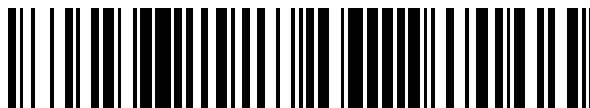


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 427**

21 Número de solicitud: 201231045

51 Int. Cl.:

**G01N 21/64** (2006.01)

**G01N 24/08** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61K 31/351** (2006.01)

**C07D 413/12** (2006.01)

**C07D 309/14** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.07.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.02.2014**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**Serrano, 117**

**28006 Madrid ES y**

**FUNDACIÓN DEL HOSPITAL NACIONAL DE  
PARAPLÉJICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA  
INTEGRACIÓN (FUHNPAIIN) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NIETO SAMPEDRO, Manuel;**

**FERNÁNDEZ MAYORALAS, Alfonso;**

**DONCEL PÉREZ, Ernesto y**

**GARCÍA ÁLVAREZ, Isabel**

74 Agente/Representante:

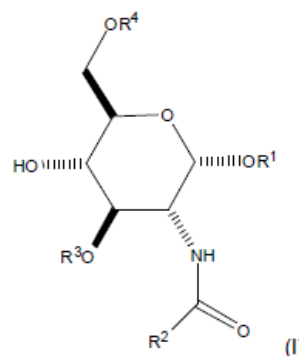
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **Uso de glicolípidos sulfatados como promotores del crecimiento neurítico, la mielinización e inhibidores de la proliferación de astrogliya y microglia**

57 Resumen:

Uso de glicolípidos sulfatados como promotores del crecimiento neurítico, la mielinización e inhibidores de la proliferación de astrogliya y microglia.

Uso de un compuesto de fórmula I, donde R<sup>1</sup> es un resto alqueno C<sub>5</sub>- C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, R<sup>2</sup> se selecciona independientemente del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado, al menos uno de R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> es un grupo SO<sub>3</sub>M, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, siendo el otro hidrógeno o acilo; para fabricar un medicamento para tratar patologías del sistema nervioso central seleccionadas del grupo que consiste en lesión por trauma del SNC, enfermedad desmielinizante, enfermedad neuro-inflamatoria y trastorno mental causado por bajo nivel de BDNF. Así como, algunos de estos compuestos de fórmula I, sus procedimientos de obtención y composiciones que los comprenden.



ES 2 441 427 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de glicolípidos sulfatados como promotores del crecimiento neurítico, la mielinización e inhibidores de la proliferación de astrogliya y microglia

## SECTOR DE LA TÉCNICA

- 5 La presente invención se refiere al uso de glicolípidos sulfatados de fórmula (I) para tratar enfermedades del sistema nervioso central. Estos compuestos actúan como inhibidores de astrocitos y microglia. También promueven el exo-crecimiento neurítico, dendritas y axones, el volumen oligodendroglial y la síntesis de mielina. Así como al hallazgo de su interacción con RhoGDI $\alpha$ , proteína reguladora de la familia de RhoGTPasas.

## ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 Las lesiones por trauma en el Sistema Nervioso Central (SNC) tienen cada vez mayor importancia económica y social a escala mundial. Deteniéndonos en la lesión medular comprobamos que tiene una incidencia entre 25 a 30 nuevos casos por millón de habitantes y año en España, lo que supone más de mil casos nuevos anualmente. Se ha observado que los pacientes agudos son individuos jóvenes, reflejándose en la edad de los ingresados donde el 80% presenta entre 15 y 39 años. Un informe anual realizado en 2007 por la Dirección Médica del Hospital Nacional de Paraplégicos describe que en estos individuos se producen lesiones altas, es decir, mayor número de tetraplejas respecto a las paraplejas. En particular, se ha reportado un 48 % de lesiones cervicales frente a un 45 % de lesiones dorsales y 7 % de lesiones lumbares. Aunque desde hace 5 años se ha observado que las tetraplejas disminuyen respecto a las paraplejas. Adicionalmente, el porcentaje de hombres es muy superior al de mujeres, en particular 80 % de hombres y 20 % de mujeres.
- 20 El Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo (HNPT) ha cifrado en 60 mil € el coste medio de hospitalización de cada paciente lesionado medular, considerando un promedio de nueve meses de recuperación desde el ingreso hasta el alta médica. La aparición de 1000 nuevos casos de paraplejía o tetraplejía supone un coste anual de 60 millones €, añadido al de pacientes crónicos en tratamiento, con una esperanza de vida similar al conjunto de la población. Estos datos del HNPT son equiparables a las cifras actuales en los países desarrollados. Incluso cuando el número de muertes por accidente de tráfico va disminuyendo ostensiblemente; esto no significa que decrezcan los lesionados medulares. Estos accidentes son la causa principal de lesiones cervicales que llevan a una parálisis total y la tendencia es a un aumento de estas patologías.

- 30 Los daños por laceración, o aquellos que producen cavitación en la médula espinal, son típicos de las lesiones traumáticas y afectan a los axones del sistema nervioso central (SNC). Incluso una pequeña pérdida de sustancia gris puede dar lugar a secuelas devastadoras en el paciente (M. B. Bunge, *Neuroscientist* **7**, 325 (Aug, 2001); J. H. Kaas *et al.*, *Exp Neurol* **209**, 407 (Feb, 2008)). Además de la muerte neuronal inicial producida por el trauma, la recuperación anatómica y funcional de la zona lesionada no se produce espontáneamente debido a que los axones lesionados colapsan sus conos de crecimiento, retrayéndose y degenerando. En la zona lesionada se forma un tejido inhibitorio para el crecimiento axonal, llamada cicatriz glial, que no permite el paso de eventuales fibras regenerativas a través de la lesión. Componentes de la mielina, la matriz extracelular, así como la presencia de glia reactiva, es decir, astrocitos y microglia, son responsables del carácter inhibitorio de la cicatriz glial (S. K. Kostyk, *et al.*, *Neuroscience* **156**, 498 (Oct 15, 2008); H. Beck, M. Semisch, C. Culmsee, N. Plesnila, A. K. Hatzopoulos, *Am J Pathol* **173**, 77 (Jul, 2008)).

- 40 La regeneración axonal en el SNC lesionado esta imposibilitada en gran medida por inhibidores específicos que se acumulan en el sitio de la lesión y que limitan severamente la recuperación funcional (G. Yiu, Z. He, *Nat Rev Neurosci* **7**, 617 (Aug, 2006); S. Watkins, M. Yunge, D. Jones, E. Kiely, A. J. Petros, *J Pediatr Surg* **36**, 654 (Apr, 2001)). Proteínas inhibitorias como: NogoA, MOgp (en inglés, Myelin Oligodendrocyte glycoprotein), y MAG (en inglés, Myelin-Associated Glycoprotein) son expresadas por la oligodendroglia. Estas pueden asociarse al receptor de Nogo (NgR), que a su vez puede formar un complejo con el receptor p75 en la superficie de neuronas. Esta interacción conduce a la transducción de señales al citosol de la neurona, donde se activa la GTPasa RhoA, y finalmente se produce el bloqueo del crecimiento axonal (A. A. Vyas, O. Blixt, J. C. Paulson, R. L. Schnaar, *J Biol Chem* **280**, 16305 (Apr 22, 2005); A. A. Vyas *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8412 (Jun 11, 2002); T. Yamashita, *Brain Nerve* **59**, 1347 (Dec, 2007)). Por lo tanto la búsqueda de moléculas que inhiban la actividad de RhoA es un campo prometedor para la aplicación de terapias que conduzcan a la reparación del SNC lesionado (R. E. Gross, Q. Mei, C. A. Gutekunst, E. Torre, *Cell Transplant* **16**, 245 (2007); S. Mi, *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 245 (Jun-Aug, 2008)).

- 50 Considerando el contexto anterior, es de gran interés la modulación de la familia de RhoGTPasas, a la que además de RhoA, también pertenecen CDC42 y Rac (E. Boulter *et al.*, *Nat Cell Biol* **12**, 477 (May); M. Gorovoy *et al.*, *Circ Res* **101**, 50 (Jul 6, 2007)).

- 55 En un trabajo de investigación anterior, hemos sintetizado compuestos derivados de glucosamina con grupos lipófilos en posición anomérica y grupos sulfatos en otras posiciones del azúcar. Utilizando estas moléculas sintéticas observamos una inhibición efectiva de la proliferación, crecimiento o migración de astroblastos en cultivo; procesos en los que están implicadas estas GTPasas. Así también hemos observado la inhibición por

estos glicósidos de la expresión de genes que modulan directamente la actividad de RhoGTPasas (M. Nieto-Sampedro, E. Doncel, A. Fernández, *Expert Opin Ther Pat* **14** 487 (2004)).

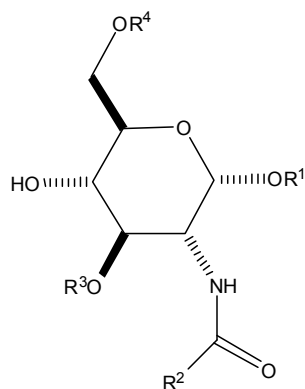
5 En otro trabajo de investigación describimos que otros derivados de glucosamina con grupos lipófilos en posición enomérica y grupos sulfato, glicolípidos sulfatados de fórmula I, son capaces de inhibir el crecimiento de melanomas y gliomas (I. Garcia-Alvarez *et al.*, *J Med Chem* **50**, 364 (Jan 25, 2007)). Estos procesos son irreversibles pues las células transformadas entran en apoptosis, fragmentándose el ADN (I. Garcia-Alvarez *et al.*, *J Med Chem* **52**: 1263–1267 (2009)). Sin embargo, en los ensayos que se describen en esta solicitud de patente se observó que las células afectadas por el tratamiento, tanto astrocitos como microglia, se recuperan en el momento que dicho tratamiento se retira, de manera que el mecanismo de inhibición es diferente al de las células transformadas.

10 En los procesos oncológicos se promueve la proliferación celular y por ende la producción de factores solubles, por ejemplo EGF, para la señalización de las células transformadas. Por el contrario en las células neurales normales después de una lesión disminuyen drásticamente los niveles de factores de crecimiento y se producen gran cantidad de señales inhibitorias (J. Dill *et al.*, *J Neurosci* **28** (36): 8914-28 (2008)). Uno de los objetivos de la presente invención es proporcionar un compuesto que inhiba esta inhibición, proveniente fundamentalmente de las células gliales, provocando así la activación de la recuperación fisiológica en la zona del SNC afectada. De esta forma, se consigue aumentar los niveles endógenos de factores solubles como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF según sus siglas en inglés) al no ser consumidos por las células gliales, permitiendo que alcancen a los otros tipos celulares implicados en la transmisión y preservación de los impulsos nerviosos, es decir neuronas y oligodendrocitos.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En esta invención describimos el uso de glicolípidos sintéticos que promueven el crecimiento axonal, incrementan la producción de mielina en oligodendrocitos e inhiben la división de células de astroglia y microglia. Así también demostramos que este comportamiento se debe a una interacción directa con la proteína RhoGDI $\alpha$ , que forma parte de la cascada de señalización para RhoGTPasas. Estos compuestos son estables, solubles en solventes polares y su efecto desaparece al ser eliminados.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula I



(I)

30 donde

R<sup>1</sup> es un resto alquenilo C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles,

R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado, y

35 al menos uno de los sustituyentes R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es un grupo SO<sub>3</sub>M, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, y el otro sustituyente, sino es un grupo SO<sub>3</sub>M, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y acilo;

para fabricar un medicamento para tratar patologías del sistema nervioso central en las que están implicadas las células gliales y las RhoGTPasas. Preferiblemente, estas patologías del sistema nervioso central están seleccionadas del grupo que consiste en lesión por trauma del SNC, enfermedad des-mielinizante, enfermedad neuro-inflamatoria y trastorno mental causado por bajo nivel de BDNF.

40 En realizaciones preferidas de la presente invención, una enfermedad des-mielinizante puede ser el Síndrome de Guillan Barré o la Esclerosis Múltiple. Por otro lado, una enfermedad neuro-inflamatoria puede ser la Enfermedad

de Alzheimer o la Enfermedad de Parkinson. Adicionalmente, los trastornos mentales pueden ser tendencias suicidas o dependencia a drogas.

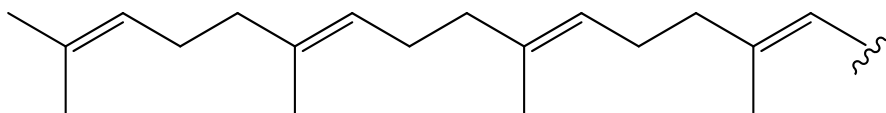
El término "metilo fluorado" se refiere a un grupo fluorometilo, difluorometilo o trifluorometilo.

5 El término "acilo" se refiere, en la presente invención, a un radical de ácido carboxílico lineal o ramificado, que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace éster, como, por ejemplo y sin carácter limitante, acetilo, propanoilo, butanoilo o pentanoilo.

El término "amina cuaternaria" se refiere, en la presente invención, a un radical  $-NR_aR_bR_cR_d$ , donde  $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$  y  $R_d$  se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en alquilo  $C_1-C_6$ .

10 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula I tal como se describe en este primer aspecto de la invención para fabricar un medicamento para tratar una lesión por trauma del sistema nervioso central (SNC). Preferiblemente, para tratar una lesión cervical, dorsal o lumbar.

En una realización preferida,  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y geranylgeranilo de fórmula:



15

El grupo octadec-9-enilo también se conoce como oleilo.

En otra realización preferida,  $R^3$  y  $R^4$  son ambos  $SO_3M$ , donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria. Preferiblemente, M es un metal alcalino seleccionado del grupo que consiste en sodio y potasio.

20 En una realización aún más preferida,  $R^1$  selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y geranylgeranilo tal como se describe en los párrafos anteriores.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula I tal como se describe en esta solicitud de patente, donde  $R^1$  es octadec-9-enilo,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es hidrógeno y  $R^4$  es  $SO_3M$ , y donde M es un metal alcalino seleccionado del grupo que consiste en sodio y potasio.

25 Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula I tal como se describe en este primer aspecto para tratar patologías del sistema nervioso central en las que están implicadas las células gliales y las RhoGTPasas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en lesión por trauma del SNC, enfermedad des-mielinizante, enfermedad neuro-inflamatoria y trastorno mental causado por bajo nivel de BDNF. En una realización aún más preferida, para tratar una lesión por trauma del sistema nervioso central (SNC).

30 Además, la presente invención también se refiere a un método para tratar una patología del sistema nervioso central en las que están implicadas las células gliales y las RhoGTPasas, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en lesión por trauma del SNC, enfermedad des-mielinizante, enfermedad neuro-inflamatoria y trastorno mental causado por bajo nivel de BDNF, donde dicho método comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I tal como se describe en este primer aspecto de la invención. En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere a un método para tratar una lesión por trauma del sistema nervioso central.

35 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I, caracterizado porque

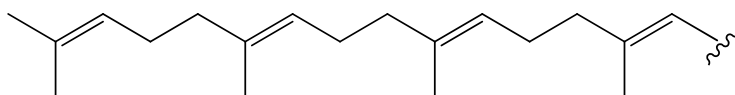
$R^1$  es un resto alquenilo  $C_5-C_{25}$  que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles,

$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado, y

40 al menos uno de los sustituyentes  $R^3$  o  $R^4$  es un grupo  $SO_3M$ , donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, y el otro sustituyente, sino es un grupo  $SO_3M$ , se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y acilo;

siempre que cuando  $R^2$  es metilo,  $R^3$  y  $R^4$  son grupos  $SO_3M$ .

45 En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula I, donde  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y geranylgeranilo de fórmula:

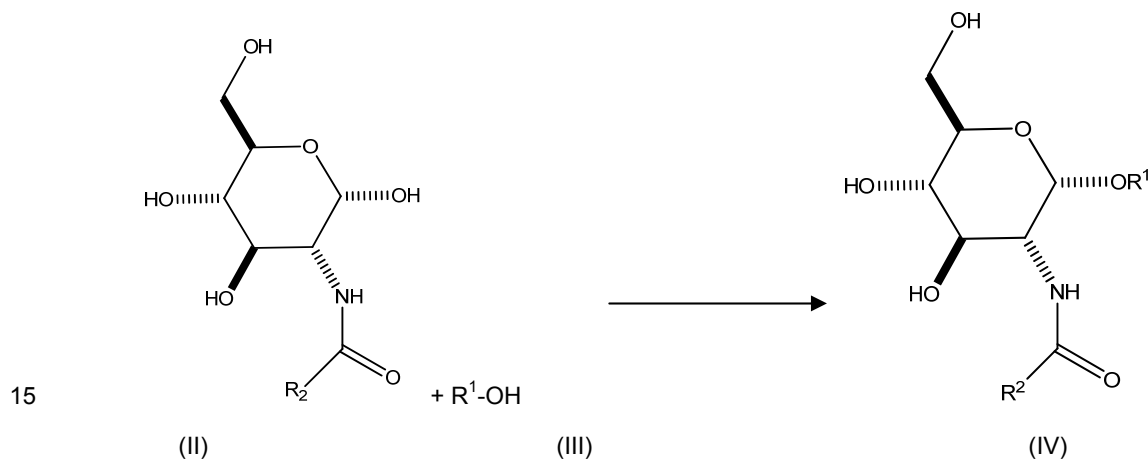


5 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula I donde  $R^2$  es un grupo trifluorometilo. Preferiblemente, adicionalmente  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y geranylgeranilo.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto de fórmula I donde  $R_3$  y  $R_4$  son ambos grupos  $SO_3M$ . Preferiblemente, adicionalmente  $R^1$  se selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y geranylgeranilo.

10 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto de la presente invención, donde  $R^3$  y  $R^4$  son  $SO_3M$  y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, caracterizado porque comprende:

a) reacción de un compuesto de fórmula II con un alcohol de fórmula III en presencia de un ácido para obtener un compuesto de fórmula IV,



donde

$R^1$  es un resto alquenilo  $C_5$ - $C_{25}$  que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y

$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado; y

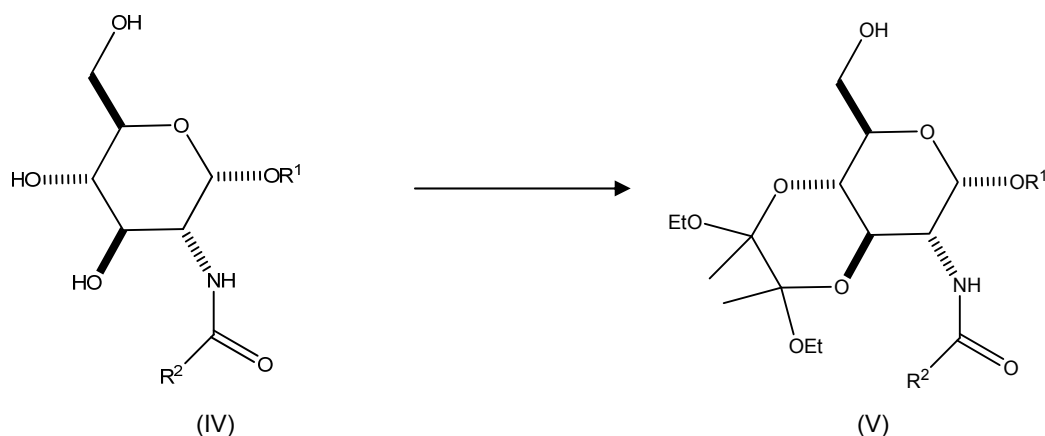
20 b) tratar el compuesto IV con un agente de sulfatación para obtener el compuesto de fórmula I donde  $R^3$  y  $R^4$  son  $SO_3M$ .

25 En una realización preferida el ácido es un ácido prótico. Preferiblemente, el ácido prótico se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido p-toluensulfónico, ácido camforsulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico y ácido yodhídrico. En una realización más preferida, el ácido prótico puede ser ácido sulfúrico adsorbido sobre sílice.

Se entiende como agente de sulfatación un reactivo o mezcla de reactivos capaces de generar un grupo  $SO_3^-$ , por ejemplo  $SO_3$ -triethylamina,  $SO_3$ -trimetilamina o  $SO_3$ -piridina. En una realización preferida, el agente de sulfatación es  $SO_3$ -piridina.

30 La presente invención también se refiere al procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto de esta solicitud de patente, donde  $R^3$  es hidrógeno,  $R^4$  es  $SO_3M$  y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, caracterizado porque comprende:

a) reacción de un compuesto de fórmula IV con 2,3-butanodiona y etanol, en presencia de un ácido prótico para obtener un compuesto de fórmula V,

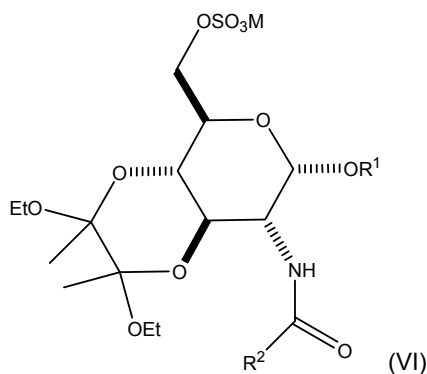


donde

R<sup>1</sup> es un resto alquénilo C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y

5 R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado;

b') tratar el compuesto V con un agente de sulfatación para obtener el compuesto de fórmula VI; e



10 c') hidrolizar el compuesto VI en presencia de un ácido prótico para obtener el compuesto de fórmula I donde R<sup>3</sup> es hidrógeno y R<sup>4</sup> es SO<sub>3</sub>M, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula IV se obtiene por reacción de un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III tal como se describe en la etapa a) del procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula I donde R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son SO<sub>3</sub>M.

15 En otra realización preferida, el ácido prótico utilizado en la etapa a') es ácido camforsulfónico.

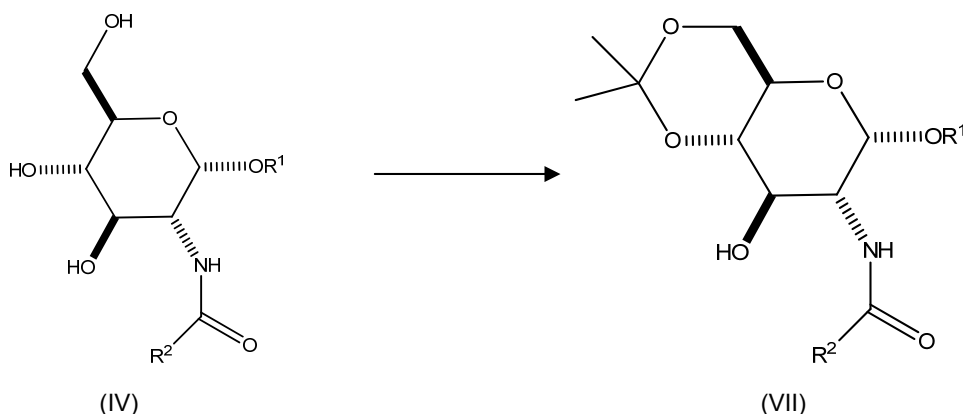
En otra realización preferida, el agente de sulfatación es SO<sub>3</sub>-piridina.

En otra realización preferida, el ácido prótico utilizado en la etapa c') es ácido acético glacial.

20 En una realización aún más preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula I donde R<sup>3</sup> es hidrógeno, R<sup>4</sup> es SO<sub>3</sub>M y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, donde el ácido prótico utilizado en la etapa a') es ácido camforsulfónico, el agente de sulfatación es SO<sub>3</sub>-piridina y el ácido prótico utilizado en la etapa c') es ácido acético glacial.

25 La presente invención también se refiere al procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto de la presente invención, donde R<sup>3</sup> es SO<sub>3</sub>M, R<sup>4</sup> es hidrógeno y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, caracterizado porque comprende:

a'') reacción de un compuesto de fórmula IV con 2,2-dimetoxipropano en presencia de un ácido prótico para obtener un compuesto de fórmula VII;



donde

5  $R^1$  es un resto alqueno  $C_5-C_{25}$  que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y

$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado;

b'') tratar el compuesto VII con un agente de sulfatación e hidrolizar el grupo acetal para obtener el compuesto de fórmula I donde  $R^3$  es  $SO_3M$  y  $R^4$  es hidrógeno.

10 En una realización preferida, el compuesto de fórmula IV se obtiene por reacción de un compuesto de fórmula II con un compuesto de fórmula III tal como se describe en la etapa a) del procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula I donde  $R^3$  y  $R^4$  son  $SO_3M$ .

En otra realización preferida, el ácido prótico de la etapa a'') es ácido *p*-toluensulfónico.

15 Sobre el compuesto de fórmula VII se lleva a cabo una reacción de sulfatación en la que tiene lugar al mismo tiempo la introducción del grupo sulfato en la posición C-3 y la hidrólisis del grupo acetal, conduciendo al compuesto de fórmula I, donde  $R^3$  es  $SO_3M$  y  $R^4$  es H. En otra realización preferida, el agente de sulfatación es  $SO_3$ -piridina.

20 Cualquiera de las tres variables de procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en esta solicitud de patente puede comprender la adición de una fuente de M para obtener el compuesto de fórmula I donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria. Preferiblemente, el procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I comprende la adición de NaOH o KOH, según M sea Na o K respectivamente, tras la etapa de sulfatación.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto de la presente invención.

25 Algunos ejemplos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención son sólidos tal como tabletas, píldoras, cápsulas o sólido granulado; o líquidos tal como disoluciones, siropes, suspensiones o emulsiones. Estas composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para la administración oral, nasal, tópica o parenteral.

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

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

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

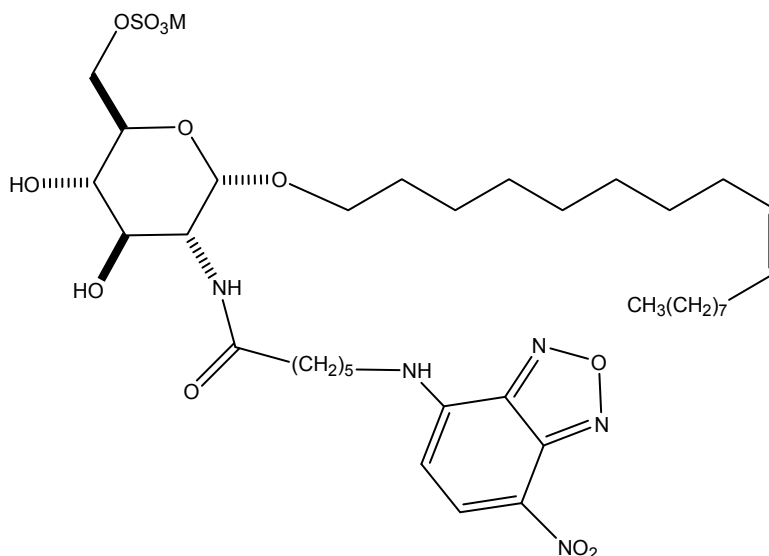
40 Las formulaciones anteriormente mencionadas pueden ser preparadas usando métodos convencionales, como los descritos en las Farmacopeas de diferentes países y en otros textos de referencia en el sector farmacéutico.

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

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

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

- 15 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un derivado marcado químicamente de fórmula VII, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria. Preferiblemente, M es potasio.

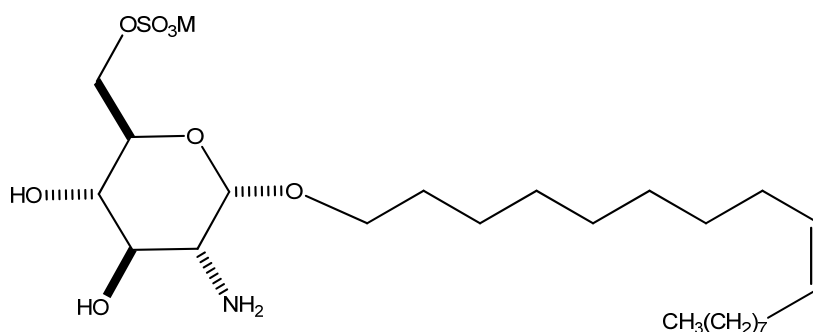


VIII

- 20 Con objeto de conocer la capacidad de internalización de los glicolípidos sulfatados sintéticos por células neurales, se preparó el compuesto fluorescente de fórmula VIII. Con el fin de comprobar si la actividad inhibitoria es modificada por la presencia del grupo fluorescente, se ensayo como inhibidor de la proliferación de células de microglia y astrogliá frente al análogo sin grupo fluorescente (Ver Fig. 3; Tabla 1 en Ejemplos), esto es, el compuesto de fórmula I donde R<sup>1</sup> es un resto de oleilo, R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> es H, y R<sup>4</sup> es SO<sub>3</sub>K. Posteriormente se observo que el compuesto fluorescente era internalizado por las células neurales (Ver Fig. 4 en Ejemplos).

- 25 En un sexto aspecto, la presente invención también se refiere a un método de obtención del compuesto de fórmula VIII tal como se ha describe en esta solicitud de patente, caracterizado porque comprende:

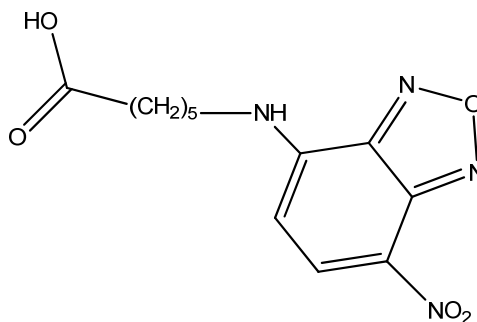
a) hidrolizar el compuesto de formula I donde R<sup>1</sup> es octadec-9-enilo, R<sup>2</sup> es trifluorometilo, R<sup>3</sup> es hidrógeno y R<sup>4</sup> es SO<sub>3</sub>M para obtener a un compuesto de formula IX;





(IX)

b) acilar el compuesto de formula IX con un compuesto de formula X para obtener el compuesto de fórmula VIII.



(X)

5 En una realización preferida, el compuesto de fórmula I hidrolizado en la etapa a) se obtiene por el procedimiento descrito en esta solicitud de patente.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula I se hidroliza con metanol-trietilamina-agua (4:1:0.5) para eliminar el grupo trifluoroacetilo.

10 El compuesto de fórmula X se puede obtener previamente a partir de NBD y un ácido tal como ácido 6-amino-hexanoico.

En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere a un reactivo de análisis que comprende el compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto, donde R<sup>2</sup> es metilo fluorado, o un compuesto de fórmula VIII tal como se describe en el quinto aspecto de la presente invención.

15 En caso de que se utilice el reactivo de análisis como agente de imagen en técnicas de análisis in-vivo, éste puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal u oral.

El reactivo de análisis adecuado para administrarse de forma parenteral puede ser una solución, una suspensión o un liofilizado del compuesto de la presente invención, empleando la dosis adecuada. Se pueden emplear excipientes adecuados, como agentes tamponadores del pH o surfactantes.

20 En un octavo aspecto, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto, donde R<sup>2</sup> es metilo fluorado, o un compuesto de fórmula VIII tal como se describe en el quinto aspecto de la presente solicitud de patente, para fabricar un reactivo de análisis para realizar ensayos biológicos.

25 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula VIII tal como se describe en el quinto aspecto, para fabricar un reactivo de análisis para realizar ensayos biológicos basados en la detección de fluorescencia, preferiblemente estudios de biodistribución.

El marcaje de un compuesto bioactivo con un grupo químico fluorescente es de gran utilidad en estudios de biodistribución basados en la detección de fluorescencia, ya que estos compuestos permiten la detección de modo sensible y cuantitativo del compuesto en tejidos, células y estructuras sub-celulares empleando microscopía de fluorescencia.

30 Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula VIII tal como se describe en el quinto aspecto, para realizar ensayos biológicos basados en la detección por fluorescencia.

Además, la presente invención también se refiere a un método para realizar ensayos biológicos basados en la detección por fluorescencia, donde dicho método comprende administrar un compuesto de fórmula VIII tal como se describe en el quinto aspecto

35 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula I tal como se describe en el segundo aspecto, donde R<sup>2</sup> es metilo fluorado, preferiblemente trifluorometilo, para fabricar un reactivo de análisis para realizar ensayos biológicos basados en la detección de flúor.

40 A modo de ejemplo, y sin que sirva de limitación, un ejemplo preferido de los ensayos biológicos en los que puede emplearse el compuesto de fórmula I, donde R<sup>2</sup> es trifluorometilo, pueden ser estudios de bio-distribución y metabolismo basados en la detección de <sup>19</sup>F por resonancia magnética nuclear.

Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un compuesto de fórmula I tal como se describe en este segundo aspecto, donde  $R^2$  es un metilo fluorado, para realizar ensayos biológicos basados en la detección de flúor. Preferiblemente  $R^2$  es trifluorometilo.

- 5 Además, la presente invención también se refiere a un método para realizar ensayos biológicos basados en la detección de flúor, donde dicho método comprende administrar un compuesto de fórmula I tal como se describe en este segundo aspecto de la invención, donde  $R^2$  es un metilo fluorado. Preferiblemente  $R^2$  es trifluorometilo.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS:**

Figura 1: Estimulación del exo-crecimiento neurítico de neuronas espinales por el compuesto IG-20, glicósido que se corresponde con el compuesto de fórmula I, donde  $R^1$  es oleilo,  $R^2$  es metilo,  $R^3$  es H y  $R^4$  es  $SO_3K$ .

- 10 Figura 2: El glicósido IG-20 promueve el crecimiento de oligodendrocitos y la expresión de mielina, mientras que inhibe la astrogliosis.

Figura 3: Los compuestos IG20, IG20-disulfato e IG20-NBD inhiben la proliferación de células de microglía y astrogliosis. Los compuestos IG20, IG20-disulfato e IG20-NBD corresponden, respectivamente, a los compuestos 3, 8 y 11 de los ejemplos de síntesis.

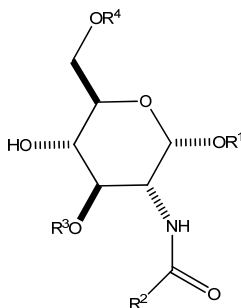
- 15 Figura 4: El glicósido IG-20 interactúa con la proteína RhoGDI $\alpha$  en el citosol de las células gliales.

**EJEMPLOS:**

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

Procedimiento general de preparación de los compuestos de fórmula I

- 20 A partir del monosacárido *N*-acetil-glucosamina o hidrocloreto de *D*-glucosamina, se han preparado derivados de fórmula general I:



(I)

donde

$R^1$  es un resto alqueno  $C_5-C_{25}$  que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles,

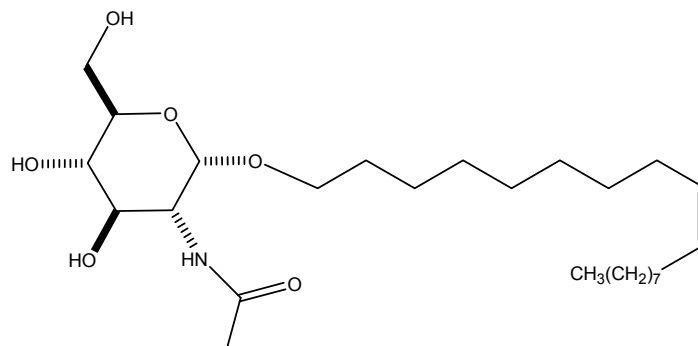
- 25  $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado, y

al menos uno de los sustituyentes  $R^3$  o  $R^4$  es un grupo  $SO_3M$ , donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, y el otro sustituyente, sino es un grupo  $SO_3M$ , se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y acilo.

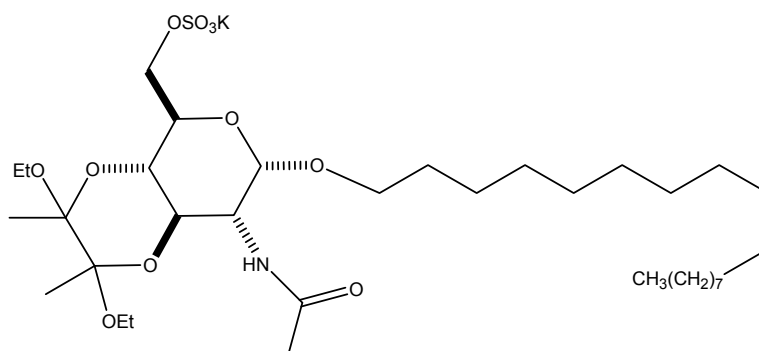
- 30 La preparación de los compuestos de fórmula I donde  $R^2$  es metilo comenzó con la reacción de *N*-acetil-glucosamina con un alcohol de cadena hidrocarbonada insaturada para dar el glicósido correspondiente. A partir de este glicósido, que presentaba tres grupos hidroxilo libres, se realizó la protección selectiva de dos hidroxilos, seguida del tratamiento con un agente de sulfatación y eliminación del grupo protector, dando lugar al compuesto de fórmula I, donde  $R^2$  es un metilo, y  $R^3$  o  $R^4$  es un grupo  $SO_3M$ .

Alternativamente, el tratamiento del glicósido con un agente de sulfatación permite obtener el compuesto de fórmula I, donde R<sup>2</sup> es un metilo, y R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son ambos un grupo SO<sub>3</sub>M.

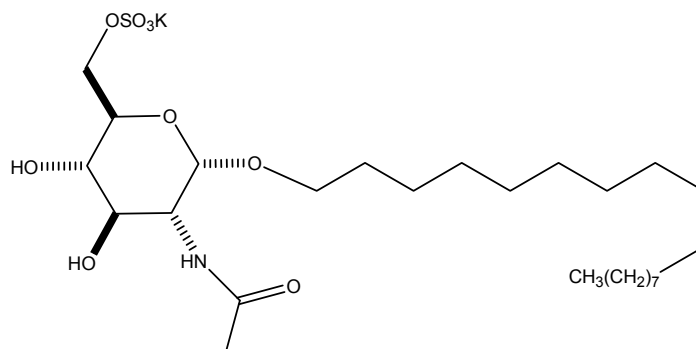
Preparación de oleil N-acetil- $\alpha$ -D-glucosaminido (1)



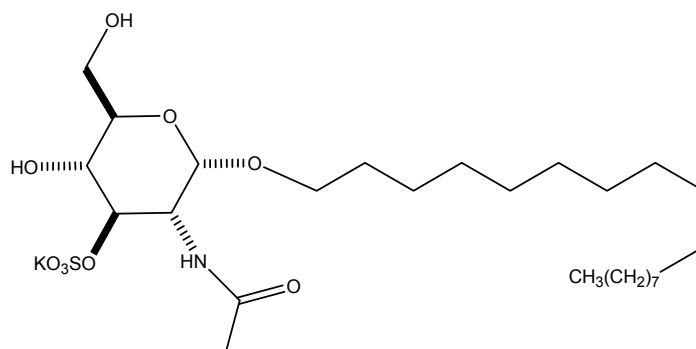
- 5 N-acetil-glucosamina (500 mg, 2.26 mmol) y alcohol oleico (85%) (4.1 mL, 11.3 mmol) se disolvieron en nitrometano (2 mL) bajo atmósfera de argón. A continuación se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adsorbido sobre sílice (50 mg) y la mezcla fue agitada durante 4 horas, a 100 °C. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el producto se aisló mediante una columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH 10:0→10:1), obteniéndose **1** puro (405 mg, 38%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +103.1° (c 0.95, MeOH). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.4-5.3 (m, 2H), 4.74 (d, 1H, J=3.5 Hz), 3.9-3.8 (m, 2H), 3.7-3.5 (m, 4H), 3.4-3.3 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 4H), 1.94 (s, 3H), 1.6-1.5 (m, 2H), 1.3-1.2 (m, 22H), 0.86 (t, 3H, J=7.2 Hz). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  172.41, 129.70, 129.66, 97.29, 72.55, 71.65, 71.22, 67.79, 61.56, 54.39, 32.07, 31.92-28.33, 27.00, 26.10, 23.7, 13.33. MS (ES) m/z (calcd 471.4): 472.4 (M+1), 473.4 (M+2). Anal. Calcd para C<sub>26</sub>H<sub>49</sub>NO<sub>6</sub>: C 66.21, H 10.47, N 2.97. Encontrado: C 65.99, H 10.31, N 2.84.
- 15 Previamente se había preparado el catalizador ácido H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> adsorbido sobre sílice (35%). Para ello, se resuspendieron 10 g de sílica gel (200-325 mesh) en éter etílico (50 mL) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (3 mL) fue añadido lentamente, gota a gota, con agitación. Durante el proceso de adsorción, 10 min, la suspensión se agitó suavemente a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente por destilación y la sílice se secó a presión reducida (2-4 mbar), calentando a 60 °C durante 3 h.
- 20 Preparación de la sal potásica del oleil N-acetil-3,4-O-(2,3-dietoxi-but-2,3-di-il)-6-O-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (2)



- Una solución de **1** (100 mg, 0.21 mmol) en etanol (1.5 mL) fue tratada con 2,3-butanodiona (41  $\mu$ L, 0.47 mmol), ácido canforsulfónico (10 mg, 0.04 mmol) y trietilortoformiato (0.23 mL, 1.4 mmol) bajo Ar. La mezcla se agitó a 60 °C durante 3.5 h. Después de enfriar, la mezcla fue neutralizada con trietilamina, concentrada y el producto de reacción purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano-AcOEt, 1:1 → 0:1), para dar un sólido (98 mg), que fue disuelto en piridina anhidra (5 mL). Se añadió el complejo SO<sub>3</sub>-piridina (509 mg, 3.20 mmol), agitando a temperatura ambiente, bajo Ar, durante 1 h. Pasado este tiempo, la mezcla fue concentrada y el residuo disuelto en metanol-H<sub>2</sub>O (2:1, 7 mL). Este residuo fue neutralizado con una disolución de KOH 0.5 M, concentrado y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol, 6:1), para dar **2** (95 mg, 61%). <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.4-5.3 (m, 2H), 4.83 (d, 1H, J=3.4 Hz), 4.6-4.4 (m, 2H), 4.3-3.4 (m, 8H), 2.2-2.0 (m, 7H), 1.6-1.2 (m, 36H), 1.0-0.9 (m, 3H).

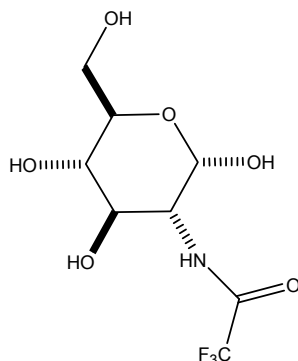
Preparación de la sal potásica del oleil *N*-acetil-6-*O*-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (**3**, IG-20)

El compuesto **2** (79 mg, 0.11 mmol) fue disuelto en una mezcla de ácido acético-H<sub>2</sub>O (2:1, 10 mL) y agitado durante 3 h, a 65 °C. La mezcla se concentró y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol, 5:1 → 4:1) para dar **3** (42 mg, 66%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +69.0° (c 1.18, MeOH). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.4-5.3 (m, 2H), 4.76 (d, 1H, *J*=3.4 Hz), 4.26 (dd, 1H, *J*=2.4 Hz, *J*=11.0 Hz), 4.18 (dd, 1H, *J*=5.6 Hz, *J*=10.7 Hz), 3.89 (dd, 1H, *J*=3.7 Hz, *J*=10.7 Hz), 3.8-3.6 (m, 4H), 3.4-3.3 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 7H), 1.6-1.5 (m, 2H), 1.3-1.2 (m, 22H), 0.90 (t, 3H, *J*=6.8 Hz). MS (ES) *m/z* (calcd 589.3): 590.3 (M+1). Anal. Calcd para C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>KNO<sub>9</sub>S: C 52.94, H 8.20, N 2.37, S 5.44. Encontrado: C 52.86, H 8.19, N 2.40, S 5.31.

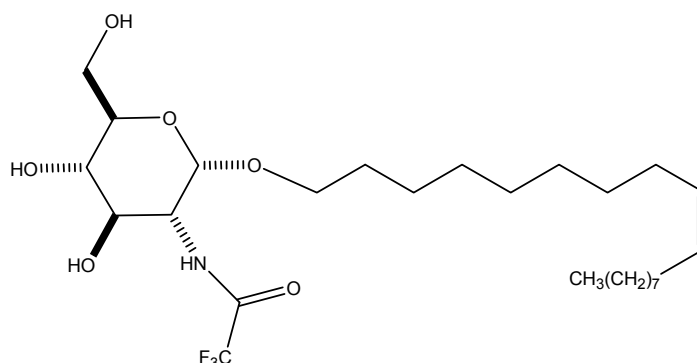
10 Preparación de la sal potásica del oleil *N*-acetil-3-*O*-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (**4**)

El compuesto **1** (76 mg, 0.16 mmol), disuelto en DMF anhidra (1 mL), fue tratado con 2,2-dimetoxipropano (0.18 mL, 0.8 mmol) y ácido *p*-toluensulfónico (4 mg). La mezcla fue agitada durante 2 h. a temperatura ambiente, tratado con trietilamina hasta pH neutro y concentrado a vacío. El residuo se disolvió en piridina anhidra (4.5 mL). A continuación se añadió el complejo SO<sub>3</sub>-piridina (0.5 g, 3.3 mmol), y se agitó a t.a. bajo Ar durante 1.5 h. Pasado este tiempo, la mezcla fue concentrada a vacío, el residuo disuelto en metanol-H<sub>2</sub>O (2:1, 2 mL), tratado con una solución de KOH 0.5 M hasta pH neutro y concentrado a vacío. El residuo se extrajo con metanol, se concentró a vacío y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-metanol, 6:1) para dar **4** (82.1 mg, 82%). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>: +39.4° (c 0.89, MeOH). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.4-5.3 (m, 2H), 4.48 (d, 1H, *J*=3.2 Hz), 4.48 (dd, 1H, *J*=10.7 Hz, *J*=11.0 Hz), 3.96 (dd, 1H, *J*=3.7 Hz, *J*=10.7 Hz), 3.8-3.5 (m, 4H), 3.4-3.3 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 7H), 1.6-1.5 (m, 2H), 1.3-1.2 (m, 22H), 0.90 (t, 3H, *J*=7.1 Hz). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  173.69, 130.84, 130.81, 98.32, 80.03, 73.64, 70.85, 69.15, 62.26, 54.10, 33.57, 33.02, 30.9-27.3, 23.70, 22.87, 14.46. MS (ES) *m/z* (calcd 589.3): 590.2 (M+1). Anal. Calcd para C<sub>26</sub>H<sub>48</sub>KNO<sub>9</sub>S: C 52.94, H 8.20, N 2.37, S 5.44. Encontrado: C 53.10, H 8.35, N 2.62, S 5.60.

La preparación de los compuestos de fórmula I donde R<sup>2</sup> es trifluorometilo comenzó por la reacción del hidrocloreto de D-glucosamina con *S*-etil tior trifluoroacetato, para dar lugar a *N*-trifluoroacetil-D-glucosamina como mezcla de anómeros. La reacción de glicosilación de la mezcla *N*-trifluoroacetil  $\alpha,\beta$ -D-glucosamina obtenida con un alcohol de cadena hidrocarbonada insaturada, dio lugar al *N*-trifluoroacetil glicósido correspondiente. A continuación se trató con un agente de sulfatación para obtener el compuesto de fórmula I, donde R<sup>2</sup> es trifluorometilo, al menos uno de los sustituyentes R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es un grupo SO<sub>3</sub>M, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, y el otro sustituyente, sino es un grupo SO<sub>3</sub>M, se selecciona del grupo hidrógeno y acilo.

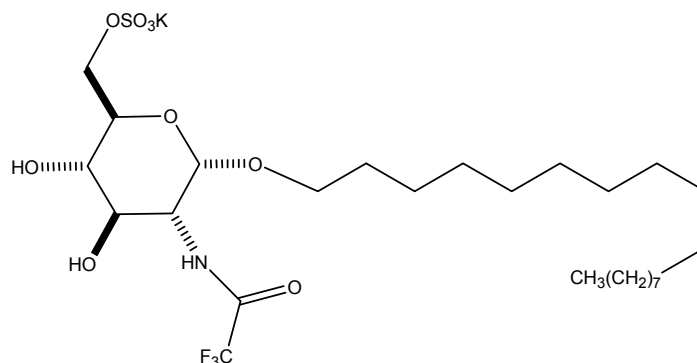
Preparación de *N*-trifluoroacetil- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-glucosamina (**5**)

Una suspensión de hidrocloreto de D-glucosamina (0.51 g, 2.32 mmol) en metanol anhidro (2.5 mL) fue tratada con un equivalente de metóxido sódico en metanol (53 mg de Na disueltos en 0.6 mL de metanol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una solución transparente, con un precipitado blanco de NaCl en el fondo. Se añadió trifluoroacetato de *S*-etililol (SETFA) (0.42 mL, 3.26 mmol) y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 17 h. (TLC: AcOEt-MeOH, 2:1). Pasado este tiempo, el disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo fue extraído con acetona caliente. Se añadió éter etílico al extracto de acetona a 0 °C y se dejó cristalizar a 4 °C durante 12 h. El compuesto cristalizado fue filtrado y lavado con acetona a 0 °C, para dar **5** como un sólido blanco. El compuesto **5** fue obtenido como una mezcla de anómeros, relación ( $\alpha/\beta$  7:3) (399 mg, 62%). Mp: 180-184 °C.  $[\alpha]_D^{25}$ : +54.6° (c 0.5, MeOH).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  5.15 (d, <1H,  $J=3.0$  Hz), 4.69 (d, <1H,  $J=8.3$ , Hz), 3.9-3.7 (m, 3H), 3.8-3.6 (m, <2H), 3.53 (dd, <1H,  $J=10.4$ , 8.4 Hz), 3.04 (dd, 1H,  $J=10.4$ , 3.6 Hz).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  159.2, 119.4, 96.3, 92.0, 78.2, 75.3, 73.2, 72.5, 72.2, 71.9, 62.8, 62.7, 59.1, 56.7. MS (ESI +)  $m/z$  (calcd 275.0623): 276.0696 (M+H) $^+$ , 543.3621 (M+NH $_4$ ) $^+$ . Anal. Calcd para  $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_6$ : C 34.92, H 4.40, N 5.09. Encontrado: C 35.00, H 4.15, N 4.52.

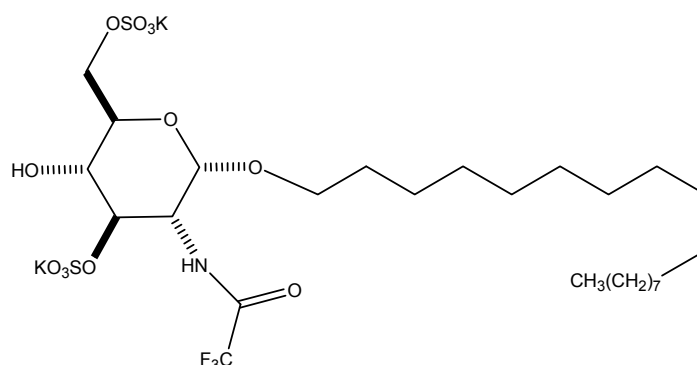
Preparación de oleil *N*-trifluoroacetil- $\alpha$ -D-glucosaminido (**6**)

El compuesto **5** (1.18 g, 4.29 mmol) fue disuelto en alcohol oleico al 85 % (8 mL, 21.4 mmol, 5 eq) y tratado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  adsorbido sobre sílice (35 %) (236 mg). La mezcla de reacción fue agitada bajo argón, a 180 °C, durante 20 min (TLC: AcOEt). Pasado este tiempo la mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y el residuo purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano-AcOEt 2:1  $\rightarrow$  0:1) para dar **6** como un sólido (604 mg, 29 %). Mp: 118-123 °C.  $[\alpha]_D^{25}$ : +86.0° (c 0.5, MeOH).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  5.4-5.3 (m, 2H), 4.86 (d, 1H,  $J=3.6$  Hz), 3.90 (dd, 1H,  $J=10.8$ , 3.6 Hz), 3.9-3.8 (m, 1H), 3.80 (t, 1H,  $J=1.9$  Hz), 3.8-3.7 (m, 2H), 3.60 (ddd, 1H,  $J=9.9$ , 5.5, 2.3 Hz), 3.5-3.3 (m, 2H), 2.1-1.9 (m, 4H), 1.8-1.5 (m, 2H), 1.5-1.1 (m, 22H), 0.90 (t, 3H,  $J=7.0$  Hz).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  159.2, (q,  $J=37.5$  Hz), 117.5 (q,  $J=287.6$  Hz), 130.8, 130.8, 97.7, 73.8, 72.3, 71.9, 68.98, 62.6, 56.2, 33.1, 30.9, 30.9, 30.6, 30.6, 30.6, 30.5, 30.5, 30.4, 30.3, 28.1, 28.1, 27.3, 23.8, 14.5. MS (ESI +)  $m/z$  (calcd 525.3283): 526.3345 (M+H) $^+$ , 543.3621 (M+NH $_4$ ) $^+$ . Anal. Calcd para  $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{F}_3\text{NO}_6$ : C 59.41, H 8.82, N 2.66. Encontrado: C 59.66, H 9.12, N 2.69.

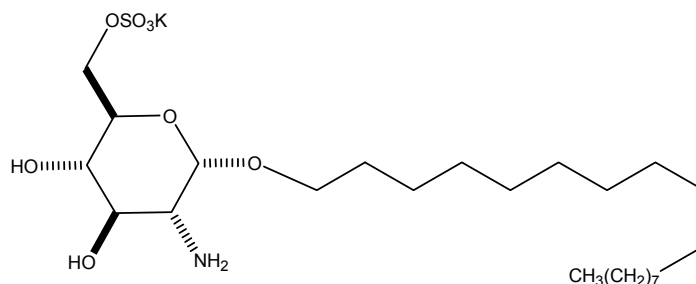
La preparación previa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  adsorbido sobre sílice tiene lugar de igual forma que para obtener el compuesto (**1**).

Preparación de la sal potásica del oleil *N*-trifluoroacetil-6-*O*-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (7)

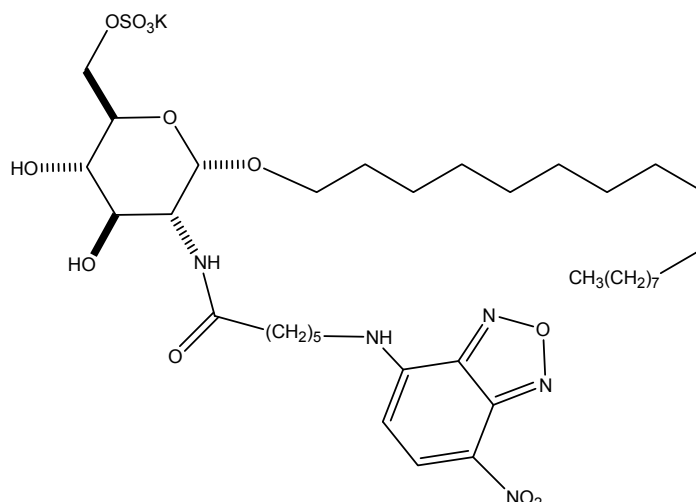
El compuesto **3** (458 mg, 0.87 mmol) fue disuelto en piridina anhidra (1 mL) y tratado con el complejo SO<sub>3</sub>-piridina (290 mg, 1.82 mmol). La mezcla de reacción fue agitada bajo argón, a temperatura ambiente, durante 1 h y 20 min. Pasado ese tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo fue disuelto en MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, 6 mL), neutralizado con una solución de KOH 0.5 M y concentrado a vacío. El residuo fue extraído con metanol, concentrado y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt/MeOH/Et<sub>3</sub>N 1:0:0.005 → 1:0.5:0.005) para dar **7**, como un sólido amarillo (360 mg, 64%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.42 – 5.27 (m, 2H), 4.91 (s, 1H), 4.27 (dd, *J* = 10.9, 2.2 Hz, 1H), 4.18 (dd, *J* = 10.9, 5.1 Hz, 1H), 3.90 (dd, *J* = 10.7, 3.5 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 8.1, 2.8 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 4.7, 2.5 Hz, 1H), 3.72 (dd, *J* = 8.2, 4.5 Hz, 1H), 3.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.41 – 3.34 (m, 2H), 2.03 (m, 4H), 1.57 (m, 2H), 1.46 – 1.11 (m, 22H), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  157.63, 129.42, 129.39, 96.19, 70.62, 70.45, 70.28, 67.66, 66.67, 54.73, 31.64, 29.49, 29.42, 29.38, 29.37, 29.33, 29.22, 29.20, 29.18, 29.17, 29.15, 29.02, 28.94, 28.90, 26.72, 26.69, 25.83, 22.31, 13.04. MS (ESI -) *m/z* (calcd 604.2771): 604.2778 (M)<sup>-</sup>.

15 Preparación de la sal di-potásica del oleil *N*-trifluoroacetil-3,6-*O*-di-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (8)

El compuesto **3** (458 mg, 0.87 mmol) fue disuelto en piridina anhidra (1 mL) y tratado con el complejo SO<sub>3</sub>-piridina (290 mg, 1.82 mmol). La mezcla de reacción fue agitada bajo argón, a temperatura ambiente, durante 1 h y 20 min. Pasado ese tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo fue disuelto en MeOH-H<sub>2</sub>O (2:1, 6 mL), neutralizado con una solución de KOH 0.5 M y concentrado a vacío. El residuo fue extraído con metanol, concentrado y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt/MeOH/Et<sub>3</sub>N 1:0:0.005 → 1:0.5:0.005) para dar **8** como un sólido (125 mg, 19 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  5.42 – 5.29 (m, 2H), 5.11 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.59 (dd, *J* = 10.8, 8.9 Hz, 1H), 4.30 (dd, *J* = 10.8, 2.0 Hz, 1H), 4.19 (dd, *J* = 10.8, 5.4 Hz, 1H), 3.91 (dd, *J* = 5.1, 2.7 Hz, 1H), 3.89 – 3.84 (m, 1H), 3.76 (dt, *J* = 9.9, 6.1 Hz, 1H), 3.66 – 3.58 (m, 1H), 3.40 (dt, *J* = 10.0, 6.4 Hz, 1H), 2.03 (d, *J* = 5.5 Hz, 4H), 1.57 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 1.35 – 1.25 (m, 22H), 0.90 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  174.06, 131.37, 131.33, 98.62, 80.09, 72.30, 71.34, 69.66, 68.58, 54.70, 33.53, 31.38, 31.29, 31.19, 31.07, 30.92, 30.86, 30.78, 28.64, 28.58, 27.77, 24.21, 23.30, 14.97. MS (ESI -) *m/z* (calcd. 684.2351): 684.2383 (M)<sup>-</sup>, 341.6207 (M)<sup>2-</sup>.

Preparación de la sal potásica del oleil 6-O-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (9)

Se disolvió **7** (100 mg, 0.16 mmol) en metanol-trietilamina-agua 4:1:0.5 (1 mL) y se agitó a 50 °C durante 48 h. Pasado este tiempo, la mezcla se concentró a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt-MeOH-Et<sub>3</sub>N 5:1:0.005 → 0:1:0.005) para dar **9** (60 mg, 71 %) como un sólido blanco. R<sub>f</sub>: 0.23 (AcOEt-MeOH 2:1). [α]<sub>D</sub>: +36° (c 8.6, MeOH). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 5.4-5.3 (m, 2H), 4.93 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 10.9, 2.1 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 11.0, 4.9 Hz, 1H), 3.78 – 3.74 (m, 1H), 3.73 – 3.69 (m, 1H), 3.66 (dd, J = 10.3, 9.0 Hz, 1H), 3.52 – 3.42 (m, 1H), 3.42 – 3.35 (m, 1H), 3.04 – 2.96 (m, 1H), 2.08 – 1.92 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 1.42 – 1.19 (m, 22H), 0.88 (t, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 130.83, 111.19, 97.52, 72.21, 71.41, 69.41, 67.74, 55.98, 33.07, 30.93, 30.84, 30.80, 30.77, 30.68, 30.65, 30.61, 30.53, 30.45, 30.41, 30.33, 28.17, 23.74, 14.46. HRMS (ESI +) m/z (calcd. 508.29 para C<sub>24</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>7</sub>S): 510.3065 (M-2H)<sup>+</sup>, 532.2763 (M-K-H)<sup>+</sup>.

Preparación de la sal potásica del oleil 2-[6-(7-nitrobenzofurazan)-amino]hexanamida]-6-O-(oxo-sulfonil)- $\alpha$ -D-glucosaminido (11).

Se disolvió **9** (90.2 mg, 0.16 mmol) en THF anhidro (2 mL) y se trató con el ácido **10** (72.5 mg, 0.25 mmol), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (47.2 mg, 0.25 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (10.0 mg, 0.08 mmol). La mezcla de reacción se agitó bajo argón a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este tiempo, el disolvente se eliminó a vacío y el residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-Et<sub>3</sub>N, 1:0:0.005 → 0:1:0.005) para dar **11** como un sólido blanco (95 mg, 70%). R<sub>f</sub> = 0.31 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 4:1). [α]<sub>D</sub>: + 39.4° (c 11.3, MeOH). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 8.51 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 5.30 (m, 2H), 4.77 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.26 (dd, J = 10.7, 2.0 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 10.8, 5.3 Hz, 1H), 3.89 (dd, J = 10.8, 3.6 Hz, 1H), 3.81 – 3.72 (m, 1H), 3.71 – 3.68 (m, 1H), 3.65 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 3.53 (s, 2H), 3.42 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.39 – 3.33 (m, 1H), 2.29 (t, 2H), 1.98 (s, 4H), 1.87 – 1.76 (m, 2H), 1.70 (dd, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.28 (m, 22H), 0.89 (t, 3H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 175.07, 144.54, 144.48, 137.53, 130.28, 130.20, 129.61, 97.15, 71.28, 70.98, 70.65, 67.81, 67.04, 35.55, 32.43, 31.88, 31.06, 29.94, 28.86, 28.14, 27.49, 26.95, 26.37, 26.28 26.18, 22.56, 13.30. HRMS (ESI-) m/z (calcd 784.371 for C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>S): 784.3716 (M)<sup>-</sup>.

Ensayos relativos a la actividad terapéutica de los compuestos de la presente invención

Se diseccionaron ganglios espinales (GE) de embriones de rata (E15) y se incubaron por 12h sobre células promotoras del crecimiento axonal (aldainoglia) para permitir la adhesión celular de las neuronas contenidas en el GE al sustrato de aldainoglia. Posteriormente se añadieron diferentes concentraciones de IG-20, compuesto **3** obtenido tal como se describe en los ejemplos de síntesis. Los co-cultivos de GE/aldainoglia se fijaron después de 3 días de incubación, lo que reveló la presencia de axones, dendritas y somas de las neuronas por anticuerpo anti-neurofilamento (Fig. 1d, 1e, 1f). La presencia de células totales son mostradas por la señal fluorescente de los núcleos marcados con Hoechst (Fig. 1a, 1b, 1c). Los núcleos alejados del cuerpo central corresponden a

células de aldainoglia o aquellas que migran desde el GE. Las imágenes para neurofilamento fueron extraídas (Fig. 1g, 1h, 1i), se midió y comparó el área de crecimiento neurítico con los controles (Fig. 1j, 1k). Como resultado se observó un profuso y significativo incremento del exo-crecimiento neurítico a 5  $\mu\text{M}$  de IG-20 (Fig. 1e, 1h), al compararlo con el crecimiento promovido por la aldainoglia control (Fig. 1d, 1g). Un aumento de 5 veces esta concentración redujo este exo-crecimiento neurítico (Fig. 1f, 1j). Se obtuvo una ampliación neta en el área de crecimiento neurítico de 1250  $\mu\text{m}^2$  por encima del control con células de aldainoglia (Fig. 1k). La velocidad promedio de exo-crecimiento neurítico en presencia de aldainoglia, 625  $\mu\text{m}/72\text{h}$  correspondiendo a 8,3  $\mu\text{m}/\text{h}$ , fue duplicada en presencia de IG-20 (5  $\mu\text{M}$ ) hasta 1250  $\mu\text{m}/72\text{h}$ , lo que corresponde a 17,36  $\mu\text{m}/\text{h}$ . Las barras de calibración a 500  $\mu\text{m}$ ; (\*) corresponden a  $P < 0.05$  ( $P = 0.019$ ).

Para estudiar como afecta el compuesto de fórmula I al crecimiento de oligodendroitos, a la expresión de la mielina y la inhibición de la astroglia, cortezas cerebrales de ratas postnatales P0-P1 fueron diseccionadas y disgregadas enzimáticamente para cultivo celular. Después de 2 semanas de incubación los frascos de cultivo fueron agitados durante 12 horas. Las células en suspensión fueron cosechadas, se descartó la microglia, y posteriormente se cultivo en DMEM más SBF 10%. Se incubó por 6 h para facilitar la adhesión celular y se añadió el IG-20 (30  $\mu\text{M}$ ) al grupo tratado, las células fueron cultivadas por 2 semanas, siendo renovado el medio cada 3 días. Finalmente las células se fijaron para inmunocitoquímica y se reveló con anticuerpo para: GFAP, MBP; mientras que lo núcleos fueron detectados por Hoechst.

El tratamiento disminuyó en un 20% la proporción de células GFAP+, que corresponden a astroglia, mientras que incremento en un 10% la oligodendroglia madura, MBP+ (Fig. 2d). Se observó una dramática disminución del marcaje para GFAP, en comparación al grupo control no tratado, lo que contrasta con el incremento de la señal para MBP (Fig. 2e, f). En ambos casos las diferencias fueron muy significativas. Es notable el gran tamaño de las células de astroglia con relación a los oligodendrocitos, que son escasamente detectables en los controles no tratados (flecha en 2a, b). Los cultivos tratados con IG-20 revelaron oligodendrocitos con una talla 3-4 veces superior a los controles (flecha en 2c) y una profusa arborización, junto con expresión de GFAP significativamente menor. GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*; MBP, *Mielin Basic Protein*; barras de calibración a 75  $\mu\text{m}$  (a, c) y 25  $\mu\text{m}$  (b), según se muestra; (\*\*\*) corresponde a  $P < 0.001$ .

Para estudiar la proliferación de células de microglia y astroglia se utilizaron dos líneas celulares de microglia murina (BV-2, N13); así como astroblastos primarios aislados de cortezas cerebrales de ratas postnatales en día cero (P0). Las células fueron mantenidas en DMEM más SBF 10%, crecidas y tratadas para ensayo de inhibición de la proliferación celular, como publicamos anteriormente (I. Garcia-Alvarez *et al.*, *J Med Chem* **50**, 364 (Jan 25, 2007)). En ambas líneas de microglia observamos una inhibición efectiva de la proliferación por el IG-20, con una IC<sub>50</sub> de 21.0 y 3.4  $\mu\text{M}$  para células BV-2 y N13, respectivamente (Fig 3A, 3B). También observamos inhibición efectiva de microglia y astrocitos (Fig 3C, 3D) a 7.8 y 11.4  $\mu\text{M}$  para el IG-20 conjugado con el grupo fluorescente NBD; así como para el derivado del IG-20 con 2 grupos sulfatos y donde R<sup>2</sup> es trifluorometilo (IG-20 Disulfato). Concluimos que la actividad inhibitoria del IG20-NBD no se afecta por la presencia del grupo fluorescente, siendo su IC<sub>50</sub> muy similar a la obtenida para glicósido IG-20 no conjugado, que fue utilizado como control en estos ensayos. Sin embargo, el derivado IG-20 disulfato disminuyó 3 veces su actividad versus IG-20 en astrocitos, a una concentración de 30  $\mu\text{M}$  vs 9.3  $\mu\text{M}$  respectivamente, aunque la inhibición de microglia no se vio afectada (Tabla 1).

Tabla 1: Inhibición de microglia y astrocitos por glicósidos

Células	Tipo, especie	Glicósido	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) *
BV-2	Microglia, ratón	IG-20	21 $\pm$ 3.7
N13	Microglia, ratón	IG-20	3.4 $\pm$ 0.1
N13	Microglia, ratón	IG20-NBD	7.8 $\pm$ 0.6
N13	Microglia, ratón	IG-20 Disulfato	3.0 $\pm$ 0.8
Astrocitos	Astroglia, rata	IG-20	9.3 $\pm$ 0.7
Astrocitos	Astroglia, rata	IG20-NBD	11.4 $\pm$ 0.7
Astrocitos	Astroglia, rata	IG-20 Disulfato	30.0 $\pm$ 4.8

(\*) IC<sub>50</sub>  $\pm$  SE



Células de astrocitos primarios y de microglía (BV-2) fueron tratadas con el glicosido IG-20 a 30  $\mu$ M, lisadas y sometidas a centrifugación diferencial para fraccionamiento celular. Se recogió la fracción soluble y se mezcló con tampón de lisis (1:1). Se añadió anticuerpo anti-RhoGDI $\alpha$  (15  $\mu$ g) y se incubó en rotación a 4°C toda la noche. Se inmunoprecipitó con Proteína A-Sepharose (20 $\mu$ l) lavada previamente con PBS y se centrifugó 3 minutos a 1100 rpm. Se añadió a la Proteína A-Sepharose la mezcla anterior (1:1). Esta mezcla fue incubada en rotación a 4°C una hora y media, y después centrifugada 5 minutos a 2500 rpm a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, el precipitado se lavó tres veces con tampón de lisis. Se eluyó el inmunocomplejo de la Proteína A-Sepharose con 5 volúmenes del tampón de elución (0,1 M de Glicina, pH=2,9) y un volumen de 1 M tris-HCl, pH=9 para neutralización. La mezcla se centrifugó 5 minutos a 2500 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante. La muestra inmunoprecipitada con anti-RhoGDI $\alpha$ , se dividió para su análisis por *Western blot* y se envió al servicio de espectrometría de masas del Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo.

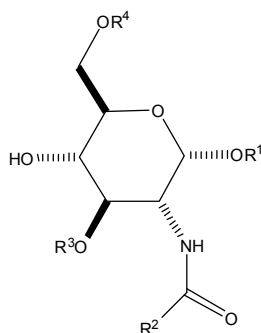
En las figuras 4a y 4b se muestra que el glicósido IG20-NBD penetra en las células gliales, acumulándose en el citosol de astrocitos y de células de microglia. No se observó señal de co-localización en el núcleo en ninguno de los dos tipos celulares ensayados. Las zonas de fluorescencia son muy débiles en los límites de las células primarias (Fig. 4a), descendiendo la señal del IG20-NBD hacia la membrana celular. Sin embargo en las zonas intracelulares (Fig 4a, b) se destacan acúmulos o zonas punteadas de IG20-NBD de diferente tamaño que forman agregados en el interior de las células de astrocitos y microglia.

Adicionalmente, las figuras 4c y 4d muestran que el glicósido IG20 interacciona directamente con la proteína RhoGDI $\alpha$ , tanto en astrocitos (Fig 4c), como en microglia (Fig 4d). Esto se verificó por inmunoprecipitación para RhoGDI $\alpha$  en la línea celular de microglía BV-2, así como en cultivos primarios de astrocitos. Los cultivos fueron incubados con 30 $\mu$ M del glicósido IG-20, utilizando como control células no tratadas. Cada muestra inmunoprecipitada fue dividida para ser analizada por *Western Blotting* (WB) y Espectrometría de Masas (EM). Observamos en las células control (-) y tratadas (+) una señal de 27kDa, correspondiente a RhoGDI $\alpha$ , revelada con un anticuerpo monoclonal específico para los ensayos de WBs. Sin embargo solo las preparaciones de células, astrocitos o BV-2, bajo tratamiento con IG-20 (+) co-immunoprecipitaron con el glicolípido sulfatado. Este fue detectado por EM como un pico de relación masa/carga = 550 (Fig. 4c, 4d), correspondiente al glicósido sintético. Las fracciones citoplasmáticas estuvieron enriquecidas en el compuesto IG-20, que fue débilmente detectado en las fracciones de membrana ensayadas (dato no mostrado). Esta co-immunoprecipitación del glicósido IG-20 y RhoGDI $\alpha$  con el anticuerpo específico anti-RhoGDI $\alpha$ , evidencia una interacción directa de ambas moléculas en el citosol.

Los resultados descritos en la figura 4 indican que el glicolípido sulfatado IG-20 se une a la proteína RhoGDI $\alpha$  en el citosol de las células gliales. Este glicolípido sulfatado podría entonces alterar el componente final de la vía de señalización BDNF/TrkB-T1/RhoGDI $\alpha$ , la cual opera de manera muy marcada en microglía y astrogliá [20-22]. Así mismo, demostramos que el exo-crecimiento neurítico y la mielinización (Figs.1, 2) fueron promovidos por el compuesto IG-20, que inhibió la proliferación de microglia y astrogliá (Fig. 3 y Tabla 1), disminuyendo la señal de GFAP y el tamaño de los astrocitos (Fig. 2).

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula I



(I)

5 donde

R<sup>1</sup> es un resto alqueno C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles,

R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado, y

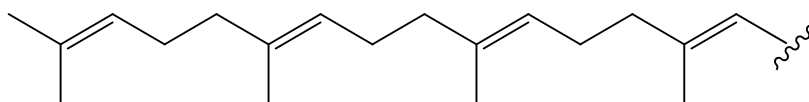
al menos uno de los sustituyentes R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es un grupo SO<sub>3</sub>M, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, y el otro sustituyente, sino es un grupo SO<sub>3</sub>M, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y acilo;

para fabricar un medicamento para tratar patologías del sistema nervioso central en las que están implicadas las células gliales y las RhoGTPasas.

2. Uso de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 1, donde las patologías del sistema nervioso central están seleccionadas del grupo que consiste en lesión por trauma del SNC, enfermedad des-mielinizante, enfermedad neuro-inflamatoria y trastorno mental causado por bajo nivel de BDNF.

3. Uso de un compuesto de fórmula I según la reivindicación 2, para fabricar un medicamento para tratar una lesión por trauma del SNC.

4. Uso de un compuesto de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y un grupo geranilgeranilo de fórmula:



20

5. Uso de un compuesto de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son ambos SO<sub>3</sub>M, donde M es un metal alcalino y se selecciona del grupo que consiste en sodio y potasio.

6. Compuesto de fórmula I, caracterizado porque

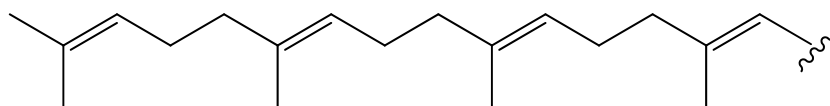
25 R<sup>1</sup> es un resto alqueno C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles,

R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado, y

al menos uno de los sustituyentes R<sup>3</sup> o R<sup>4</sup> es un grupo SO<sub>3</sub>M, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, y el otro sustituyente, sino es un grupo SO<sub>3</sub>M, se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno y acilo;

30 siempre que cuando R<sup>2</sup> es metilo, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son grupos SO<sub>3</sub>M.

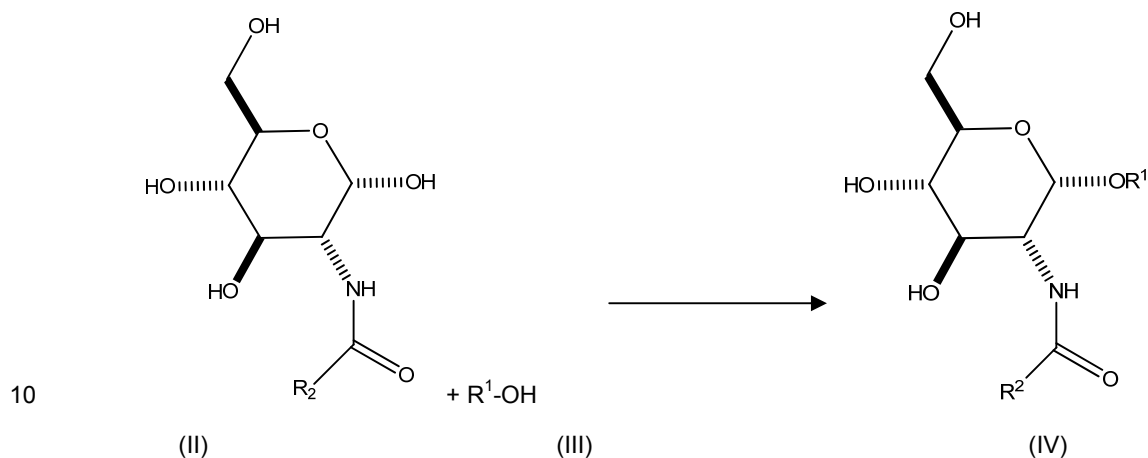
7. Compuesto de fórmula I según la reivindicación 6, donde R<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en octadec-9-enilo y geranilgeranilo de fórmula:



8. Compuesto de fórmula I según una cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde  $R^2$  es un grupo trifluorometilo.

5 9. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde  $R^3$  y  $R^4$  son  $SO_3M$  y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, caracterizado porque comprende:

a) reacción de un compuesto de fórmula II con un alcohol de fórmula III en presencia de un ácido para obtener un compuesto de fórmula IV,



donde

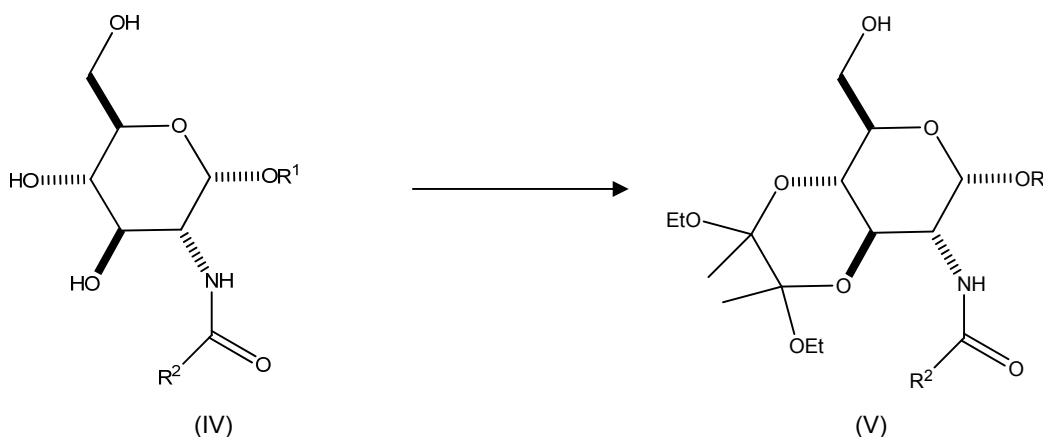
$R^1$  es un resto alquenilo  $C_5-C_{25}$  que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y

$R^2$  se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado; y

15 b) tratar el compuesto IV con un agente de sulfatación para obtener el compuesto de fórmula I donde  $R^3$  y  $R^4$  son  $SO_3M$ .

10. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde  $R^3$  es hidrógeno,  $R^4$  es  $SO_3M$  y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, caracterizado porque comprende:

20 a) reacción de un compuesto de fórmula IV con 2,3-butanodiona y etanol, en presencia de un ácido prótico para obtener un compuesto de fórmula V,

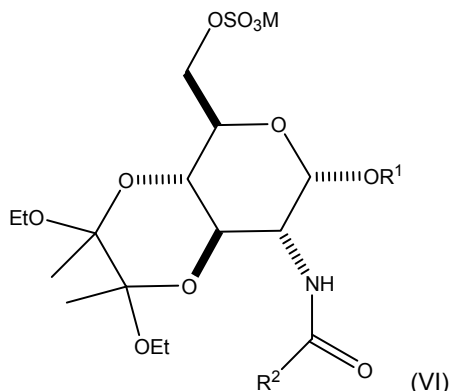


donde

R<sup>1</sup> es un resto alquenilo C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y

R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado;

b') tratar el compuesto V con un agente de sulfatación para obtener el compuesto de fórmula VI; e

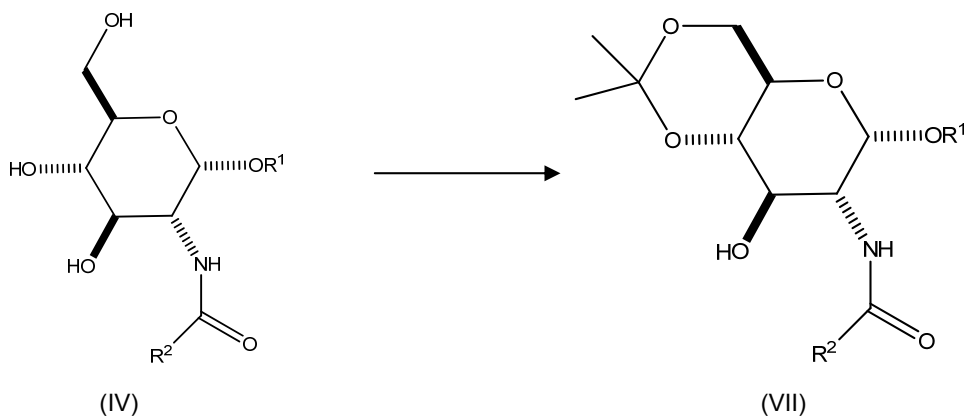


5

c') hidrolizar el compuesto VI para obtener el compuesto de fórmula I donde R<sup>3</sup> es hidrógeno y R<sup>4</sup> es SO<sub>3</sub>M.

11. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde R<sup>3</sup> es SO<sub>3</sub>M, R<sup>4</sup> es hidrógeno y M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria, caracterizado porque comprende:

10 a'') reacción de un compuesto de fórmula IV con 2,2-dimetoxipropano en presencia de un ácido prótico para obtener un compuesto de fórmula VII;



15 donde

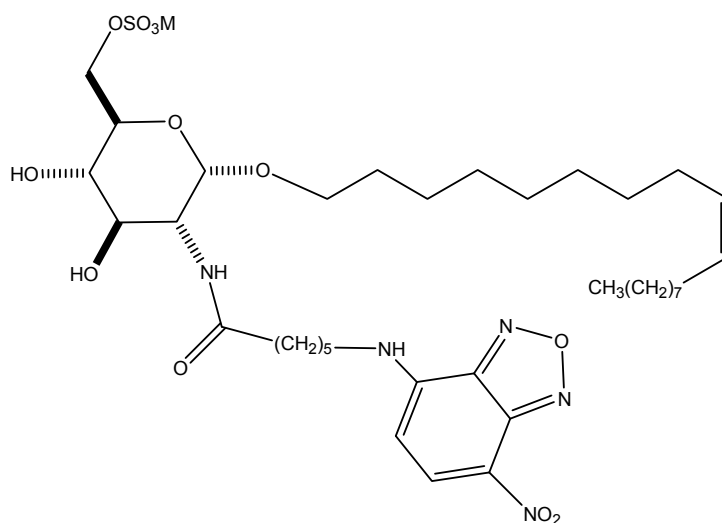
R<sup>1</sup> es un resto alquenilo C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> que contiene uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y

R<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en metilo y metilo fluorado;

b'') tratar el compuesto VII con un agente de sulfatación e hidrolizar el grupo acetal para obtener el compuesto de fórmula I donde R<sup>3</sup> es SO<sub>3</sub>M y R<sup>4</sup> es hidrógeno.

20 12. Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

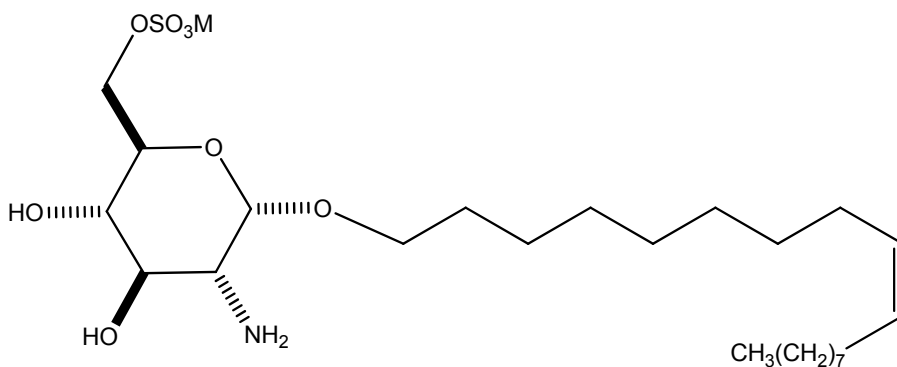
13. Derivado marcado químicamente de fórmula VIII, donde M se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metal alcalino, amonio y amina cuaternaria.



VIII

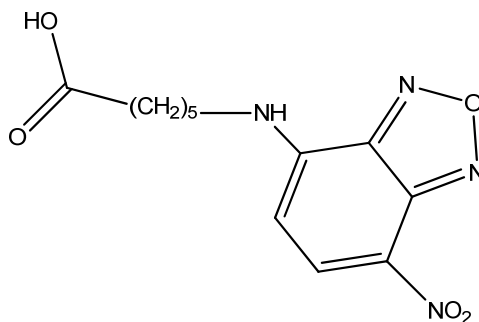
14. Método de obtención de un compuesto de fórmula VIII, caracterizado porque comprende:

- 5 a) hidrolizar el compuesto de fórmula I donde R<sup>1</sup> es octadec-9-enilo, R<sup>2</sup> es trifluorometilo, R<sup>3</sup> es hidrógeno y R<sup>4</sup> es SO<sub>3</sub>M para obtener a un compuesto de fórmula IX;



(IX)

b) acilar el compuesto de fórmula IX con un compuesto de fórmula X para obtener el compuesto de fórmula VIII.



(X)

10

15. Reactivo de análisis que comprende un compuesto de fórmula I tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde R<sup>2</sup> es un metilo fluorado, o un compuesto de fórmula VIII tal como se describe en la reivindicación 13.

- 15 16. Uso del compuesto de fórmula VIII tal como se describe en la reivindicación 13, para fabricar un reactivo de análisis para realizar ensayos biológicos basados en la detección de fluorescencia.

17. Uso del compuesto de fórmula I tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 donde  $R^2$  es un metilo fluorado, para fabricar un reactivo de análisis para realizar ensayos biológicos basados en la detección de flúor.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201231045

②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.2012

③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ <sup>1</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCÍA-ÁLVAREZ, I. et al. "Design and Synthesis of Glycoside Inhibitors of Glioma and Melanoma Growth". Journal of Medicinal Chemistry 2007, Volumen 50, Número 2, páginas 364-373. [Disponible en línea el 22.12.2006]. Ver página 364, resumen; página 367, tabla 1; página 366, esquema 5.	1,6,10-12
A	EP 1541580 A1 (SEIKAGAKU CORPORATION) 15.06.2005, párrafos [0001],[0010],[0011],[0025],[0026],[0031]-[0033],[0036]-[0042].	1-12
A	CARVALHO DE SOUZA, A. "Synthesis of Gold Glyconanoparticles: Possible Probes for the Exploration Carbohydrate-Mediated Self-Recognition of Marine Sponge Cells". European Journal of Organic Chemistry 2004, Número 21, páginas 3423-4339. Ver página 4323, resumen; página 4326, esquema 3, compuesto 21.	6-11,13,14
A	VAUZEILLES, B. "A one-step $\beta$ -selective glycosilation of <i>N</i> -acetyl glucosamine and recombinant chitooligosaccharides". Tetrahedron Letters 2001, Volumen 42, Número 43, páginas 7567-7570. Ver página 7568, columna 1, párrafo 3; compuesto 7.	6-11,13,14

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.10.2013

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D309/14** (2006.01)

**C07D413/12** (2006.01)

**A61K31/351** (2006.01)

**A61P25/00** (2006.01)

**G01N21/64** (2006.01)

**G01N24/08** (2006.01)

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

C07D, A61K, A61P, G01N

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

EPODOC, INVENES, WPI, TXTE, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP, NPL, CHEMSPIDER, PUBCHEM



Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.10.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-5, 7-9, 13-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 6, 10-12	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-5, 7-9, 13-17	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 6, 10-12	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCÍA-ÁLVAREZ, I. et al. Journal of Medicinal Chemistry 2007, Vol. 50, Nº 2, pp. 364-373.	22.12.2006

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

El objeto de la invención es el **uso** de un compuesto de fórmula general **I** para fabricar un medicamento para tratar patologías del sistema nervioso central en las que están implicadas las células gliales y las RhoGTPasas; el **compuesto** de fórmula general **I**; un **procedimiento** para la obtención de dicho compuesto **I** cuando posee dos grupos sulfato ( $R^3=R^4=SO_3M$ ); un procedimiento para la obtención de **I** cuando cuenta con un solo grupo sulfato ( $R^4=SO_3M$ ); un procedimiento para la obtención de **I** cuando  $R^3=SO_3M$ ; una **composición farmacéutica** que comprende un compuesto de fórmula **I**; un **derivado marcado** químicamente de fórmula **VIII**); un procedimiento para la obtención de **VIII**; un **reactivo de análisis** que comprende un compuesto de compuesto de fórmula **I** ó un compuesto de fórmula **VIII**; el **uso** de **VIII** para fabricar un reactivo de análisis; y el **uso** de **I** para fabricar un reactivo de análisis.

El documento D01 divulga una serie de derivados de N-acetilglucosamina que presentan actividad antimitótica y antitumoral en líneas celulares de glioma y, por tanto, inhiben el crecimiento de tumores neurales (ver página 364, resumen). En concreto, en el documento se recogen los compuestos sulfatados **42** y **51**, que se incluyen dentro de la fórmula general **I** de la solicitud, cuando en dicha fórmula general  $R^1$  es  $(CH_2)_8CH=CH(CH_2)_7CH_3$ ,  $R^2$  es  $CH_3$ ,  $R^3$  es  $SO_3K$  en **42** y  $H$  en **51**,  $R^4$  es  $H$  en **42** y  $SO_3K$  en **51** (ver página 367, tabla 1), así como un procedimiento para su preparación por sulfatación del compuesto **12** (compuesto **IV** de la invención), previa protección de los grupos hidroxilo que no se desea sulfatar (ver página 366, esquema 5). De esta forma, la reacción de **12** con 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido *p*-toluensulfónico da lugar al compuesto protegido **38** (compuesto **VII** de la solicitud; etapa *a*'') del procedimiento de la invención), que se somete a sulfatación con el complejo  $SO_3$ -piridina e hidrólisis, lo que proporciona el producto final **42** (etapa *b*''). Del mismo modo, el tratamiento de **12** con 2,3-butanodiona en medio ácido da lugar al derivado **45** (compuesto **V** de la solicitud; etapa *a*') del procedimiento de la invención), que tras sulfatación se transforma en el producto sulfatado **48** (etapa *b*''), cuya hidrólisis da lugar al producto final **51** (etapa *c*'').

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1**, **6**, **10-12** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01 (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes 11/1986).

Sin embargo, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones dependientes **2-5**, que recogen determinados aspectos del uso de un compuesto de fórmula **I** para la preparación de un medicamento, relativos tanto a las patologías concretas de aplicación, como a la naturaleza de los radicales  $R^1$ - $R^3$  del compuesto **I**, ni **7** y **8**, relativas a los compuestos de fórmula **I** que tienen determinados radicales  $R^1$  y  $R^2$ .

Del mismo modo, tampoco se ha encontrado divulgación ni sugerencia en el estado de la técnica que pudiera conducir hacia un procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula **I** en el que  $R^3$  y  $R^4$  son grupos  $SO_3M$  (reivindicación independiente **9**), a un derivado marcado químicamente de fórmula **VIII** y un procedimiento para su obtención (reivindicaciones independientes **13** y **14**), un reactivo de análisis que comprende un compuesto de fórmula **I** ó un compuesto de fórmula **VIII** (reivindicación independiente **15**), el uso de **VIII** para fabricar un reactivo de análisis y el uso de **I** para fabricar un reactivo de análisis (reivindicaciones independientes **16** y **17**).

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **2-5**, **7-9**, **13-17** reúne, respecto al estado de la técnica, los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.