaron por su capacidad para inducir una respuesta pro-inflamatoria a concentraciones de hasta 20 μ g / ml. Los resultados obtenidos por las preparaciones de isómero de PIM no mostraron estimulación alguna de la respuesta inflamatoria (TNF – α e IL – 12p40) de los cultivos primarios de macrófagos.

4) Actividad antiinflamatoria *in vivo* de los derivados sintéticos de PIM

Modelo *in vivo* de dificultad respiratoria

Los ratones C57BL / 6 recibieron el vehículo solo (solución salina con 1,25 % DMSO) o LPS (1 μ g por ratón) de *Escherichia coli* (serotipo O111 : B4; Sigma, St Louis, MO, USA) en ausencia o en presencia de PIM₁ (SFPIM135) o de isoPIM₁ – 2C₁₆ (SFPIM91) (50 μ g / ratón), aplicados por instilación nasal en un volumen de 40 μ l con anestesia ligera de ketamina y xilacina.

La resistencia de las vías respiratorias se evaluó por pletismografía no invasiva en un período de 3 horas tras la aplicación de LPS. Se dispusieron ratones en vigilia en cámaras de pletismografía (EMKA Technologies, París, Francia). Se registró el aumento de la pausa respiratoria (Penh) como medida de las molestias respiratorias y se analizó utilizando el programa “Datanalyst Software” (EMKA Technologies, París, Francia) y se expresó en media aproximada de SEM de Penh de n = 2 – 3 ratones individuales por grupo [23].

Lavado bronco alveolar (BAL)

El fluido BAL se recolectó canulando la tráquea y lavando los pulmones cuatro veces con 0,5 ml de PBS frío. Tras la centrifugación a 400 xg durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante del primer lavado se conservó a -70 °C para el posterior análisis de las citoquinas. Se contaron los *pools* de pellet celulares con azul de Tripano (Sigma) en una célula hematocitométrica. Para el conteo diferencial, las células se marcaron con Diff – Quik Staining (Merz & Dade AG., Duding, Switzerland). Se contaron 200 células.

Determinación de las citoquinas

Las concentraciones de TFN y de KC se evaluaron mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) según las directrices del fabricante (R&D Duoset, Minneapolis, MO).

Resultados

El TNF es esencial para la disfunción respiratoria aguda inducida por el LPS como se mostró en los ratones con deficiencias de TFN [23]. Para determinar su actividad potencial *in vivo*, el PIM₁ (SFPIM135) y el isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91) se probaron por su actividad inhibitoria en un modelo mudo de inflamación pulmonar aguda y deficiencia respiratoria inducidas mediante la aplicación intranasal de LPS (1 μ g / ratón).

A los ratones C57BL / 6 se les administró por vía intranasal 1 μ g de LPS y se registró Penh durante 200 min utilizando la pletismografía no invasiva. El gráfico de la Figura 11 representa el área bajo la curva (de 70 a 175 min). Los valores que representan la media aproximada de SEM de n = 2 – 3 ratones por grupo.

Típicamente, los ratones que recibieron una aplicación intranasal de LPS desarrollaron un aumento agudo de Penh (crecimiento de la pausa respiratoria o *enhanced respiratory pause*), medida de la disfunción respiratoria, que comenzó 90 min después de la aplicación de LPS (Figura 8).

5 La adición de PIM₁ (SFPIM135) causa la reducción parcial del crecimiento de Penh inducido por el LPS. Esta inhibición resulta más pronunciada tras la adición de isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91) (Figura 8).

10 El LPS provoca el reclutamiento de las células inflamatorias en las vías respiratorias, medida en número total de células en el fluido bronco alveolar (BAL) de los ratones tratados con LPS. En este caso, el número de células inflamatorias detectado en BAL tras 18 min de la aplicación de LPS, se redujo parcialmente en presencia de isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91), y menos en presencia de PIM₁ (SFPIM135) (Figura 9). Los neutrófilos constituyen la mayor parte de las células inflamatorias reclutadas tras la exposición a LPS. Los macrófagos son esencialmente invariables. En esta primera experiencia, se observó una reducción del número de neutrófilos de hasta el 50 % o el 70 % en 2 de cada 3 ratones que habían recibido el PIM₁ (SFPIM135) o el isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91), respectivamente.

15 El reclutamiento de los neutrófilos depende de diferentes factores, entre ellos la quimioquina KC, incluso si no depende de manera crítica del TNF [23]. En la Figura 10, los ratones tratados se sacrificaron 24 horas después de la aplicación intranasal de 1 µg de LPS y el fluido bronco alveolar se analizó para determinar el contenido de quimioquina KC. La secreción de KC en el espacio bronco alveolar disminuyó fuertemente debido a la administración de PIM₁ (SFPIM135) o de isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91) (Figura 10). Igualmente, la liberación de TNF en el espacio bronco alveolar disminuyó debido a la coadministración de PIM₁ (SFPIM135) o más fuertemente de isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91) (Figura 11). Los valores representan la media aproximada de SEM de n = 3 ratones por grupo, de un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

20 Otros experimentos complementarios indican que isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91) causa la disminución de la expresión de numerosas citoquinas y quimioquinas inflamatorias en los pulmones expuestos a las endotoxinas.

25 En estas experiencias, isoPIM₁-2C₁₆ (SFPIM91) causa la inhibición marcada de la inflamación pulmonar y la resistencia de las vías respiratorias en respuesta a las endotoxinas locales.

30

EJEMPLO 2:

1) Síntesis del compuesto 25 (IsoPIM1 – C₁₆ – C₁₈) (Figura 2b)

35 **Per – O – metoxiacetil – D – manopiranososa (compuesto 15, Figura 2b)**

SFPIM – 93

40 Se añadió cloruro de metoxiacetilo (660 µl, 7,22 mmol, 6,5 eq) gota a gota a una solución de D – manosa (200 mg, 1,11 mmol) en piridina (6 ml) a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y la mezcla se agitó durante 18 h. Los disolventes se evaporaron y el residuo se diluyó en acetato de etilo (30 ml). A continuación, la solución se lavó con una solución acuosa de HCl 1 N (10 ml) y, después, con una solución de NaCl saturada (10 ml) y se secó en sulfato de magnesio (MgSO₄). Los disolventes se evaporaron y la purificación por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 2 / 1 y 1 / 1) dio lugar al compuesto **15** puro (518 mg, 86 %) en forma de jarabe amarillo.

45 C₂₁H₃₂O₁₆ (M = 540,47 g / mol).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 3,41 (s, 6H), 3,45 (s, 3H), 3,49 (s, 6H), 3,85 – 4,26 (m, 14H), 5,25 – 5,53 (m, 3H), 6,21 (s, 1H);

50 RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃) δ 59,34, 59,42, 59,50, 61,83, 65,50, 68,35, 68,82, 69,14, 69,26, 69,37, 70,44, 90,49, 167,61, 169,08, 169,22, 169,33, 169,90.

MS IS: M calculada 540,17; encontrada: 558,5 [M + NH₄]⁺, 563,5 [M + Na]⁺, 579,5 [M + K]⁺.

2, 3, 4, 6 – 4 – O – metoxiacetil – D – manopiranososa (compuesto 16, Figura 2b)

55 SFPIM – 114

Se añadió acetato de hidracina (500 mg, 5,48 mmol, 1,6 eq) a una solución del compuesto **15** (1,850 g, 3,4 mmol) en dimetil formamida (DMF) (15 ml) enfriada con anterioridad a -20 °C. Tras una hora de agitación a 20 °C, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (150 ml) y, a continuación, se lavó con una solución de NaCl saturada (5 x 50 ml), se secó en MgSO₄ y se concentró al vacío para dar lugar al compuesto **16** (1,331 g, 83 %) en forma de jarabe amarillo.

60 C₁₈H₂₈O₁₄ (M = 468,42 g / mol).

65 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,34 (s, 3H_s), 3,35 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,41 (s, 3H) (4 Ome), 3,87 (AB, 2H, CH₂OMe), 3,95 (s, 2H, CH₂OMe), 4,02 (s, 2H, CH₂OMe), 4,08 (AB, 2H, CH₂OMe), 4,2 – 4,35 (m, 3H, H^{5'}, H^{6'A}, H^{6'B}), 5,19 (d, 1H, H^{1'}, J₁₋₂ = 1,8 Hz), 5,27 (t, 1H, H^{4'}, J₄₋₃ = 10 Hz), 5,3 (dd, 1H, H^{2'}, J₂₋₃ = 3,2 Hz), 5,49 (dd, 1H, H^{3'}).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 59,45 (CH₃), 59,50 (CH₃), 62,62 (C6'), 66,53 (CH₂, C4'), 68,00 (CH, C5'), 69,29 (CH, C3'), 69,34 (CH₂), 69,41 (CH₂), 69,52 (CH₂), 70,50 (CH, C2'), 91,98 (CH, C1').

2, 3, 4, 6 – 4 – O – metoxiacetil – 1 – O – tricloraacetimidoil – α – D – manopiranoose (compuesto 17, Figura 2b)

5

SFPIM – 125

Se añadió tricloraacetnitrilo (1,28 ml, 12,80 mmol, 12 eq) a una mezcla del compuesto **16** (500 mg, 1,067 mmol) y de 1, 8 – diazabiclo [5,4,0] undec – 7 – eno (DBU) (45 µl, 0,299 mmol, 0,28 eq) en diclorometano (CH₂Cl₂) anhidro (10 ml) a temperatura ambiente (20 °C) en atmósfera de argón. Tras 10 min de agitación, la mezcla reactiva se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 1 / 2 con 0,2 % de trielamina (Et₃N)) y dio lugar así al compuesto **17** (479 mg, 73 %) en forma de jarabe amarillo.

C₂₀H₂₈O₁₄NCl₃ (M = 614,81 g / mol).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 3,41 (s, 3H, CH₃), 3,42 (s, 3H, CH₃), 3,45 (s, 3H, CH₃), 3,50 (s, 3H, CH₃), 3,95 (dd, 2H, CH₂OMe), 4,03 (s, 2H, CH₂OMe), 4,08 (s, 2H, CH₂OMe), 4,19 (dd, 2H, CH₂OMe), 4,22 – 4,33 (m, 2H, H5', H6'A), 4,40 (dd, 1H, J = 5,3 y 13,3 Hz, H6'B), 5,45 (t, 1H, J = 9,8 Hz, H4'), 5,55 (dd, 1H, J = 5,2 y 10,0 Hz, H3'), 5,59 (dd, 1H, H2'), 6,32 (d, 1H, J = 1,5 Hz, H1'), 8,84 (s, 1H, NH).

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 O – (2, 3, 4, 5, 6 – 4 – metoxiacetil – α – D – manopiranosil) – D – mioinositol (compuesto 18, Figura 2b)

20

SFPIM – 207

Se unieron el compuesto aceptador **6** (940 mg, 1,42 mmol, 1 eq) y el compuesto donador **17** (1,16 g, 1,89 mmol, 1,3 eq) en un mismo balón y se sometieron al vacío en P₂O₅ durante 18 h. La mezcla se colocó a continuación en atmósfera de argón y se le añadió un tamiz 4Å. El balón se dejó en flujo de argón durante 10 minutos y, a continuación, se le añadió CH₂Cl₂ anhidro (7 ml). Transcurridos otros 30 min de agitación en argón, el medio reactivo se enfrió a 0 °C y se añadió TMSOTf (68 µl, 0,38 mmol) gota a gota. Tras 5 minutos de agitación a 0 °C y 1 hora a temperatura ambiente (20 °C) en atmósfera de argón, la mezcla reactiva se enfrió a 0 °C y la reacción se detuvo al añadir Et₃N (1 ml). El tamiz se filtró a través de vidrio sinterizado, los disolventes se evaporaron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 1 / 1) para dar lugar al compuesto **18** (296 mg, 21 %). (Se aisló igualmente una fracción de 350 mg del compuesto **18** en mezcla con el isómero inicialmente esperado, que había perdido el PMB pero estaba glicosilado en la posición 2 del inositol).

C₅₂H₆₂O₁₉ (M = 991,06 g / mol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 2,89 (m, 1H, OH), 3,34 (s, 3H, CH₃), 3,41 (s, 3H, CH₃), 3,42 (s, 3H, CH₃), 3,44 (s, 3H, CH₃), 3,41 – 3,48 (m, 2H, 2CH_{ins}), 3,45 (dd, 1H, CH_{ins}, J = 2,4, 6,0 Hz), 3,86 – 4,16 (m, 8H, 4CH₂OMe), 4,15 (dd, 1H, H6'A, J_{6'A-5'} = 2,4 J_{6'A-6'B} = 12 Hz), 4,29 (br s, 1H, H2), 4,34 (dd, 1H, H6'B, J_{6'B-5'} = 4,8 Hz), 4,43 (ddd, 1H, H5'), 4,65 – 4,91 (m, 8H, 4CH₂Ph), 5,07 (d, 1H, H1', J_{1'-2'} = 2 Hz), 5,31 (t, 1H, H4', J_{4'-3'} = J_{4'-5'} = 10,0 Hz), 5,41 (dd, 1H, H2', J_{2'-3'} = 3,2 Hz), 5,56 (dd, 1H, H3'), 7,15 – 7,4 (m, 20H, 4 x 5CH_{Ar}).

RMN ¹³C (69,9 MHz, CDCl₃) δ 59,42, 59,48, 59,52, 63,12 (C6'), 66,65 (4'), 68,83 (C5'), 69,26 (C2), 69,38 (C3'), 69,46 (2CH₂OMe), 69,49 (CH₂OMe), 69,74 (CH₂OMe), 69,87 (C2'), 73,17 (CH₂Ph), 76,0 (CH₂Ph), 76,03 (CH₂Ph), 76,28 (CH₂Ph), 80,27, 80,31, 31,15, 81,53 y 83,12 (CH_{ins}), 99,47 (C1'), 127,69 – 128,62 (11 picos, CH_{Ar}), 137,88, 138,26, 138,57, 138,63, 169,25 (CO), 169,31 (CO), 169,49 (CO), 169,86 (CO).

45

3 – O – bencil – 1 – O – octadecanoil – sn – glicerol (compuesto 19, Figura 2b)

SFPIM1

Se añadieron (dimetilamino)piridina (DMAP) (5,6 mg, 0,05 mmol, 1 eq) y diclohexilcarbodiimida (DCC) (190 mg, 0,92 mmol, 2 eq) a una solución, enfriada a 0 °C anteriormente, de ácido esteárico (130 mg, 0,46 mmol) y de 3 – O – bencil – sn – glicerol (100 mg, 0,55 mmol, 1,2 eq) en diclorometano anhidro (CH₂Cl₂) (5 ml). La mezcla reactiva se agitó 1 h a 0 °C y después 18 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) para, a continuación, filtrarla en algodón para retirar una parte de la diclohexilurea formada. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 6 / 1) para dar lugar al compuesto **19** (129 mg, 63 %) en forma de sólido blanco.

C₂₈H₄₈O₄ (M = 448,69 g / mol).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 3H, CH₃, J = 6,5 Hz), 1, 25 (b, 28H, 14CH₂), 1,60 (m, 2H, 2h3"), 2,31 (t, 2H, 2H2", J = 7,5 Hz), 2,64 (d, 1H, OH, J = 3,5 Hz), 3, 48 (dd, 1H, H3aA, J_{3aA-3aB} = 9,75 Hz, J_{3aA-2a} = 6 Hz), 3,55 (dd, 1H, H3aB, J_{3aB-2a} = 4,5 Hz), 4,02 (m, 1H, H2a), 4,12 (dd, 1H, H1aA, J_{1aA-2a} ~ 4,8 Hz), 4,19 (dd, 1H, H1aB, J_{1aB-1aA} = 11,5 Hz, J_{1aB-2a} 5 Hz), 4,55 (s, 2H, CH₂Ph), 7,33 (m, 5H, CH_{Ar}).

RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃) δ 14,22 (CH₃), 22,19 (CH₂), 25,00 (CH₂, C300), 29,23, 29,36, 29,46, 29,66, 29,71, 29,76, 29,80 (7 CH₂), 32,02 (CH₂), 34,24 (CH₂, C2"), 65,43 (CH₂, C1a), 68,80 (CH, C2a), 71,00 (CH₂ C3a), 73,58 (CH₂Ph), 127,82 (CH_{Ar}), 127,94 (CH_{Ar}), 128,54 (CH_{Ar}), 137,77 (Cq_{Ar}), 174,01 (Cq, C1").

MS – IS: calculada 448,36; encontrada: 449,5 [M + H]⁺, 466,5 [M + NH₄]⁺, 471,5 [M + Na]⁺.

65

3 – O – bencil – 2 – O – hexadecanoil – 1 – O – octadecanoil – sn – glicerol (compuesto 20, Figura 2b)*SFPIM34*

5 Se añadieron clorhidrato de 1 – etil – 3 – [3 – (dimetilamino) propilcarbodiimida (EDCI) (662 mg, 3,45 mmol, 2,5 eq) y DAMP (34 mg, 0,28 mmol, 0,2 eq) a una solución del compuesto **19** (620 mg, 1,38 mmol) y de ácido palmítico (708 mg, 2,76 mmol, 2 eq) en CH₂Cl₂ anhidro (25 ml). La mezcla reactiva se agitó 18 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y, después, se diluyó con CH₂Cl₂ (100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución de HCl 1 N (40 ml), agua (40 ml) y, después, una solución de NaCl saturada (40 ml) y se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato etílico 25 / 1 y 20 / 1) para dar lugar al compuesto **20** (899 mg, 95 %) en forma de sólido blanco.

C₄₄H₇₈O₅ (M = 687,11 g / mol).

10 RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 3H, CH₃, J = 6,5 Hz), 1,26 (m, 52H, 26CH₂), 1,60 (m, 4H, 2H3', 2H3''), 2,27 (t, 2H, J = 7,5 Hz) y 2,31 (t, 2H, J = 7,5 Hz) (2H2' y 2H2''), 3,59 (d, 2H, 2H3a, J = 5 Hz), 4,19 (dd, 1H, H1aA, J_{1aA-1aB} = 11,75 Hz, J_{1aA-2a} = 6,3 Hz), 4,35 (dd, 1H, H1aB, J_{1aB-2a} = 3,8 Hz), 4,53 (AB, 2H, CH₂Ph, J = 12,2 Hz), 5,24 (quint., 1H, H2a), 7,32 (m, 5H, CH_{Ar}).

15 RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 14,23 (CH₃), 22,82 (CH₂), 25,01 y 25,08 (2CH₂, C3', C3''), 29,22 – 29,83 (CH₂, 8 líneas), 32,06 (CH₂), 34,23 y 34,44 (2CH₂), 62,16 (CH₂, C1a), 68,38 (CH₂, C3a), 70,12 (CH, C2a), 73,42 (CH₂Ph), 127,72 (CH_{Ar}), 127,87 (CH_{Ar}), 128,51 (CH_{Ar}), 137,83 (Cq_{Ar}), 173,16 (Cq, CO), 173,45 (Cq, CO).

20 SM – IS: M calculada: 686,58; encontrada: 687,5 [M + H]⁺, 704,5 [M + NH₄]⁺, 709,5 [M + Na]⁺.

2 – O – hexadecanoil – 1 – O – octadecanoil – sn – glicerol (compuesto 21, Figura 2b)*SFPIM29*

25 Se disolvió el compuesto **20** (250 mg, 0,36 mmol) en una mezcla de CH₂Cl₂ / EtOH (1 / 2,5, 14 ml). Se añadió un exceso de paladio en carbono (PD / C 10 %) y la reacción se agitó 4 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno (balón). La mezcla reactiva se calentó a 30 °C para la mejor disolución del producto esperado y el catalizador se retiró por filtración mediante una membrana millipore. Se aclaró 3 veces con 20 ml de mezcla CH₂Cl₂ / EtOH (1 / 1) calentada con anterioridad a 30 °C. Los disolventes residuales se evaporaron al vacío para dar lugar al compuesto **31** (215 mg, 99 %) esperado en forma de sólido blanco.

C₃₇H₇₂O₅ (M = 596,98 g / mol).

30 RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 6H, 2CH₃), 1,26 (m, 52H, 26CH₂), 1,62 (m, 4H), 1,99 (s muy grande, 1H, OH), 2,32 (t, 2H, J = 7,7 Hz), 2,34 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 3,73 (d, 2H, 2H3a, J = 5 Hz), 4,23 (dd, 1H, H1aA, J_{aA-1aB} = 11,75 Hz, J_{1aA-2a} = 5,75 Hz), 4,35 (dd, 1H, H1aB, J_{1aB-2a} = 4,5 Hz), 5,08 (quint, 1H, H2a, J = 4,5 Hz).

35 RMN ¹³C (62,9 MHz, CDCl₃) δ 14,27 (CH₃), 22,84 (CH₂), 25,04 y 25,09 (2CH₂), 29,25 – 29,85 (CH₂, 8 líneas), 32,08 (CH₂), 34,26 y 34,44 (2CH₂), 61,68, 62,16, 72,25, 173,57 (Cq, CO), 173,93 (Cq, CO).

(S) – 2 – O – hexadecanoiloxi – 1 – O – octadecanoiloxipropil bencil (N, N – diisopropilamino) fosforamidita (compuesto 22, Figura 2b)*SFPIM47*

45 Se secaron por separado 1H – tetrazol sólido (11 mg, 0,151 mmol, 0,6 eq) y el compuesto **21** (150 mg, 0,251 mmol) al vacío en P₂O₅ durante 1 h antes de ser unidas y disueltas en CH₂Cl₂ anhidro (2 ml). Se añadió la solución stock del compuesto **10** (0,84 M, 358 µl, 0,301 mmol, 1,2 eq) y, tras 30 minutos de agitación a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), la mezcla reactiva se diluyó con CH₂Cl₂ (50 ml), se enfrió a 0 °C y la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ a 0 °C (10 ml) y, a continuación, se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó y una purificación rápida por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 6 / 1 con 1 % de Et₃N) permitió obtener el compuesto esperado **22** (100 mg, 48 %) en forma de aceite incoloro.

C₅₀H₉₂NO₆P (M = 834,27 g / mol).

50 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 0,88 (t, 6H, 2CH₃), 1,18 (d, 6H, CH₃ isopropil), 1,19 (d, 6H, CH₃ isopropil), 1,25 (m, 52H, 26 CH₂), 1,60 (m, 4H, 2CH₂), 2,29 (2t, 4H, 2CH₂), 3,56 – 3,9 (2m, 4H, 2CHMe₂, 2H3a), 4,17 (ddd, 1H, H1aB, J = 4,8, 6,4 y 12 Hz), 4,34 (ddd, 1H, H1aA, J = 4, 8 y 12 Hz), 4,65 y 4,66 (2dd, 1H, POCH_APh, J_{A,B} = 12,4 Hz, J_{A,P} = 8,4 Hz), 4,732 y 4,735 (2dd, 1H, POCH_BPh, J_{A,B} = 12,4 Hz, J_{A,P} = 8,4 Hz), 5,19 (m, 1H, H2a), 7,3 – 7,4 (m, 5H, 5CH_{Ar}).

55 ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 148,70, 148,80.

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 – O – (2, 3, 4, 6 – O – metoxiacetil – α – D – manopuranosil) – 2 – O – hexadecanoil – 3 – O – octadecanoil – propil (bencil) fosforil) – D – mioinositol (compuesto 23, Figura 2b)*SFPIM214*

60 Se coevaporaron el compuesto **22** (290 mg, 0,348 mmol, 3 eq) y el compuesto **18** (115 mg, 0,116 mmol) con tolueno anhidro (2 x 10 ml) y, a continuación, se secaron 30 min al vacío de alto grado antes de ser disueltos, en atmósfera de argón, en CH₂Cl₂ anhidro (8 ml). Se añadió 1H – tetrazol sólido (41 mg, 0,58 mmol, 5 eq) a 0 °C y, tras

1 h y media de agitación a temperatura ambiente, la mezcla reactiva se enfrió a -40 °C. Se añadió una solución de ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) (50 %, 120 mg, 0,348 mmol, 3 eq) en el CH₂Cl₂ (8 ml) gota a gota. Tras 2 horas de agitación en las que se permitió al medio reactivo volver a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), la reacción se detuvo con la adición de una solución acuosa con 10 % de Na₂S₂O₃ (50 ml) y la mezcla se extrajo con dietil éter (Et₂O) (100 ml). La fase orgánica se lavó con una solución acuosa con 5 % de NaHCO₃ (3 x 50 ml) y, a continuación, se secó en MgSO₄. El disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (éter de petróleo / acetato etílico 2 / 1 con un gradiente de hasta 1 / 1) para dar una parte de un primer *P*-estereoisómero del compuesto **23** (55 mg) y una parte de mezcla de isómeros (76 mg con aproximadamente un 30 % del primer isómero) (rendimiento total 65 %).

C₉₆H₁₃₉O₂₆P (M = 1740,14 g / mol).

SM – IS *m/z* M calculada: 1738,92; encontrada: 140,5 [M + H]⁺, 1763,5 [M + Na]⁺.

HRMS calculada para [M + H]⁺: C₉₆H₁₄₀O₂₆P: 1739,9370; encontrada: 1739,9386.

3, 4, 5, 6 – 4 – O – bencil – 1 – O – α – D – manopiranosil – 2 – O – [((S) – 2 – O – hexadecanoil – 3 – O – octadecanoil – propil) (bencil) fosforil] – D – mioinositol (compuesto 24, Figura 2b)

SFPIM218

El compuesto **23** (129 mg, 0,074 mmol) se disolvió en una mezcla de CHCl₃ / MeOH (4 / 1, 1 ml). La mezcla reactiva se enfrió a 0 °C y se añadió *t* – butilamina (160 µl). Tras 10 min de agitación a 0 °C y 1 h en la que el medio reactivo alcanzó la temperatura ambiente, los disolventes se evaporaron al vacío de alto grado a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y el residuo se purificó por dos cromatografías en columna en gel de sílice sucesivas (CH₂Cl₂ / MeOH 20 / 1) con una cantidad de sílice para dar lugar al compuesto esperado **24** (67 mg, 63 %) en forma de sólido blanco homogéneo (RMN: presencia de los dos P* - estereoisómeros).

C₈₄H₁₂₃O₁₈P (M = 1415,85 g / mol).

HRMS calculada para [M + H]⁺: C₈₄H₁₂₄O₁₈P: 1451,8525; encontrada: 1451,8521.

1 – O – α – D – manopiranosil – 2 – O – [((S) – 2 – O – hexadecanoil – 3 – O – octadecanoilpropil) fosforil] – D – mioinositol (compuesto 25, Figura 2b)

SFPIM219

El compuesto **24** (63 mg, 0,043 mmol) se disolvió en una mezcla de CH₂Cl₂ / EtOH (0,6 / 1, 16 ml). Se añadió un exceso de paladio en carbono (Pd / C 10 %) y la reacción se agitó 18 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno (balón). El catalizador se retiró por filtración mediante una membrana millipore y se aclaró 3 veces con una mezcla CH₂Cl₂ / EtOH (1 / 1) (20 ml). Los disolventes residuales se evaporaron al vacío para dar lugar al compuesto **25** (43 mg, 100 %) en forma de sólido blanco muy homogéneo (RMN).

C₄₉H₉₃O₁₈P (M = 1001,25 g / mol).

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD / CDCl₃ 0,7 / 0,3 ml) δ 0,88 (t, 6H, 2CH₃), 1,26 (m, 52H, 26CH₂), 1,60 (m, 4H), 2,32 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 2,37 (t, 2H, J = 7,6 Hz), 3,22 (t, 1H, H5, J₄₋₅ = J₅₋₆ = 8,8 Hz), 3,52 (br d, 1H, H3), 3,55 (t, 1H, H4', J_{4'-5'} = 10,0 Hz), 3,56 (t, 1H, H4, J₄₋₃ = 8,8 Hz), 3,66 (m, 1H, H1), 3,67 – 3,72 (m, 2H, H6, H6'A), 3,81 (dd, 1H, H3', J_{3'-4'} = 9,4, J_{3'-2'} = 3,2 Hz), 3,83 (m, 1H, H5'), 3,89 (dd, 1H, H6'B, J_{6'B-5'} = 2, J_{6'B-6'A} = 11,6 Hz), 3,97 (dd, 1H, H2', J_{2'-1'} = 1,6 Hz), 4,16 – 4,23 (m, 3H, H3aA y 2H1a), 4,42 (dd, 1H, H3aB, J_{3aB-2a} = 3,2, J_{3aB-3aA} = 12 Hz), 4,75 (ddd, 1H, H2, J₂₋₃ ~ 10, J₂₋₁ = 2,2 Hz), 5,16 (d, 1H, H1', J = 1,2 Hz), 5,26 (m, 1H, H2a).

RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD / CDCl₃ 0,7 / 0,3 ml) δ 14,40 (CH₃) 23,43, 25,67, 25,70, 29,90, 30,15, 30,16, 30,33, 30,36, 30,44, 30,46, 30,48, 32,74, 34,75, 34,88, 62,83 (C6'), 63,23 (C3a), 65,87 (d, C1a), 68,77 (C4'), 70,89 (d, C2a), 71,48 (C3 y C2'), 73,58 (C4), 73,96 (C6), 74,70 (C5'), 75,79 (C5), 76,37 (d, C1), 81,37 (d, C1), 102,95 (C1'), 174,43 (CO), 174,81 (CO).

³¹P NMR (162 MHz, CD₃OD / CDCl₃ 0,7 / 0,3 ml) δ -1,71 ppm.

HRMS calculada para [M + H]⁺: C₄₉H₉₄O₁₈P: 1001,6178; encontrada: 1001,6172.

2) Estimulación de los macrófagos de ratones salvajes por LPS en presencia de isómero PIM₁ isoPIM₁-C₁₆C₁₈ (SFPIM219)

Se probó un nuevo isómero de PIM, el isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) por su actividad inhibidora en los macrófagos estimulados por LPS (Figura 12).

Los macrófagos derivados de la médula espinal de ratones salvajes se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos con 10⁵ células por pocillo que, a continuación, se estimularon con LPS (100 ng / ml, *Escherichia. Coli*, serotipo O111: B4, SIGMA), con isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) (1 – 10 µg / ml) o un control DMSO. La preparación de SFPIM219 liofilizada utilizada se solubilizó en DMSO y se adicionó a los cultivos a una concentración final máxima no citotóxica de 1 %.

Tras una estimulación de 24 horas, los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y analizados en cuanto a su

contenido en citoquinas TNF – α o IL – 12p40 mediante ELISA (R & D Douse, Minneapolis, MO). Los resultados corresponden a la media aproximada de SD de $n = 2$ ratones por genotipo.

El isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) inhibe fuertemente la secreción de TNF (Figura 12). El test de citotoxicidad MTT llevado a cabo en los mismos macrófagos incubados en presencia de isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) permitió demostrar la ausencia de citotoxicidad en los macrófagos (Figura 13).

La secreción de IL – 12p40 en respuesta al LPS ya se había inhibido fuertemente a concentraciones de 1 μ g / ml de isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) (Figura 14).

EJEMPLOS 3 y 4:

1) Ejemplo 3: Síntesis del compuesto 36 de la Figura 2c o PIM – 2 – mimNCOCF₃

SFPIM342 – t2

Ejemplo 4: Síntesis del compuesto 37 de la Figura 2c o PIM – 2mimNH

SFPIM324 – t8

3 – O – bencil – 1, 2 : 5, 6 – di – O – isopropilideno – α – D – glucofuranosa (compuesto 26, Figura 2c)

SFPIM311

A una solución de 1, 2 : 5, 6 – di – O – isopropilideno – α – D – glucofuranosa comercial (13,5 g; 52 mmol) en THF anhidro (100 ml) se le añadió, a 0 °C y en atmósfera de nitrógeno, hidruro de sodio (en forma de una dispersión al 60 % en aceite mineral) (2,5 g; 62 mmol; 1,2 eq). La mezcla se agitó durante 20 min a 0 °C. Tras la adición, a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), de yoduro de tetrabutilamonio (149 mg; 0,4 mmol; 0,008 eq), el bromuro de bencilo (9 ml; 76 mmol; 1,3 eq) se añadió gota a gota. El medio se calentó por reflujo durante 2 horas y, a continuación, se añadió metanol (10 ml) lentamente. La mezcla se diluyó con diclorometano (100 ml) y agua (40 ml). La fase acuosa se extrajo 3 veces en diclorometano (50 ml). Las fases orgánicas se unieron, se secaron y concentraron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (ciclohexano / Et₂O 4 / 1 + 0,4 % de Et₃N) para dar lugar al compuesto **26** en forma de aceite amarillo.

C₁₉H₂₆O₆ (M = 350,42 g / mol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 1,31 (s, 3H, CH₃), 1,37 (s, 3H, CH₃), 1,43 (s, 3H, CH₃), 1,49 (s, 3H, CH₃), 4,00 (d, 1H, H6A, J_{6A-5} = 5,6, J_{6A-6B} = 8,4 Hz), 4,02 (d, 1H, H3, J₄₋₃ = 3,0 Hz), 4,11 (d, 1H, H6B, J_{6B-5} = 6,0 Hz), 4,15 (d, 1H, H4, J₄₋₅ = 7,6 Hz), 4,37 (m, 1H, H5), 4,58 (d, 1H, H2, J₂₋₁ = 3,6 Hz), 4,66 (AB, 2H, CH₂Ph), 5,90 (d, 1H, H1), 7,27,25 (m, 5H, CHar).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 25,57 (CH₃), 26,37 (CH₃), 26,92 (CH₃), 26,97 (CH₃), 67,53 (C6'), 72,50 (CH₂Ph), 72,65 (C5'), 81,45 (C4'), 81,83 (C3'), 82,79 (C2'), 105,42 (C1'), 109,10 (Cq), 111,90 (Cq), 127,77, 127,96, 128,52, 137,77.

SM – IS m/z M calculada: 350,17; encontrada: 351,0 [M + H]⁺, 373,0 [M + Na]⁺.

3 – O – bencil – 1, 2 – O – isopropilideno – α – D – xilo – pentodialdo – 1, 4 – furanosa (compuesto 27, Figura 2c)

SFPIM268A

El compuesto **27** se sintetizó según [25]. Se agitó una solución del compuesto **26** (1,03 g; 2,9 mmol) en una mezcla de ácido acético y agua (21 / 9) a 45 °C durante 2 horas. La mezcla reactiva se enfrió a continuación a 0 °C y se añadió una solución de periodato de sodio (692 mg; 3,23 mmol; 1,1 eq) en agua (7 ml). El medio se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) durante 18 horas. Se añadió diclorometano (15 ml) y la fase acuosa se extrajo 3 veces en el diclorometano (15 ml). Las fases orgánicas se unieron y se lavaron 2 veces con agua (20 ml), se secaron en MgSO₄ y se concentraron al vacío. El residuo se coevaporó 2 veces con tolueno. El aldehído **27** se utilizó sin purificar en la etapa siguiente.

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 1,33 (s, 3H, CH₃), 1,47 (s, 3H, CH₃), 4,33 (d, 1H, H3, J₃₋₁ = 3,7 Hz), 4,54 (AB, 2H, CH₂Ph), 4,61 (dd, 1H, H4, J₄₋₅ = 1,5, J₄₋₃ = 3,7 Hz), 4,64 (d, 1H, H2, J₂₋₁ = 3,7 Hz), 6,12 (d, 1H, H1), 7,1 – 7,4 (m, 5H, CHar), 9,67 (d, 1H, H5, J₅₋₄ = 1,8 Hz).

3 – O – bencil – xilo – pentodialdo – 1, 4 – furanosa (compuesto 28, Figura 2c)

SFPIM268

Se añadió resina Dowex 50WX8 a una solución del compuesto **27** (2,9 mmol) en una mezcla de dioxano / agua (10 / 4 ml). El medio se agitó ligeramente 18 h a 75 °C. La resina se filtró en vidrio sinterizado y se aclaró con una mezcla de dioxano / agua. Los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se coevaporó varias veces

con tolueno hasta que se obtuvo el producto **28** con forma de espuma naranja – roja. El compuesto se utilizó sin purificar en la etapa siguiente.

N – bencil – 3 – O – bencil – 1, 5 – dideoxi – 1, 5 – imino – xilitol (compuesto 29, Figura 2c)

5

SFPIM272

A una solución del compuesto **28** (700 mg, 2,9 mmol) secada con anterioridad en P₂O₅ durante una noche en metanol anhidro (50 ml), se añadió, en atmósfera de azote, el cianoborohidruro de sodio (554 mg, 2,67 mmol, 3 eq). La mezcla se agitó en presencia de tamices moleculares 3Å durante 10 minutos. El medio se enfrió a -78 °C y, a continuación, se añadieron ácido acético glacial (332 µl, 5,8 mmol, 2 eq) y bencilamina (292 µL, 2,67 mmol, 0,9 eq). Tras volver a la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), el medio se agitó 18 h y se filtró sobre Célite. El Célite se aclaró con acetato de etilo (3 x 10 ml). Los disolventes se evaporaron a presión reducida. El residuo se recogió en el acetato de etilo (60 ml) y se lavó con una solución saturada de NaHCO₃ (20 ml) y 2 veces con agua (20 ml). La fase orgánica se secó y se concentró al vacío para dar lugar al compuesto **29** en forma de sólido blanco homogéneo. El compuesto puede eventualmente volverse a cristalizarse en acetato de etilo.

10

15

C₁₉H₂₃O₃N (M = 313,40 g / mol).

RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 2,24 (dd, 2H, H1aA, H5a'A, J_{1aA-2a} = J_{5aA-4a} = 8, J_{1aA-1aB} = J_{5aA-5aB} = 11 Hz), 2,45 (m, 2H, OH), 2,85 (dd, 2H, H1aB, H5aB, J_{1aB-2a} = J_{5aB-4a} = 3,5 Hz), 2,25 (app t, 1H, H3a, J_{2a-3a} = J_{3a-4a} = 7 Hz), 3,55 (s, 2H, CH₂Ph), 3,77 (ddd, 2H, H4a, H2a), 4,76 (s, 2H, CH₂Ph), 7,20 – 7,40 (m, 10H, 2 x 5 Char).

20

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 57,12 (C1a, C5a), 62,20 (CH₂Ph Nbn), 69,91 (C2a, C4a), 73,98 (CH₂Ph Obn), 84,30 (C3a, señal de intensidad débil), 127,39 – 129,14 (9 picos, Char), 137,86 (Cqar), 138,68 (Cqar).

SM – IS *m/z* M calculada: 313,17; encontrada 314,0 [M + H]⁺, 336,0 [M + Na]⁺.

3 – O – bencil – 1, 5 – dideoxi – 1, 5 – imino – xilitol (compuesto 30, Figura 2c)

25

SFPIM314

El compuesto **29** (300 mg; 0,957 mmol) se disolvió en EtOH (10 ml). Se añadió un exceso de hidróxido de paladio en carbono 20 % y el medio reactivo se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno durante 20 horas. Se volvió a añadir hidróxido de paladio en carbono 20 % y la reacción continuó 18 h suplementarias. El medio reactivo se filtró en membranas millipore y el catalizador se aclaró con EtOH (2 x 10 ml). El filtrado se evaporó a presión reducida para dar lugar al compuesto **30** (172 mg, se observa aproximadamente un 35 % de producto O – debencilado).

30

35

C₁₂H₁₇NO₃ (M = 223,27 g / mol).

RNM ¹H (400 MHz, CD₃OD): (contiene un 35 % de compuesto O – debencilado referencia*) δ *2,38 (dd, ~ 0,4H, *H1aA, *H5aA, J_{1aA-2a} = J_{5aA-4a} = 10,1, J_{1aA-1aB} = J_{5aA-5aB} = 12,6 Hz), 2,45 (dd, ~1,7H, H1aA, H5aA, J_{1aA-2a} = J_{5aA-4a} = 9,7, J_{1aA-1aB} = J_{5aA-5aB} = 12,8 Hz), 2,85 (dd, 2H, H1aB, H5aB, J_{1aB-2a} = J_{5aB-4a} = 4,3 Hz, + compuesto *), 3,21 (app t, 1H, *H3a, H3a, J_{2a-3a} = J_{4a-3a} = 8,3 Hz), *3,39 – 3,41 (2dd, ~ 0,4H, *H4a, *H2a), 3,55 – 3,57 (2dd, ~1,7H4a, H2a), 4,85 (s, CH₂Ph), 7,20 – 7,40 (M, 5H, CHar).

40

RMN ¹³C (101 MHz, CD₃OD): δ *51,39 (*C1a, *C5a), 51,47 (C1a, C5a), 71,92 (C2a, C4a), *72,45 (*C2a, *C4a), 75,55 (CH₂Ph Obn), *79,94 (*C3a), 87,12 (C3a), 127,93 – 128,98, 129,17 (CHar), 140,36 (Cqar).

SM – IS *m/z* M calculada: 223,12; encontrada 224,5 [M + H]⁺, 246,5 [M + Na]⁺.

N – trifluoroacetamido – 3 – O – bencil – 1, 5 – dideoxi – 1, 5 – imino – xilitol (compuesto 31, Figura 2c)

45

SFPIM315

A una solución del compuesto **30** (172 mg; 0,77 mmol) en diclorometano anhidro (5 ml) se añadieron piridina (100 µl; 1,31 mmol; 1,7 eq) y anhídrido trifluoroacético (160 µl, 1,16 mmol; 1,5 eq). El medio reactivo se agitó durante 18 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y, a continuación, se diluyó en diclorometano. La fase orgánica se lavó dos veces con una solución de HCl 1 N, una vez con H₂O, se secó en MgSO₄ y se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo / acetato de etilo 3 / 1,5) para dar el producto **31** (110 mg; 45 %).

50

55

C₁₄H₁₅NO₄F₃ (M = 318,28 g / mol).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 3,50 (d, 1H, H1A o H5A, J = 13,4Hz), 3,61 (m, 1H, H3), 3,66 - 3,78 (m, 3H, H1 o H5, OH), 3,82 (m, 2H, H2 o H4, OH), 3,96 (m, 1 H, H4 o H2), 4,10 (dd, H1B o H5B, J = 4,0, J = 13,6Hz), 4,66 (s, 2H, CH₂Ph), 7,25 - 7,38 (m, 5H, Char).

60

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 45,77 (C5 o C1), 48,25 y 48,28 (C1 o C5 rotámeros), 67,80, (C2 o C4), 67,97 (C4 o C2), 73,04 (CH₂Ph), 76,52 (C3), 116,51 (q, CF₃, J_{C-F} = 289 Hz), 127,78, 128,23, 128,72 (3 picos CHar), 137,71 (Car), 157,72 (q, COCF₃, J_{C-F} = 36Hz).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): δ – 67,72.

N – trifluoroacetamido – 3 – O – bencil – 2, 4 – bis – O – (2, 3, 4, 5 – 4 – O – metoxiacetil – α – D – manopiranosil) – 1, 5 – dideoxi – 1, 5 – imino – xilitol (compuesto 32, Figura 2c)

65

SFPIM318

Una solución del compuesto **17** (500 mg; 0,813 mmol; 2,5 eq) en diclorometano (2 ml) se canuló en atmósfera de argón en una solución del compuesto **31** (105 mg; 0,33 mmol) en diclorometano (5 ml) con tamices moleculares 4Å. La mezcla reactiva se agitó durante 30 min a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y se añadió trimetilsilil trifluorometanosulfonato (30 µl, 0,163 mmol; 20 % respecto al imidato). El medio reactivo se agitó durante 2 h a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) y, a continuación, se detuvo la reacción por la adición de trietilamina (0,8 ml) y se filtró sobre Célite. Se aclaró el Célite con diclorometano, se evaporó el disolvente en seco y el producto bruto se purificó por cromatografía en gel de sílice (diclorometano / acetona 6 / 1) para dar lugar al producto **32** (188 mg; 47 %) en forma de jarabe incoloro.

$C_{50}H_{68}NO_{30}F_3$ (M = 1220,08 g / mol).

Nota: en RMN se observan rotámeros debidos a la presencia de NCOCF₃.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2,92 (dd, 0,5H, H1aA o H5aA, J = 9,9, 12,9Hz), 3,06 (dd, 0,5H, H1aA o H5aA, J = 10,1, 12,9Hz), 3,18 (dd, 0,5H, H1aA o H5aA, J = 9,8, 13,9Hz), 3,26 (dd, 0,5H, H1aA o H5aA, J = 10,3, 13,9Hz), 3,36, 3,38, 3,38, 3,40, 3,41, 3,44, 3,45, 3,48 (8 CH₃), 3,64 – 4,22 (m, 25H, 8CH₂ MAc, 2H5, 1H1aB o 1H5aB, 3H6, H3a, H2a, H1a), 4,40 (m, 1H, H6B), 4,53 (m, 1H, H1aB o H5aB), 4,80 – 4,90 (m, 2H, CH₂Ph), 4,94 (s, 0,5H, H1), 5,05 (s, 0,5H, H1), 5,14 (s, 0,5H, H1), 5,17 (s, 0,5H, H1), 5,24 – 5,45 (m, 6H, 2H2, 2H3, 2H4), 7,15 – 7,40 (m, 5H, CHar).
RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 43,44, 45,52, 45,56, 45,85, 47,89, 47,92 (6 picos para C1a y C5a), 59,32, 59,37, 59,39, 59,41, 59,44, 59,45, 59,53 (7 CH₃), 61,75, 62,23, 62,58 (3 picos para los H6), 65,43, 65,56, 65,97, 66,07, 68,49, 68,62, 68,68, 68,94, 69,26, 69,49 (10 picos para C2, C3, C4, C5), 69,14, 69,22, 69,26, 69,29, 69,39, 69,43, 69,46 (7 picos para los CH₂ MAc), 71,17, 72,20, 76,56, 77,08, 81,88, 82,00 (6 picos para C1a, C2a, C3a), 75,48, 75,57 (2 picos para CH₂Ph), 94,41, 94,75 (2 picos para C1), 98,82, 99,07 (2 picos para C1), 116,14. (q, CF₃, J_{C-F} = 289Hz), 116,21 (q, CF₃, J_{C-F} = 289Hz), 125,32 – 129,06 (9 picos para CHar), 137,09, 169,12 – 170,18 (14 picos para COMAc).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): δ -68,79, -68,55.

N – trifluoroacetamido – 2, 4 – bis – O – (2, 3, 4, 5, - 4 – O – metoxiacetil – α – D – manopiranosil) – 1, 5 – dideoxi – 1, 5 – imino – xilitol (compuesto 33, Figura 2c)

SFPIM319

El compuesto **32** (188 mg; 0,154 mmol) se disolvió en una mezcla de EtOH / CH₂Cl₂ (6 / 6 ml). Se añadió un exceso de paladio en carbono 10 % y el medio reactivo se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno durante 3 horas. El medio reactivo se filtró mediante una membrana millipore y el catalizador se aclaró con una mezcla de EtOH / CH₂Cl₂ (1 / 1). El filtrado se evaporó a presión reducida para dar lugar al compuesto **33** (168 mg; 97 %).

$C_{43}H_{62}NO_{30}F_3$ (M = 1129,96 g / mol).

Nota: en RMN se observaron rotámeros debidos a la presencia de NCOCF₃.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 2,74 (app t, 0,5H, H1aA o H5aA, J = 12,1Hz), 2,84 (app t, 0,5 H, H1aA o H5aA, J = 11,6Hz), 3,12 (m, 1H, H1aA o H5aA), 3,41, 3,42, 3,44, 3,45, 3,46, 3,47, 3,48, 3,49 (8 CH₃), 3,59 (m, 3H, H4a, H2a, OH), 3,74 (m, 1 H, H3a), 3,88 – 4,49 (m, 23H, 8CH₂ MAc, 2H5, 1H1aB o 1H5aB, 4H6), 4,64 (m, 1H, H1aB o H5aB), 4,94 (s, 0,5H, H1), 5,01 (s, 0,5H, H1), 5,21 (s, 0,5H, H1), 5,25 (s, 0,5H, H1), 5,26 – 5,48 (m, 6H, 2H2, 2H3, 2H4).

RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 44,26, 45,61, 46,01, 47,69 (4 picos para C1a y C5a), 59,22 – 59,43 (7 CH₃), 62,21, 62,24, 62,58 (3 picos para los H6), 65,85, 65,90, 65,98, 66,04, 68,57, 68,62, 69,07, 69,13, 69,53 (9 picos para C2, C3, C4, C5), 69,19, 69,22, 69,33, 69,42, 69,46 (4 CH₂ MAc), 74,05, 74,78, 75,64, 75,84, 76,54, 77,25 (6 picos para C1a, C2a, C3a), 95,75, 98,99 (2 C), 116,10 (q, CF₃, J_{C-F} = 289Hz), 116,18 (q, CF₃, J_{C-F} = 289Hz), 155,58 (q, C=O, J_{C-F} = 36Hz), 155,62 (q, C=O, J_{C-F} = 36Hz), 169,16 – 170,18 (13 picos COMAc).

RMN ¹⁹F (376 MHz, CDCl₃): δ -68,91, -68,72.

N – trifluoroacetamido – 2, 4 – bis – O – (2, 3, 4, 5 – 4 – O – metoxiacetil – α – D – manopiranosil) – (3 – O – ((S) – 2 – O – hexadecanoiloxi – 3 – O – octadecanoiloxi – propil) (bencil) fosforil) – 1, 5 – dideoxi – 1, 5 – imino – D – xilitol (compuesto 34, Figura 2c)

SFPIM322

Se añadió una solución 0,26 M en el CH₂Cl₂ anhidro del compuesto **22** (861 µl; 0,223 mmol; 1,5 eq) a una solución del compuesto **33** (168 mg; 0,149 mmol) en el CH₂Cl₂ anhidro (8 ml). Se añadió un tamiz 3Å y el medio reactivo se agitó durante 30 min a temperatura ambiente en atmósfera de argón. Se añadió una solución comercial de tetrazol (~ 0,45 M en acetonitrilo), secada con anterioridad y a 0 °C (1,65 ml, 0,743 mmol, 5 eq) y la reacción continuó agitándose a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla reactiva se enfrió a – 40 °C y se añadió una solución de ácido *m* – cloro – perbenzoico (*m* – CPBA) (50 %, 154 mg, 0,447 mmol, 3 eq) gota a gota en el CH₂Cl₂ (2 ml). Tras 2 h de agitación en la que el medio reactivo alcanzó la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), la reacción se detuvo por la adición de una solución acuosa al 50 % de Na₂S₂O₃ (20 ml) y la mezcla se extrajo con dietil éter (Et₂O) (80 ml). La fase orgánica se lavó 4 veces con una solución acuosa al 50 % de Na₂S₂O₃ (3 x 20 ml), 1 vez con una solución saturada de NaHCO₃, 1 vez con H₂O y, posteriormente, se secó en MgSO₄. El disolvente se

evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (Tolueno / acetona 4 / 1) para dar lugar al compuesto **34** (104 mg; 37 %) en forma de jarabe incoloro.

$C_{87}H_{139}NO_{37}F_3$ (M = 1879,03 g / mol).

Nota: los espectros son difícilmente interpretables. De hecho, se observan numerosos picos debido a los rotámeros relacionados con la presencia de $NCOCF_3$, los diastereoisómeros relacionados con la presencia de fosfato bencilado y de la no equivalencia de los azúcares. También se pueden observar 4 picos para un único carbono anomérico. Cabe destacar igualmente que hay 4 picos en RMN del Flúor.

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$): δ 94,47, 94,50, 94,91, 95,00 (1C1), 98,69, 98,76, 99,18 (2C) (1C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, $CDCl_3$): δ - 0,92

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ - 68,68, - 68,67, - 68,47, - 68,44.

SM - IS m/z M calculada: 1877,87; encontrada 1901,0 $[M + Na]^+$.

N - trifluoroacetamido - 2, 4 - bis - O - (2, 3, 4, 5 - 4 - O - metoxiacetil - α - D - manopiranosil) - (3 - O - ((S) - 2 - O - hexadecanoiloxi - 3 - O - octadecanoiloxi - propil) fosforil) - 1, 5 - dideoxi - 1, 5 - imino - D - xilitol (compuesto 35, Figura 2c)

SFPIM323

El compuesto **34** (90 mg, 0,048 mmol) se disolvió en una mezcla de EtOH / CH_2Cl_2 (6 / 4 ml). Se añadió un exceso de paladio en carbono 10 % y el medio reactivo se agitó a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C) en atmósfera de hidrógeno durante 3 h. El medio reactivo se filtró mediante una membrana millipore y el catalizador se aclaró con una mezcla de EtOH / CH_2Cl_2 (1 / 1). El filtrado se evaporó a presión reducida para dar lugar al compuesto **35** (82 mg, 95 %).

$C_{80}H_{133}NO_{37}F_3P$ (M = 1788,91 g / mol).

Nota: Los espectros son difícilmente interpretables. De hecho, se observan numerosos picos debido a los rotámeros relacionados con la presencia de $NCOCF_3$ de la no equivalencia de los azúcares. Así pues, los diaestereoisómeros han desaparecido, el fosfato ha quedado desprotegido. Cabe destacar que hay 2 picos para un único carbono anomérico. Se observan igualmente 2 picos en RMN del Flúor.

RMN ^{13}C (101 MHz, $CDCl_3$): δ 94,54, 94,98 (1C1), 98,65, 99,17 (1C1).

RMN ^{31}P (162 MHz, $CDCl_3$): δ - 1,36, - 1,30.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$): δ - 68,66, - 68,45.

Ejemplo 3: N - trifluoroacetamido - 2, 4 - bis - O - (α - D - manopiranosil) - (3 - O - ((S) - 2 - O - hexadecanoiloxi - 3 - O - octadecanoiloxi - propil) fosforil) - 1, 5 - dideoxi - 1, 5 - imino - D - xilitol (compuesto 36, Figura 2c)

SFPIM324 - t2

y

Ejemplo 4: 2, 4 - bis - O - (α - D - manopiranosil) - (3 - O - ((S) - 2 - O - hexadecanoiloxi - 3 - O - octadecanoiloxi - propil) fosforil) - 1, 5 - dideoxi - 1, 5 - imino - D - xilitol (compuesto 37, Figura 2c)

SFPIM327 - t8

El compuesto **35** (80 mg, 0,045 mmol) se disolvió en una mezcla de $CHCl_3$ / MeOH (0,2 / 0,8 ml). La mezcla reactiva se enfrió a 0 °C y se añadió butilamina (164 μ l). Tras 10 minutos de agitación a 0 °C y 1 h y media suplementaria en la que el medio reactivo recuperó la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), los disolventes se evaporaron al vacío de alto grado a temperatura ambiente y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice ($CHCl_3$ / MeOH / H_2O 70 / 40 / 1) para dar lugar en los primeros tubos al compuesto **36** (16 mg, 32 %) y en los tubos siguientes al compuesto **37** (21 mg, 48 %) en forma de sólidos blancos.

Compuesto 36

$C_{56}H_{101}NO_{21}PF_3$ (M = 1212,39 g / mol).

Nota: se siguen observando rotámeros debidos a la presencia de $NCOCF_3$, sobre todo a nivel de los H anoméricos.

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD 0,4 / 0,2 mL): δ 0,89 (t, 6H, 2CH₃, J = 6,7Hz), 1,27 (m, 52H), 1,61 (m, 4H), 2,32 (t, 2H, J = 7,6Hz), 2,34 (t, 2H, J = 7,6Hz), 3,20 - 4,22 (numerosos macizos), 4,91 (s, 0,5H, H1), 5,03 (s, 0,5H, H1); 5,12 (s, 0,5H, H1), 5,17 (s, 0,5H, H1), 5,25 (m; 1H, H2a').

RMN ^{31}P (162 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD 0,4 / 0,2 mL): δ 0,161.

RMN ^{19}F (376 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD 0,4 / 0,2 mL): δ - 68,34, - 67,83.

SM - IS (-) m/z M calculada : 1211,66; encontrada 1210,5 $[M - H]^-$.

Compuesto 37

$C_{54}H_{102}NO_{20}P$ (M = 1116,38 g / mol).

Nota: ya no se observan los rotámeros a nivel de los H anoméricos.

RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$ / CD_3OD / D_2O difícilmente soluble): δ 0,89 (t, 6H, 2CH₃, J = 6,8Hz), 1,27 (m, 52H), 1,60 (m, 4H), 2,31 (t, 2H, J = 7,3Hz), 2,34 (t, 2H, J = 7,3Hz), 3,00 - 4,5 (numerosos macizos), 4,93 (s, 1H, H1), 5,08 (s, 1H, H1), 5,23 (m, 1H, H2a').

RMN ^{31}P (162 MHz, CDO_3 / CD_3OD / D_2O difícilmente soluble) : δ 0,670

SM – IS (-) m/z M calculada : 1115,67; encontrada 1116,0 [M + Na]⁺.

2) Estimulación de los macrófagos de ratones salvajes por LPS en presencia de los compuestos 36 y 37

5 Los compuestos **36** de la Figura 2c o PIM – 2 – mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) y **37** de la Figura 2c o PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8) han sido probados por su actividad inhibidora en los macrófagos estimulados por LPS (figuras 15 a 17).

10 Los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones salvajes se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos con 10⁵ células por pocillo y, a continuación, fueron estimulados con LPS (100 ng / ml, *Escherichia. Coli*, serotipo O111: B4, SIGMA) con el PIM₁ (SFPIM145), el isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) o los compuestos PIM – 2 – mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) o PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8) (valorados en 1, 3, 10, 30 µg / ml) o de controles DMSO. Las preparaciones de SFPIM145, SFPIM219, SFPIM324 – t2 y SFPIM324 – t8 liofilizadas empleadas son solubilizadas en DMSO y adicionadas a los cultivos a una concentración final máxima no citotóxica del 1 %.

15 Tras 24 horas de estimulación, los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y analizados por su contenido en citoquinas TNF – α o IL – 12p40 mediante ELISA (R & D Duoset, Minneapolis, MO). Los resultados corresponden a la media aproximada de SD de n = 2 ratones por genotipo.

20 Los compuestos PIM – 2 – mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) e isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219) inhiben fuertemente la secreción de TNF, mientras que el PIM₁ (SFPIM145) y PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8) la inhiben menos (Figura 15). El test de viabilidad de células en MTT realizado en los mismos macrófagos indica cierta toxicidad con la concentración más alta, sobre todo en presencia de PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8) (Figura 16). La secreción de IL – 12p40 en respuesta al LPS queda prácticamente eliminada en concentraciones de 10 µg / ml de PIM – 2 – mimNCOCF₃ (SFPIM324 – t2) y de isoPIM₁C₁₆C₁₈ (SFPIM219), mientras que PIM₁ (SFPIM145) y PIM – 2 – mimNH (SFPIM324 – t8) inhiben parcialmente a esta concentración (Figura 17).

30

35

40

45

50

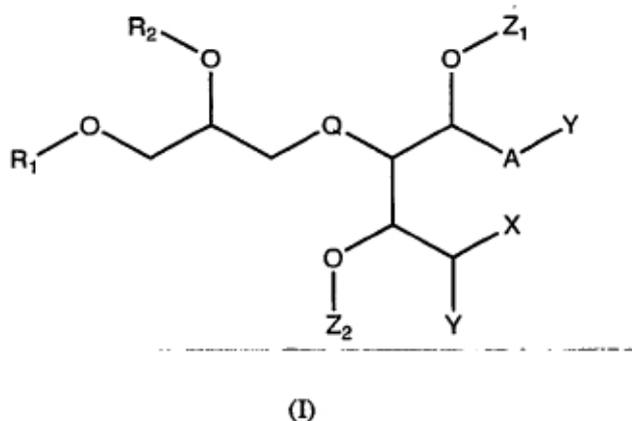
55

60

65

REIVINDICACIONES

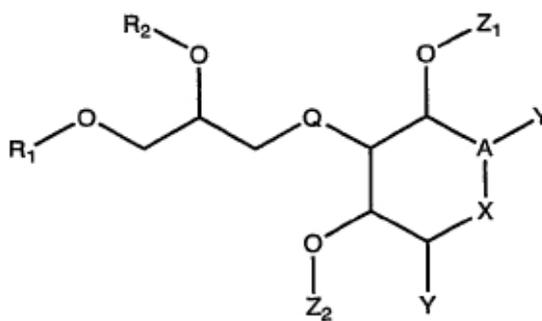
1. Compuesto de la fórmula general (I):



en la que:

- R₁ y R₂ representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno, un radical alquilo C₁ – C₂₀, un radical acilo C₁ – C₂₀, siendo entendido siempre y cuando uno de los sustituyentes R₁ o R₂ sea un átomo de hidrógeno, el otro sustituyente sea diferente al de hidrógeno;
- Z₁ y Z₂ representan, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa, galactosa siendo entendido siempre y cuando uno de los sustituyentes Z₁ o Z₂ sea un átomo de hidrógeno, el otro sustituyente sea diferente al de hidrógeno;
- Q representa a – OP (O)₂O⁻, - OCO₂⁻, NHCO₂⁻, NHCONH⁻;
- Y representa un átomo de hidrógeno, un radical hidroxilo, un radical alcoxi en C₁ – C₆ – (CH₂)_n – OH donde n es un número entero igual a 1, 2 o 3, siendo entendido siempre y cuando Y sea un radical hidroxilo; y Z₁ y Z₂ no representen a los dos grupos de un átomo de hidrógeno;
- A representa – CH₂ –;
- X representa un átomo de hidrógeno;
- o A y X forman un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones en el que
 - A representa un – CH –,
 - X representa un – CH₂ –, – CH (OH) –, un átomo de oxígeno, un –NR₃ – en el que R₃ es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C₁ – C₆ o un radical acilo en C₁ – C₂₀, siendo entendido siempre y cuando
 - A y X formen un enlace para conducir a un ciclo de 6 eslabones,
 - X = – CH (OH) –,
 - Y = – OH, y
 - Z₁ y Z₂ representen, independientemente el uno del otro, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa y galactosa el ciclo de 6 miembros tenga una configuración *mioinositol* con Z₁ o Z₂ en posición 1 y representen, al menos un azúcar, sabiendo que “alquilo” se refiere a un radical carbonado lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, eventualmente sustituido, que comprende 1 a 20 átomos de carbono, sabiendo que “acilo” se refiere a un radical – COR’ en el que R’ es un radical alquilo tal y como se ha definido anteriormente,
 - sabiendo que “alcoxi” se refiere a un radical – OR’ en el que R’ es un radical alquilo tal y como se ha definido anteriormente;
 - o una de sus sales farmacéuticamente aceptables;
 - sabiendo que “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales preparadas con ácidos o bases no tóxicas.

2. Compuesto según la reivindicación 1 en el que A y X forman un enlace para conducir un ciclo de 6 eslabones, fórmula (Ia)



(Ia)

en la que:

- R₁ y R₂, Z₁ y Z₂ Q e Y son aquellos definidos anteriormente a la reivindicación 1;
- A representa — CH—;
- X representa un — CH₂—, — CH (OH) —, un átomo de oxígeno, un —NR₃— en el que R₃ es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C₁ — C₆ o un radical acilo en C₁ — C₂₀,

siendo entendido siempre y cuando

- X = — CH (OH) —,
- Y = — OH, y
- Z₁ y Z₂ representen, independientemente el uno del otro, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa y galactosa el ciclo de 6 miembros tenga una configuración *mioinositol* con Z₁ o Z₂ en posición 1 y representen, al menos un azúcar o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

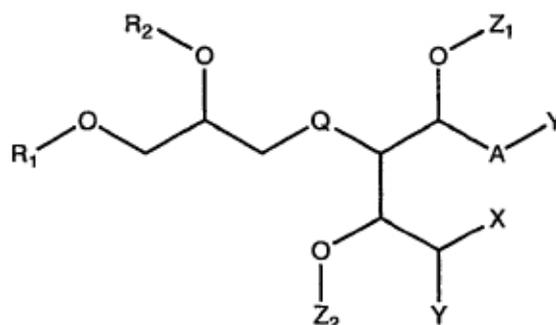
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que A y X forman un enlace para conducir un ciclo de 6 eslabones en el que

- R₁ y R₂ son aquellos definidos de la reivindicación 1;
- Q representa a — OP (O)₂O —;
- A representa — CH—;
- X representa un — CH (OH) —,
- Y representa un radical hidroxilo;
- Z₁ y Z₂ representan, independientemente el uno del otro, al menos un azúcar seleccionado del grupo formado por manosa, glucosa y galactosa el ciclo de 6 miembros tiene una configuración *mioinositol* con Z₁ o Z₂ en posición 1 y representan, al menos un azúcar o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en el que A y X forman un enlace para conducir un ciclo de 6 eslabones en el que

- R₁ y R₂, Z₁ y Z₂ Q e Y son aquellos definidos de la reivindicación 1;
- Q representa a — OP (O)₂O —;
- A representa — CH—;
- X representa un —NR₃— en el que R₃ es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en C₁ — C₆ o un radical acilo en C₁ — C₂₀, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

5. Compuesto según la reivindicación 1 de la fórmula (Ib)



(Ib)

- R₁ y R₂, Z₁ y Z₂ Q e Y son aquellos definidos anteriormente;
- A representa — CH₂-;
- X representa un átomo de hidrógeno o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en el que A y X forman un enlace para conducir un ciclo de 6 eslabones en el que

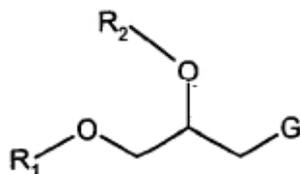
- R₁ y R₂ representan, independientemente el uno del otro, un radical acilo en C₁ – C₂₀
- Z₁ representa la manosa;
- Z₂ representa el átomo de hidrógeno;
- Q representa a — OP (O)₂O -;
- A representa — CH -;
- X representa un - CH (OH) -;
- Y representa un radical hidroxilo;
- El ciclo de 6 eslabones tiene una configuración *mioinositol* con Z₁ en posición 1

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que las sales farmacéuticamente aceptable son las sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, las sales derivadas de ácido clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrógeno carbónico, fosfórico, monohidrógeno fosfórico, dihidrógeno fosfórico, sulfúrico, monohidrógeno sulfúrico e iodhídrico, las sales derivadas de ácido acético, propiónico, isobutírico, maléico, malónico, benzóico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencensulfónico, p – toilsulfónico, cítrico, tartárico, metansulfónico.

8. Procedimiento de preparación de los compuestos definidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:

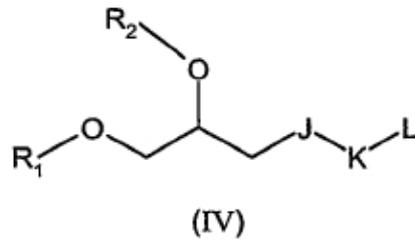
a) se condensa un derivado di – O – acilado o di – O – alquilado del glicerol de la fórmula (III)



(III)

en la que

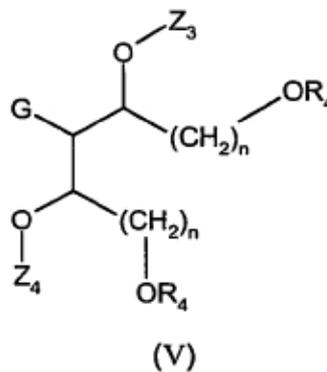
- G = OH o NH₂
- R₁ y R₂, tienen las mismas definiciones que la reivindicación 1 con un agente de fosfitilación, de fosforilación o de carbonización para dar un intermediario de la fórmula (IV)



10 en la que

- 15
- J = OH o NH₂
 - K = P – Obn, P(O)n o C = O,
 - L = grupo saliente
 - R₁ y R₂, tienen las mismas definiciones que la reivindicación 1;

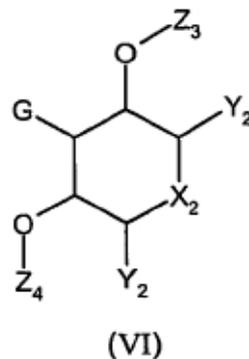
20 b) el intermediario (IV) se condensa con un derivado de poliol o un aminopoliol de la fórmula general (V)



35 en la que

- 40
- G = OH o NH₂,
 - Z₃ y Z₄, representan independientemente el uno del otro, un hexopiranososa con configuración *mano*, *gluco* o *galacto* y llevando a los grupos protectores de acetilo o metoxiacetilo o un grupo bencilo, siendo entendido siempre que al menos uno de los grupos Z₃ y Z₄ represente un azúcar protegido.
 - R₄ representa un grupo protector seleccionado del grupo que contiene un grupo bencilo o un radical alcoxiacetilo en C₁ – C₆,

45 o se condensa el intermediario (IV) con un compuesto cíclico de la fórmula general (VI)



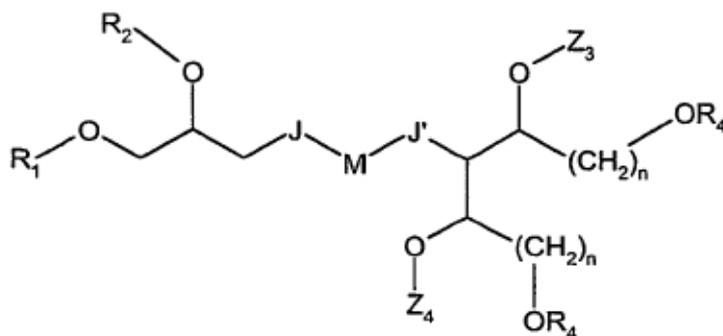
60 en la que

- 65
- G = OH o NH₂,
 - Z₃ y Z₄, tienen las mismas definiciones que anteriormente
 - Y₂ = H o un grupo – OR₄ o un grupo – (CH₂)_n OR₄ en el que R₄ tiene la misma definición que anteriormente

- $X_2 = -CH_2-$, $-CHOR_4$, $-NR_3$, u O en el que R_3 es un átomo de hidrógeno, un radical alquilo en $C_1 - C_6$ o un radical acilo en $C_1 - C_{20}$ y R_4 representa un grupo protector, como un grupo bencilo o un radical alcoxiacetilo en $C_1 - C_6$

5 eventualmente en presencia de un agente de acoplamiento;

c) eventualmente, se somete el compuesto obtenido de la etapa b) a una reacción de oxidación para dar un compuesto de la fórmula general (VII)

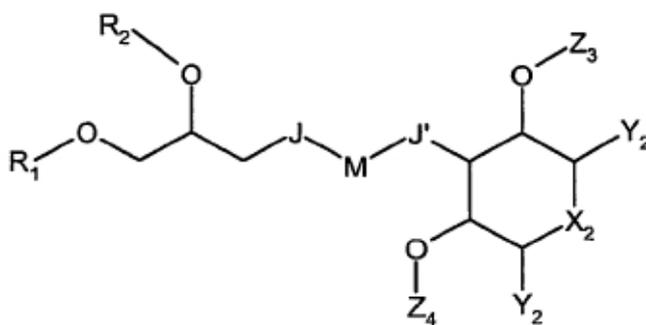


(VII)

25 en la que

- J y J' = OH o NH
- M = P(O)OBn o C = O
- Z_3 , Z_4 , R_1 , R_2 , R_4 tienen las mismas definiciones que anteriormente

30 o un compuesto de la fórmula general (VIII)



(VIII)

en la que

- J y J' = OH o NH
- M = P(O)OBn o C = O
- X_2 , Y_2 , Z_3 , R_1 , R_2 , R_4 tienen las mismas definiciones que anteriormente,

d) se somete el producto de la fórmula general (VII) o de la fórmula general (VIII) a una desprotección en dos etapas que consiste primero en el tratamiento con una alquilamina seleccionada del grupo formado por t - butilamina para luego someter los productos desacilados a una hidrogenación catalítica.

9. Compuesto definido como medicamento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y en cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Utilización de un compuesto tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una enfermedad asociada a la

sobreexpresión de citoquinas o de quimioquinas, particularmente de TNF y / o de la IL – 12, dicha enfermedad comprende:

- 5 A) Las enfermedades inmunes o autoinmunes seleccionadas del grupo formado por la artritis reumatoide, la diabetes mellitas, el lupus eritematoso sistémico o la enfermedad de Basedow.
- B) El rechazo del injerto.
- C) Las infecciones virales y / o parasitarias.
- D) Los choques resultantes de una infección crónica o aguda de origen bacteriano, viral y / o parasitario.
- 10 E) Las enfermedades inflamatorias seleccionadas del grupo formado por las enfermedades crónicas y las enfermedades inflamatorias vasculares.
- F) Enfermedades neurodegenerativas seleccionadas del grupo formado por las enfermedades desmielinizantes, las enfermedades extrapiramidales y las cerebelosas.
- G) Las patologías malignas que implican tumores secretores de TNF o que implican al TNF, seleccionadas del grupo formado por leucemia y linfoma.
- 15 H) Hepatitis inducida por alcohol.

12. Utilización según la reivindicación 11, según la cual el medicamento se destina a la prevención o al tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

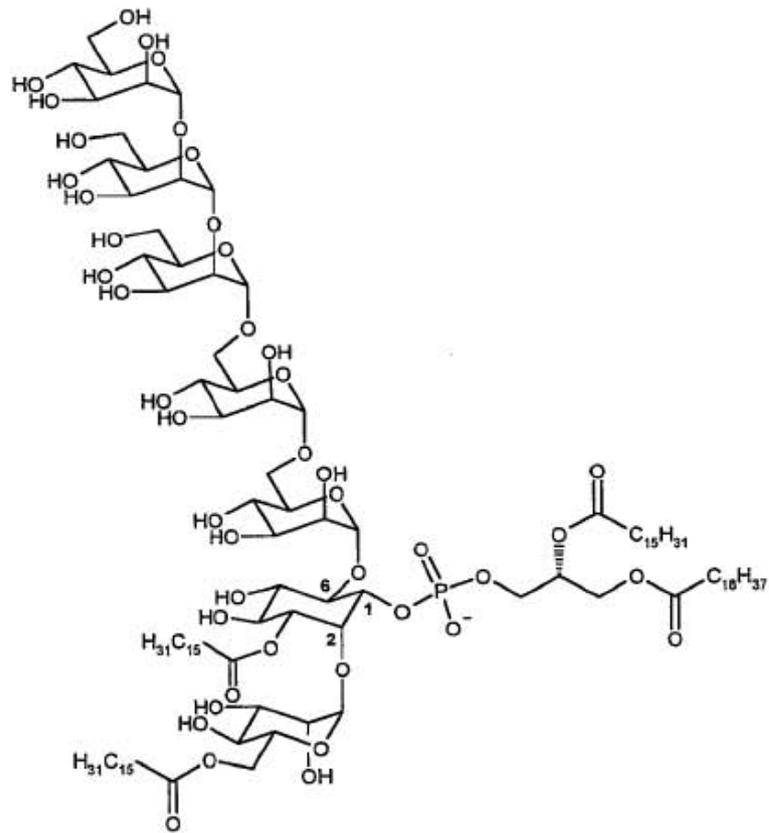


Figura 1

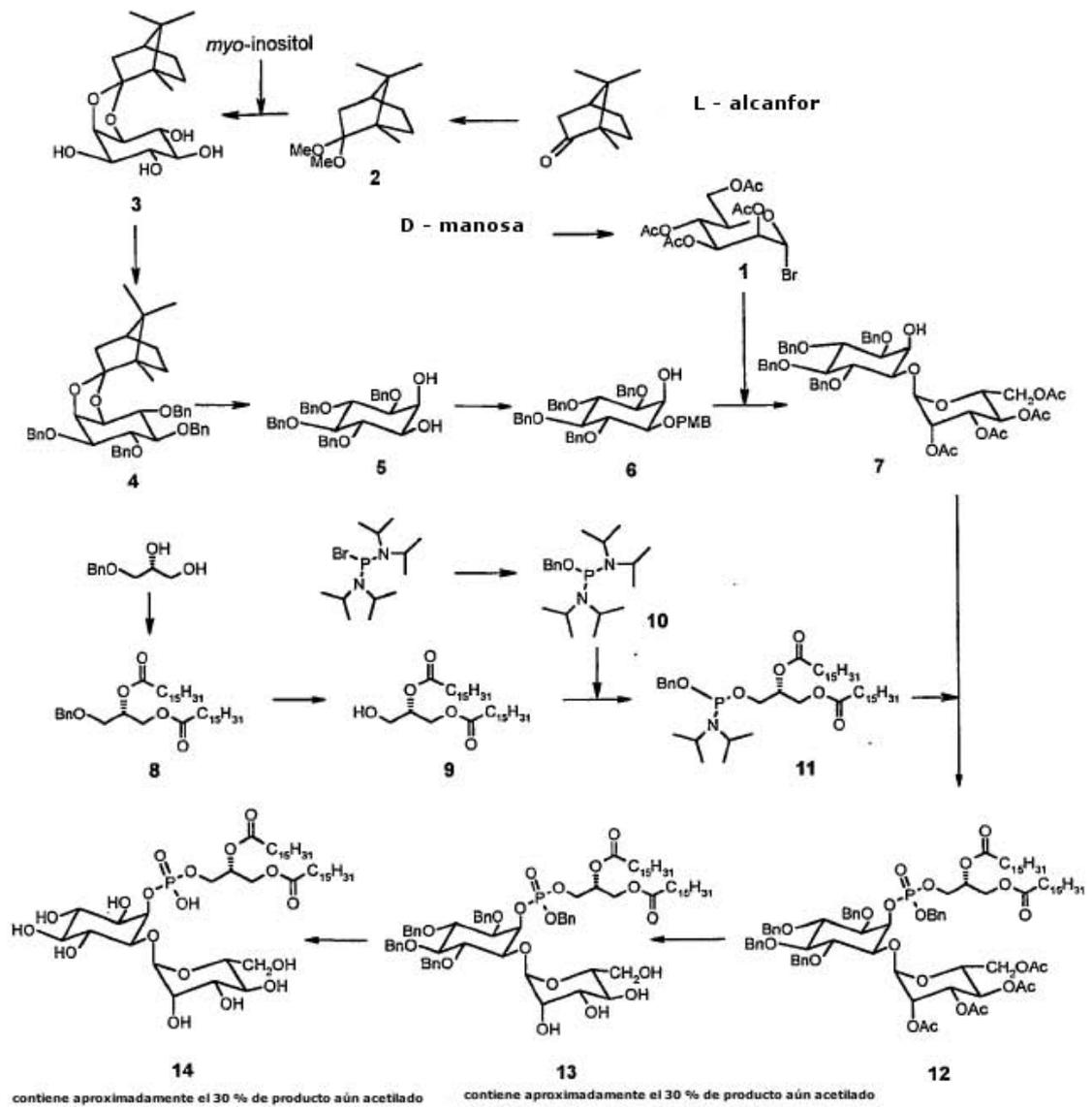


Figura 2a

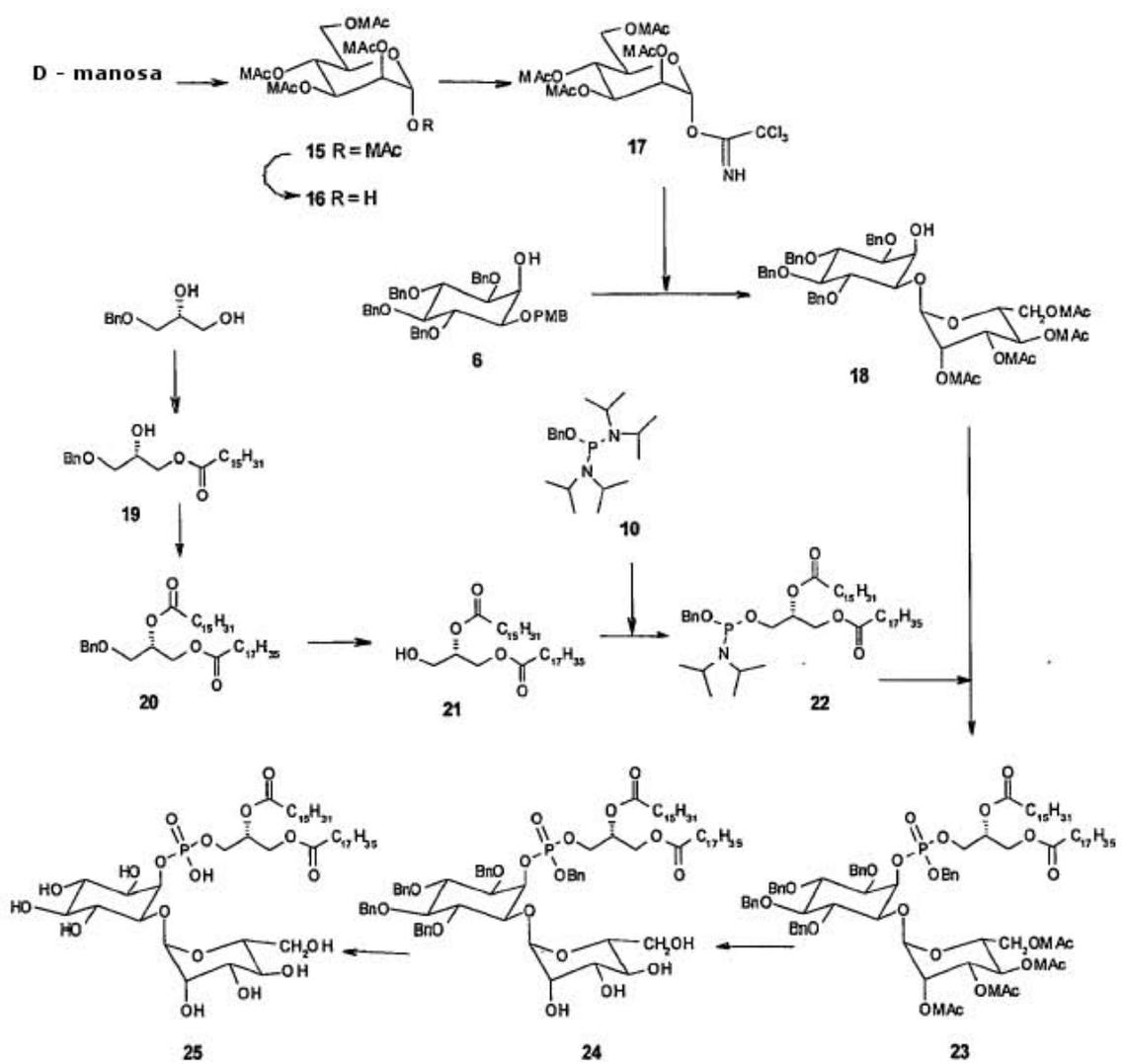


Figura 2b

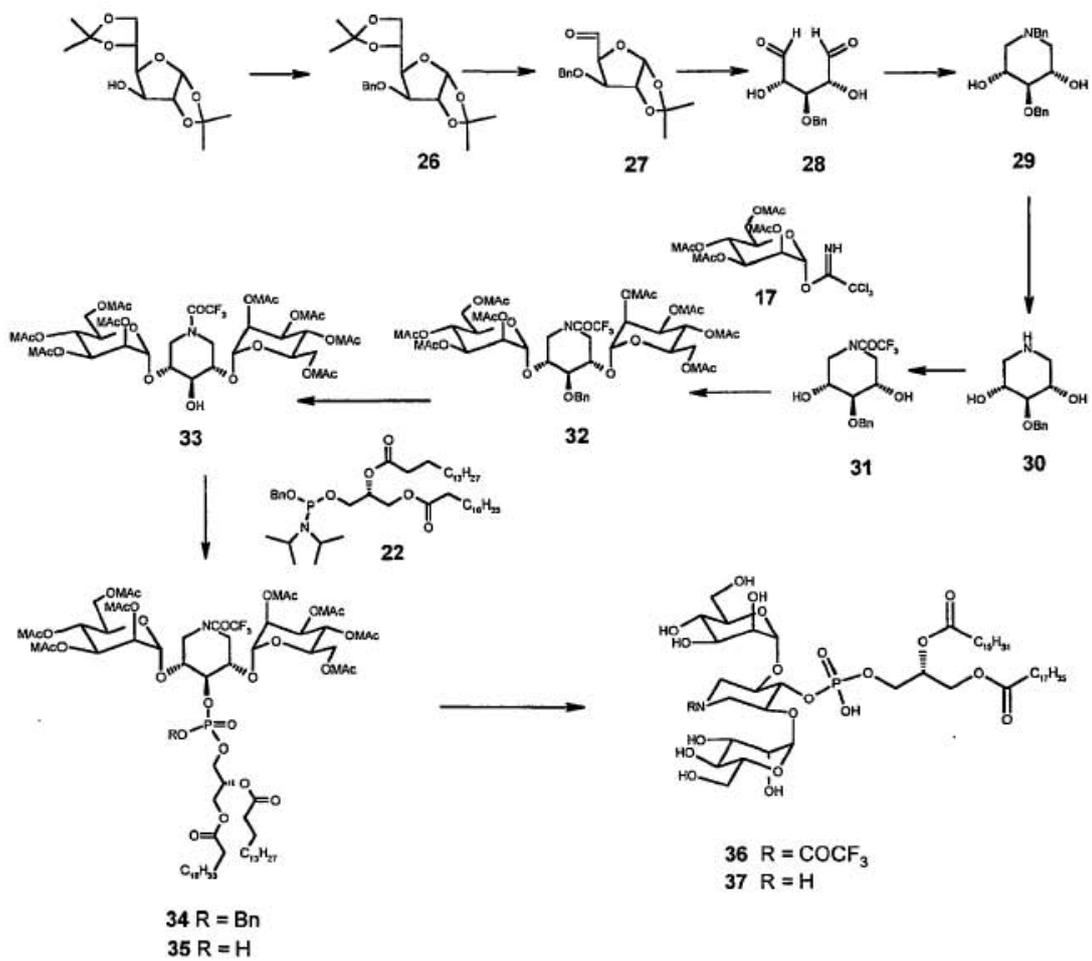


Figura 2c

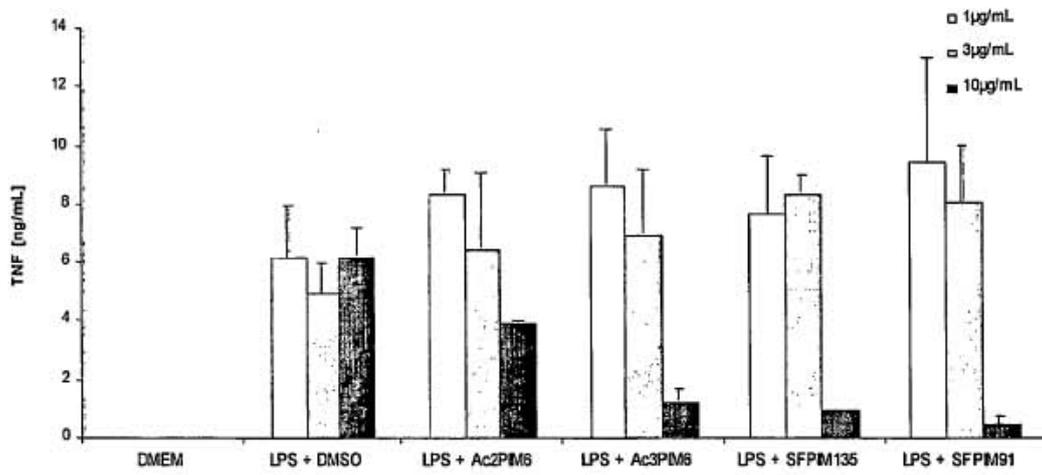


Figura 3

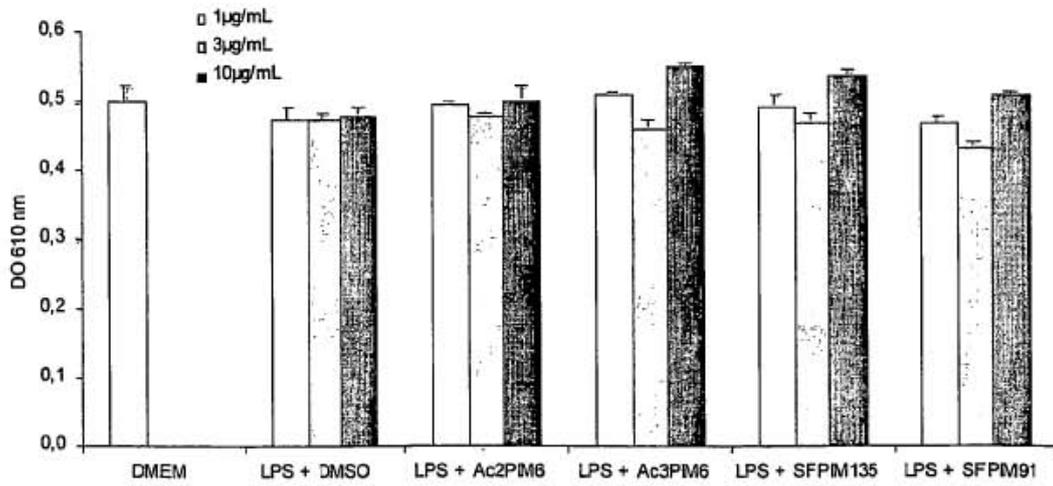


Figura 4

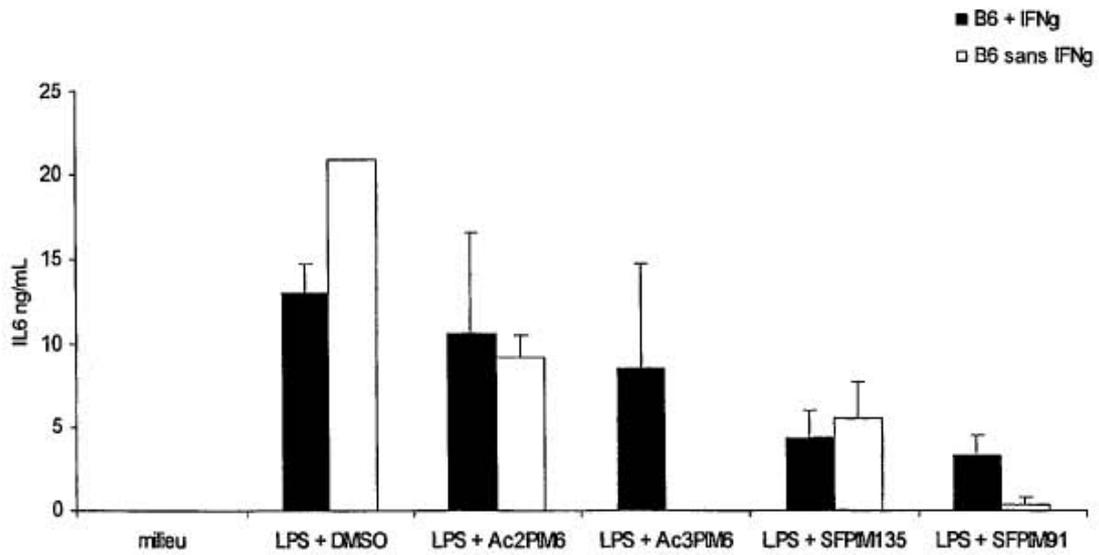


Figura 5

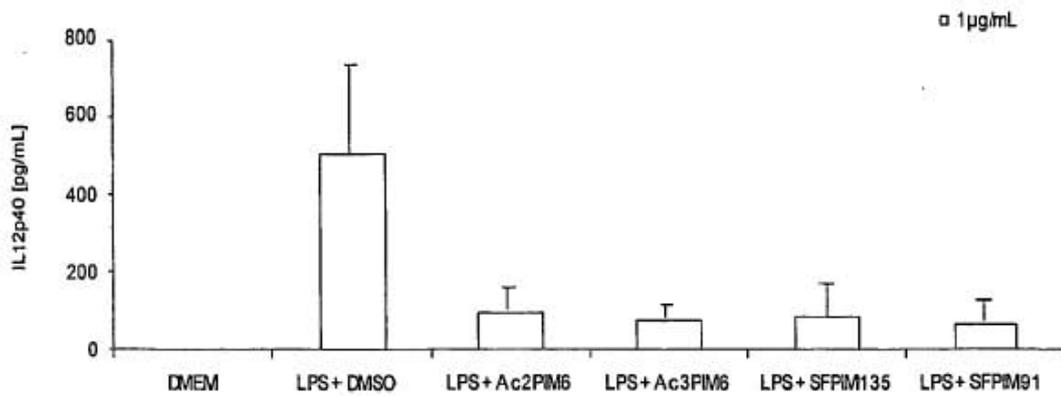


Figura 6

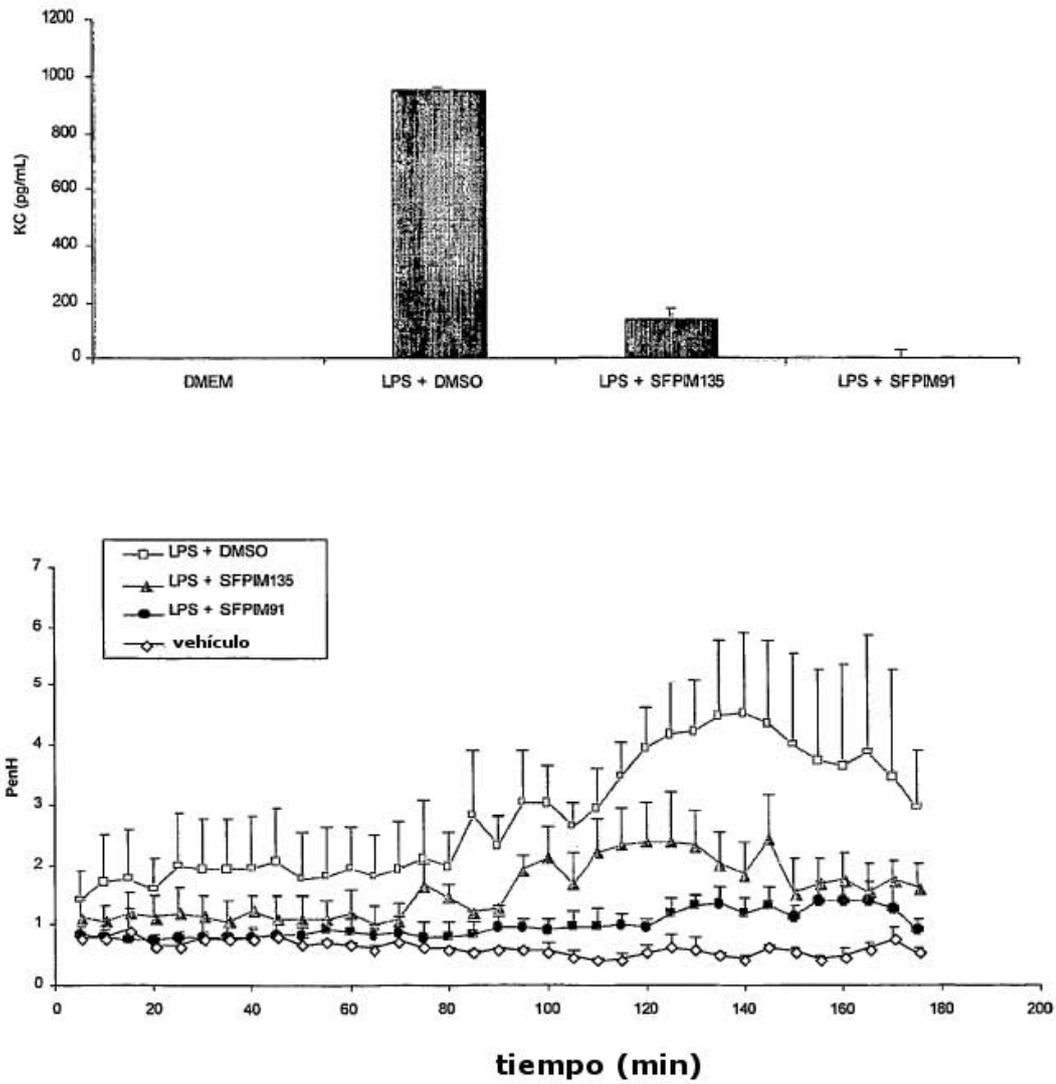


Figura 7

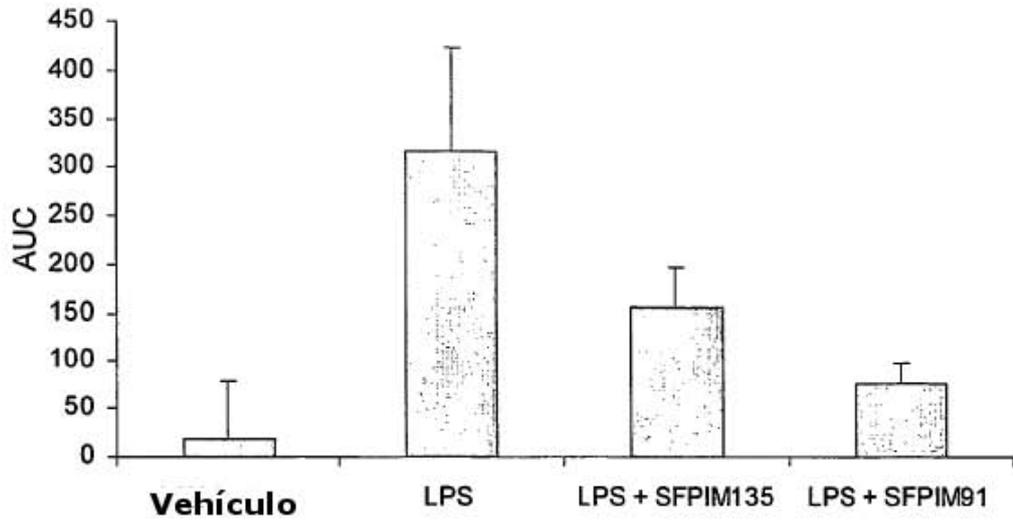


Figura 8

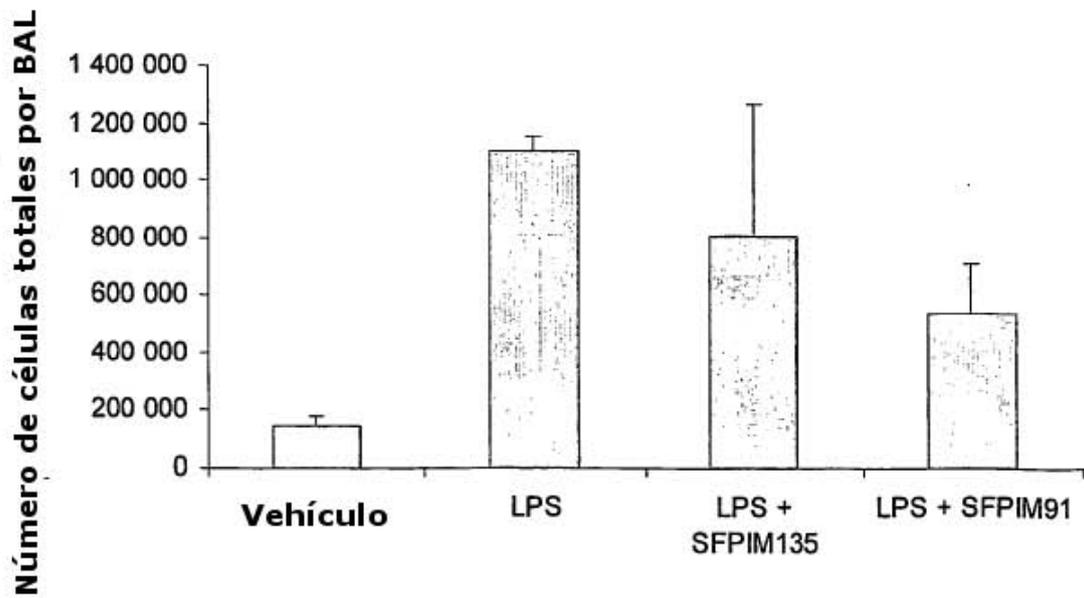


Figura 9

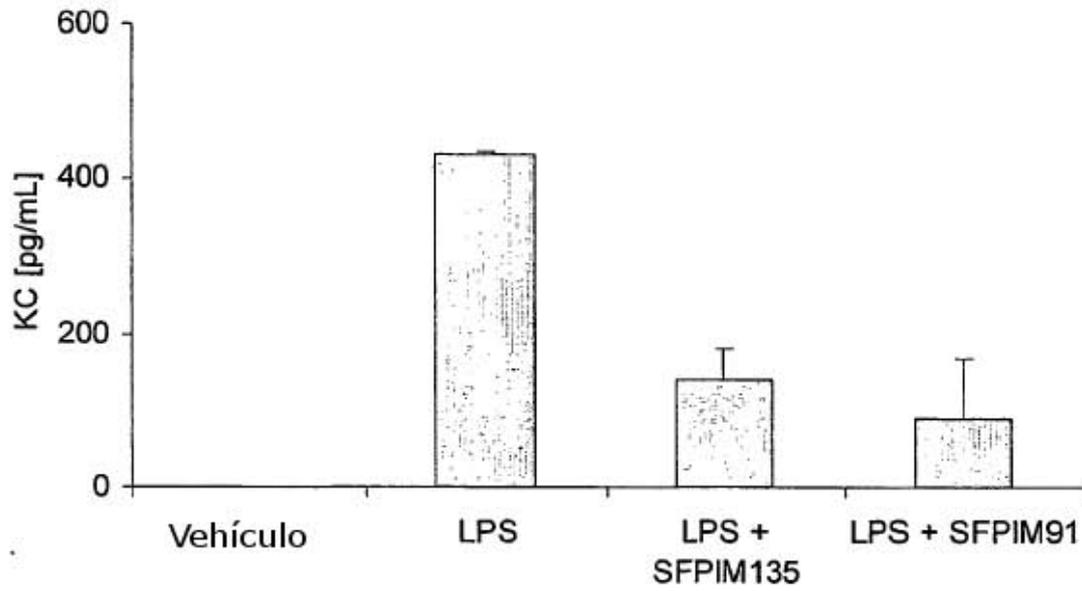


Figura 10

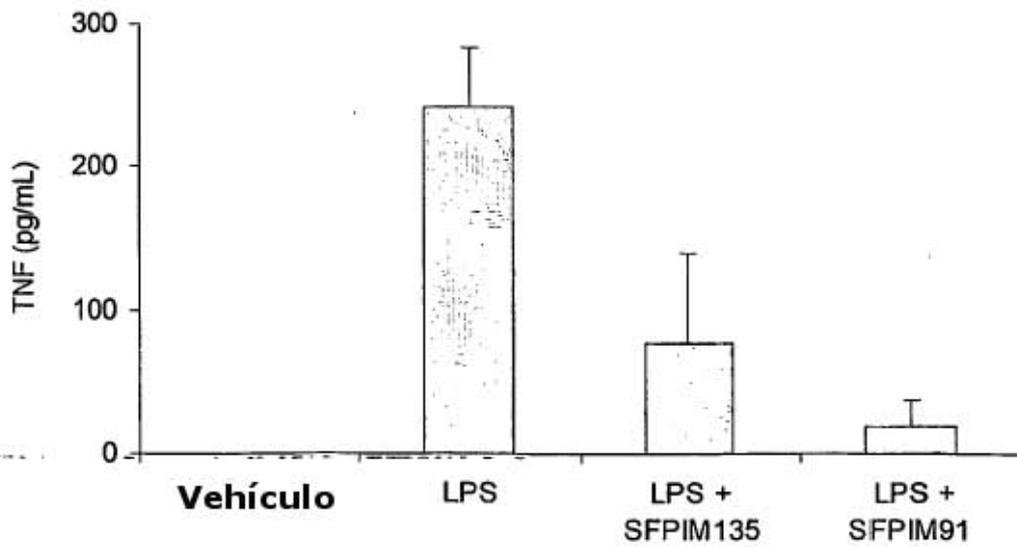


Figura 11

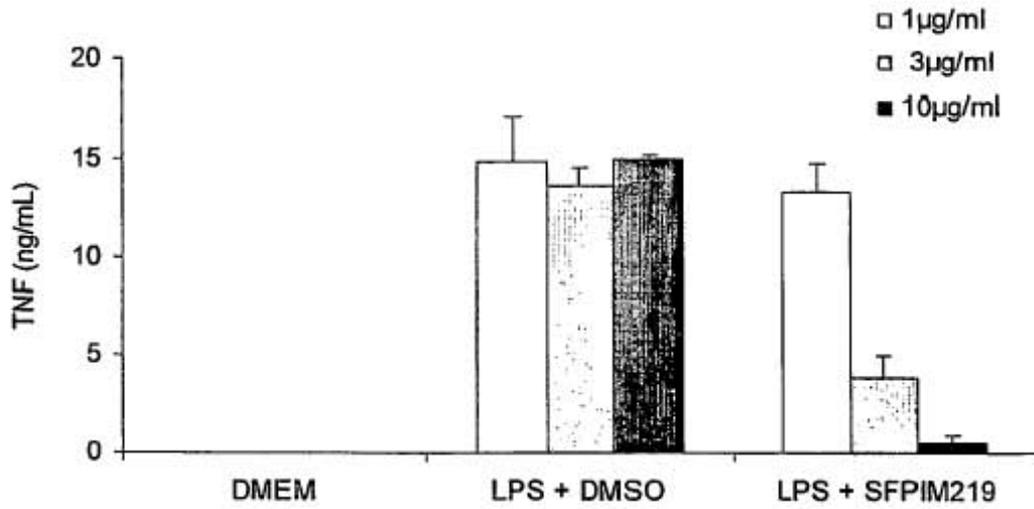


Figura 12

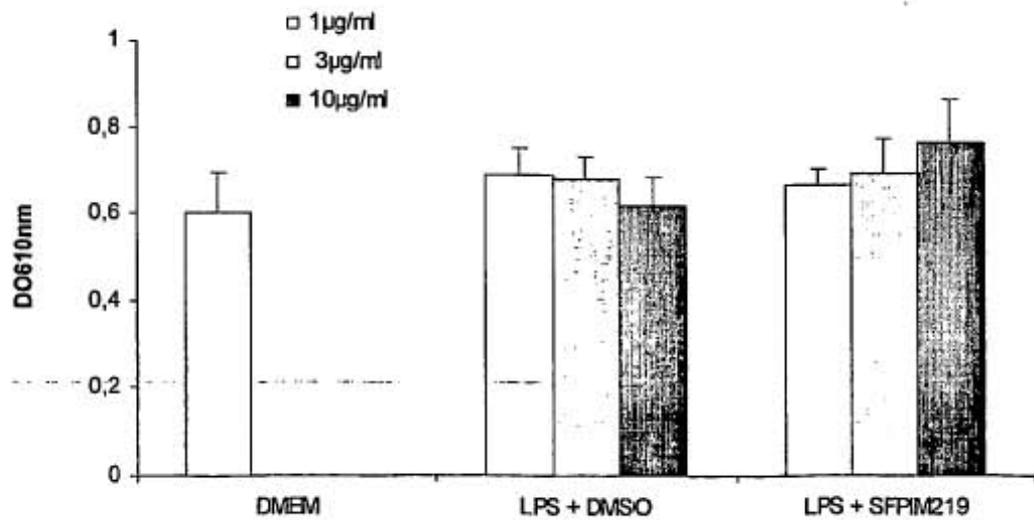


Figura 13

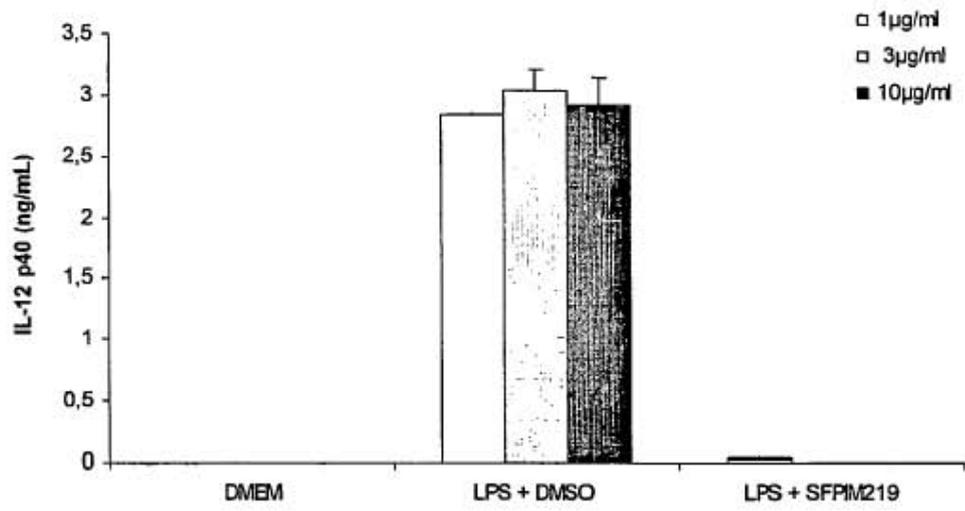


Figura 14

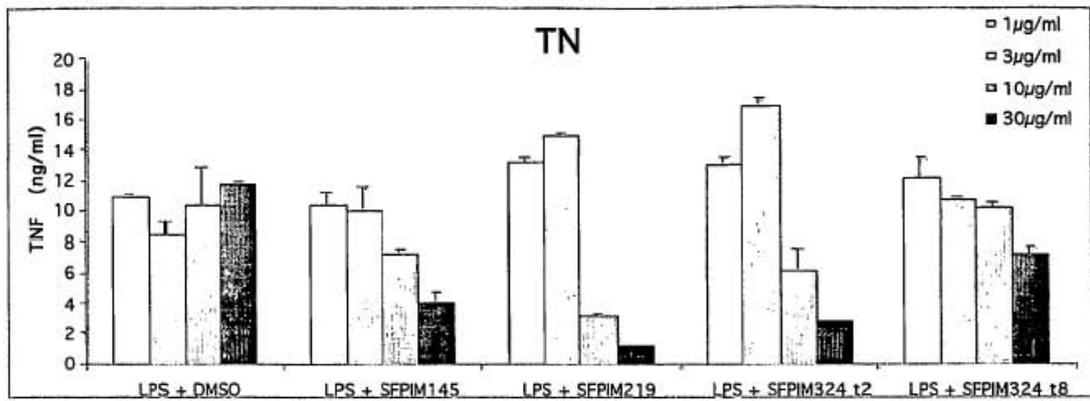


Figura 15

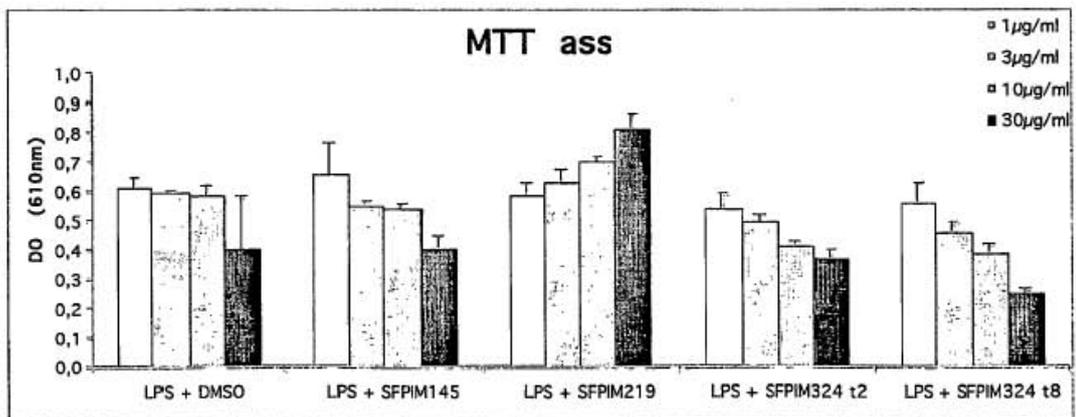


Figura 16

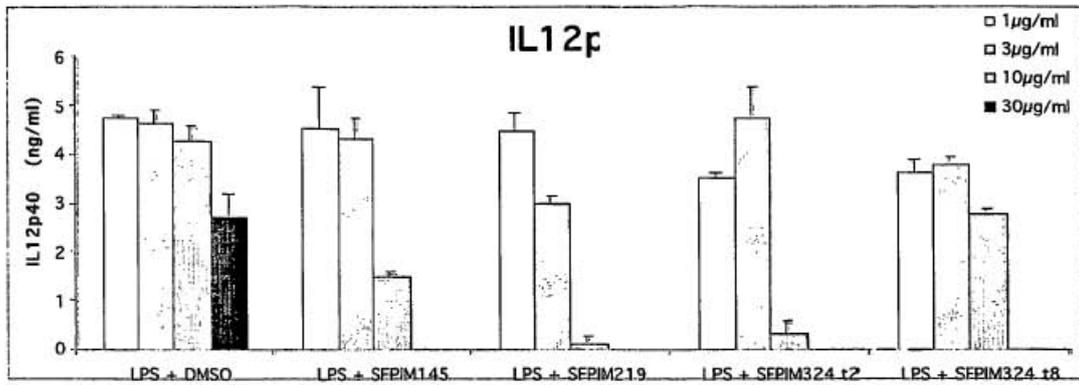


Figura 17