



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 345 377**

② Número de solicitud: 200900755

⑤ Int. Cl.:
C07C 233/36 (2006.01)
C07H 5/04 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **20.03.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
21.09.2010

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 51 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Barcelona (Titular al 34 %) y
Universidad de Barcelona (Titular al 15%)

⑱ Inventor/es: **Llebaria Soldevilla, Amadeo;**
Bedia Gurbés, Carmen;
Harrak Serifi, Youssef;
Castaño García, Ángel Raúl;
Barra Quaglia, Carolina Mercedes y
Delgado Cirilo, Antonio

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉔ Título: **Compuestos aminociclitoles, procedimiento de obtención y usos.**

㉖ Resumen:

Compuestos aminociclitoles, procedimiento de obtención y usos.

Compuestos aminociclitoles y sus usos como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas con alteraciones en las células iNKT, más concretamente a enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones causadas por microorganismos patógenos o enfermedades inflamatorias. Además, la invención se refiere al procedimiento de obtención de dichos compuestos.

ES 2 345 377 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos aminociclitolos, procedimiento de obtención y usos.

5 La presente invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) y a sus usos como composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas con alteraciones en las células iNKT. Además, la invención se refiere al procedimiento de obtención de dichos compuestos. Por tanto, la invención se puede englobar en el campo químico y/o farmacéutico.

10 **Estado de la técnica anterior**

Las células T asesinas naturales NKT (del inglés natural killer T cells) son una clase de linfocitos que regula una amplia gama de respuestas inmunes. Una subclase de células NKT, las células NKT invariantes (iNKT), reconocen 15 antígenos de tipo glicolípido presentados por proteínas MHC CD1d y que participan en diversas respuestas inmunes mediante la promoción de la secreción de citoquinas. El papel de estas células ha sido descrito en la regulación de la autoinmunidad, la respuesta a los tumores, las infecciones microbianas y la patogenia de procesos inflamatorios como el asma.

20 El glicolípido sintético α -galactosilceramida (α -GalCer) fue el primer antígeno conocido presentado por CD1d que estimula el receptor de células T invariante (TCR), expresadas por las células iNKT. α -GalCer es un análogo estructural optimizado de compuestos antitumorales aislados a partir de esponjas marinas que contiene una galactosa unida al hidroxilo primario de fitoceramida en configuración alfa, y que se encuentra acilada en el nitrógeno con ácidos grasos de cadena larga. Desde su descubrimiento, α -GalCer ha sido el prototipo de antígeno para la estimulación de 25 células iNKT, aunque otros glicolípidos que actúan como antígenos presentados por proteínas CD1 han sido también identificados. La excepcional potencia de α -GalCer en la estimulación de células NKT origina una serie de respuestas biológicas, derivadas de la liberación simultánea de citoquinas de tipo Th1 y Th2, que ejercen efectos celulares opuestos y determinan una fase de anergia antes de recuperar el equilibrio homeostático, limitando la eficacia de α -GalCer como inmunomodulador.

30 Por otra parte, los determinantes estructurales de la interacción del glicolípido con la proteína presentadora CD1d son conocidos, y también la estructura cristalina del complejo de la α -GalCer unida a las proteínas CD1d y TCR. Estos estudios estructurales muestran que la ceramida se une a CD1d en dos bolsillos hidrófobos donde se insertan las cadenas de los lípidos, mientras que una red de enlaces de hidrógeno bloquea la posición de la galactosa, que sobresale del sitio de unión y se presenta al TCR para su reconocimiento, donde los grupos hidroxilo del glicolípido desempeñan un papel fundamental.

35 La extraordinaria potencia de la estimulación de las células NKT por α -GalCer no está exenta de problemas, hecho que ha impulsado el diseño y síntesis de compuestos similares con el fin de mejorar sus propiedades biológicas, incluso a expensas de la obtención de compuestos menos potentes, y dirigido principalmente a la modulación de la proporción Th1/Th2 en la producción de citoquinas inducidas.

Se han descrito varios enfoques para el diseño de compuestos análogos de α -GalCer, principalmente en relación con las variaciones en la longitud y naturaleza de los lípidos (cfr. C. McCarthy, *et al.*, *J Exp Med* 2007, 204, 1131; 45 M. Trappeniers, *et al.*, *Chem Med Chem* 2008, 3, 1061; K. Fuhshuku, *et al.*, *Bioorg Med Chem* 2008, 16, 950; T. Tashiro, *et al.*, *Bioorg Med Chem* 2008, 16, 8896) o la sustitución de la galactosa por otros mono o polisacáridos (cfr. T. Kawano *et al.*, *Science* 1997, 278, 1626) y otras diversas sustituciones relacionadas (cfr. US2007238871A1). Algunos análogos de α -GalCer con grupos lineales no glicosídicos son capaces de activar células iNKT e inducen respuestas inmunológicas, lo que demuestra que es posible la modulación de los efectos del glicolípido después de la 50 introducción de modificaciones estructurales en el anillo de galactosa de α -GalCer (cfr. J. D. Silk *et al.*, *J Immunol* 2008, 180, 6452; R. W. Franck, *Acc Chem Res* 2006, 39, 692).

A la vista de lo anteriormente expuesto, sería conveniente el descubrimiento de compuestos nuevos de tipo glicolípido o bien análogos de glicolípidos conocidos, tales como la α -GalCer, que permitan la modulación de la respuesta 55 inmune mediada por células y que sean de utilidad para el desarrollo de medicamentos, adyuvantes, vacunas y para cualquier inmunoterapia diseñada para estimular las células NKT.

60 **Descripción de la invención**

La presente invención proporciona compuestos análogos de glicolípidos capaces de estimular y activar células NKT con producción preferente de citoquinas de tipo Th2. La estructura de estos compuestos consiste en la presencia de una ciclohexilamina polihidroxilada unida al hidroxilo primario de un lípido de tipo ceramida por un enlace amina 65 secundaria.

ES 2 345 377 A1

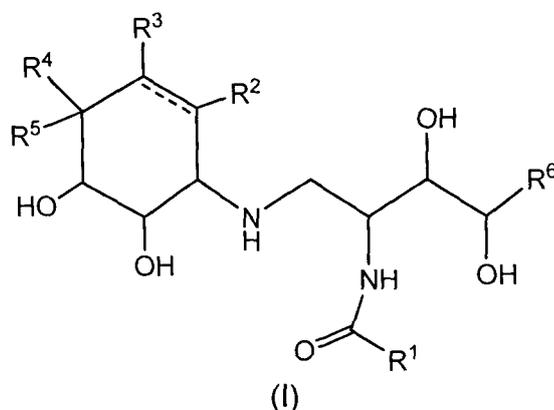
Un primer aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula general (I) o sus isómeros, sus sales y/o solvatos de los mismos (a partir de ahora compuestos de la invención):

5

10

15

20



25

donde:

30

R^1 es un grupo alquilo (C_5-C_{35}), sustituido o no sustituido.

35

R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son iguales o diferentes entre sí y se seleccionan de la lista que comprende hidrógeno (H), hidroxilo (OH), alcoxilo (OR_a) o alquilo (C_1-C_6), sustituido o no sustituido;

40

R^6 se selecciona de la lista que comprende los siguientes grupos, sustituidos o no sustituidos, alquilo (C_5-C_{35}), arilo, cicloalquilo o heterociclo; y

45

---- representa la existencia o no de un doble enlace.

50

El término “alquilo” se refiere en la presente invención en el caso de R^1 y/o R^6 , a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 6 a 35 átomos de carbono. En el caso de R^2 , R^3 , R^4 y/o R^5 , el término alquilo se refiere a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, aunque preferiblemente tienen de 1 a 3 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o por un grupo, sustituido o no sustituido, seleccionado entre: arilo, hidroxilo, amino, amido, éster, ácido carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido. Cuando el grupo alquilo está sustituido por un arilo se describe como “arilalquilo”, como por ejemplo, y no limitativamente, en el caso de un grupo bencilo.

55

El término “alcoxilo” se refiere en la presente invención a un grupo de fórmula $-OR_a$ en la que R_a es un alquilo (C_1-C_8), como por ejemplo, y no limitativamente, metoxilo, etoxilo o propoxilo. Preferiblemente el alcoxilo es un metoxilo.

60

El término “arilo” se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 18 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único ó múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Se pueden dar como ejemplos de grupo arilo, pero no limitativamente, los grupos: fenilo, naftilo, indenilo, etc. Preferiblemente el grupo arilo es un fenilo.

65

“Cicloalquilo” se refiere a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que sólo consiste en átomos de carbono e hidrógeno, tal como ciclopentilo, ciclohexilo o adamantilo.

El término “heterociclo” se refiere, en la presente invención, a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está insaturado, saturado o parcialmente saturado, y que consiste en átomos de carbono y de al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferiblemente el heteroátomo es nitrógeno, y más preferiblemente el ciclo es un anillo de 5 ó 6 miembros. Ejemplos de heterocicloalquilo pueden ser, no limitativamente: piperidina, piperazina, purina, pirazolina o pirrolidina.

En una realización preferida de los compuestos de la invención, R^1 es un grupo alquilo (C_7-C_{25}).

ES 2 345 377 A1

En otra realización preferida de los compuestos de la invención, R², R³, R⁴ y/o R⁵ son hidroxilo. Más preferiblemente R⁴ es hidroxilo y/o R⁵ es hidrógeno y/o R³ es hidroxilo o hidroxialquilo, más preferiblemente dicho hidroxialquilo (R³) es un hidroximetilo y/o R² es hidrógeno, un grupo hidroxilo o alcoxilo, en cuyo caso dicho alcoxilo es más preferiblemente metoxilo.

En otra realización preferida de los compuestos de la invención, R⁶ es un grupo alquilo (C₁₀-C₂₀).

En una realización más preferida los compuestos de la invención se seleccionan de la lista que comprende:

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-octanamido-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*sr*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-octanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5,6-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxio-6-metoxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-4'-5',6'-trihidroxiciclohexenilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-4',5',6'-trihidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-((1'*S*,2'*S*,3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*R*)-5-hidroximetil-2,3,4,6,-tetrahidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-((1'*S*,2'*S*,3'*S*,4'*S*,5'*R*)-5-hidroximetil-2,3,4,-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-((1'*R*,2'*S*,3'*S*,4'*S*,5'*R*)-5-hidroximetil-2,3,4,-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol; o

cualquiera de sus sales, preferiblemente clorhidratos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de la fórmula general (I) para su uso en la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica, preferiblemente para el tratamiento y/o prevención de enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones causadas por microorganismos patógenos, enfermedades inflamatorias, y, en general, de cualquier enfermedad cuyo tratamiento y/o prevención es susceptible de beneficiarse de las actividades biológicas mostradas por los productos descritos en la presente invención a través de la estimulación de células iNTK, o bien a una sal, derivado o solvato de los mismos, o bien a un profármaco farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Los compuestos de la fórmula general (I), también se pueden utilizar para la elaboración de vacunas o adyuvantes de vacunación u otros métodos de activación de la respuesta del sistema inmunitario conocidos por un experto en la materia.

Las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos pueden ser infecciones víricas como por ejemplo gripe, SIDA o hepatitis; infecciones bacterianas como por ejemplo clamidiosis, tuberculosis, estreptococosis, o pseudomoniasis; o infecciones parasitarias como por ejemplo leishmaniosis, malaria o tripanosomiasis.

Las enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias se pueden seleccionar de la lista que comprende, no limitativamente, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo 1, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, o bien COPD en sus siglas en inglés), colitis crónica o diversas alergias.

El término "cáncer" o "canceroso" tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una alteración de las células tumorales que tienen capacidad de invadir tejidos o de producir metástasis en lugares distantes del tumor primario. Son ejemplos de cáncer, no limitativamente: cáncer de mama, cánceres ginecológicos, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer

ES 2 345 377 A1

de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer del tracto urinario, cáncer tiroideo, cáncer renal, melanoma, cáncer de cerebro, sarcoma, linfoma o leucemia.

5 Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I) pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención, es decir, el término isómero también se refiere a cualquier mezcla de isómeros, como diastereómeros, racémicos, etc., incluso a sus isómeros ópticamente activos o las mezclas en distintas proporciones de los mismos. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

15 Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica, siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.

20 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I) -por ejemplo y no limitativamente: ésteres (incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ésteres de aminoácidos, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, etc.), carbamatos, amidas, etc.- que al ser administrado a un individuo puede ser transformado directa o indirectamente en dicho compuesto de fórmula (I) en el mencionado individuo. Ventajosamente, dicho derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

30 Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación conocidos por los expertos en la materia.

40 Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus derivados isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, y todavía más preferiblemente superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% de compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

45 Los compuestos de la presente invención de fórmula (I) pueden ser obtenidos o producidos mediante una vía sintética química u obtenidos a partir de una materia natural de distinto origen.

50 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de la invención de fórmula (I) o un isómero, sus sales y/o solvato del mismo, que comprende los siguientes pasos que se resumen en el esquema 1:

A) preparación de aminociclitoles de fórmula general (II), por:

55 A1) reducción de ciclohexil o ciclohexenil azidas (fórmula general (III)) en los que los sustituyentes hidroxilo se han bloqueado con un grupo protector (PG), preferentemente bencilo, o

A2) por sustitución de haluros o sulfonatos de ciclohexilo o ciclohexenilo (fórmula general (IV)) con amoniaco u otras aminas en los que los sustituyentes hidroxilo se han bloqueado con un grupo protector (PG), preferentemente bencilo;

60 B) activación de fitoesfingosina o moléculas análogas mediante la preparación de:

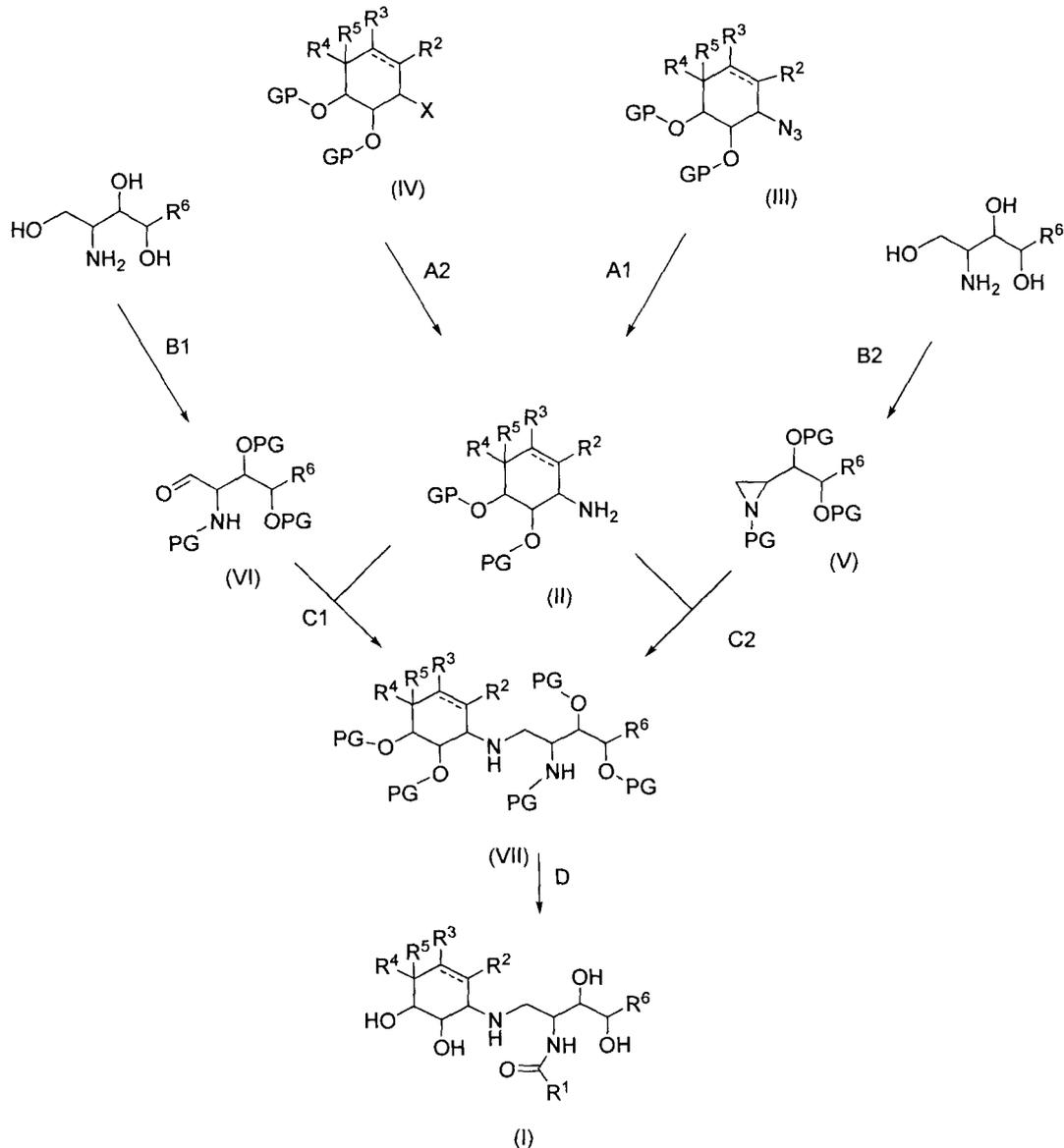
B1) aldehídos (VI), en los que los sustituyentes hidroxilo se han bloqueado con un grupo protector, preferentemente bencilo, o

65 B2) mediante la formación de aziridinas (V), en las que los sustituyentes hidroxilo del diol se han bloqueado con un grupo protector, preferentemente bencilo o isopropilideno.

ES 2 345 377 A1

- C) acoplamiento de los aminociclitoles obtenidos según el paso (A) con:
- C1) los aldehídos obtenidos en el paso (B1) mediante aminación reductiva; ó
- C2) ataque nucleofílico sobre las aziridinas derivadas de fitoesfingosina, obtenidas en el paso (B2); y
- D) acilación de la amina presente en la fitoesfingosina con ácidos carboxílicos o sus derivados seguida de la eliminación de los grupos protectores.

Esquema 1



Donde:

R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ están descritos anteriormente; X es un haluro o sulfonato; y PG es un grupo protector.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para el tratamiento y/o prevención de enfermedades a través de la estimulación de las células iNKT, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto o mezcla de compuestos de fórmula (I), en cantidad terapéuticamente efectiva, o una sal, profármaco, solvato, derivado o estereoisómero de los mismos farmacéuticamente aceptable, junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

5 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

10

Los compuestos descritos en la presente invención, sus derivados, sales, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o sus sales.

15

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.).

20

25 El uso de los compuestos de la invención es compatible con su uso en protocolos en que los compuestos de la fórmula (I), o sus mezclas se usan por sí mismos o en combinaciones con otros tratamientos o cualquier procedimiento médico.

25

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

30

35 Descripción de las figuras

Fig. 1.- Muestra los análisis por citometría de flujo de esplenocitos de ratón incubados con diferentes compuestos durante 5,5 días. Los compuestos fueron ensayados a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio completo con 1% de metanol (MeOH), mientras que la α -GalCer (αGC) se usó a 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los cultivos celulares fueron marcados con anticuerpos específicos anti-NK1-PE y anti-TCR-FITC. Los porcentajes de células NKT (células doblemente positivas) fueron calculados entre la población de células T seleccionadas electrónicamente.

40

Fig. 2.- Muestra la capacidad de compuestos de tipo aminociclitol para inducir citoquinas por estimulación de células NKT. Esplenocitos derivados de 3 ratones B6 fueron combinados y cultivados por tetraplicado con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aminociclitoles o 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de α -GalCer (αGC) y se determinaron las citoquinas $\text{IFN}\gamma$ (Fig. 2A) e IL-4 (Fig. 2B) presentes en los sobrenadantes de los cultivos a los cuatro días mediante ELISA (2 determinaciones). Los datos representan la media \pm SD de un experimento representativo. * Indica resultados estadísticamente significativos frente a cultivos control sin compuesto a ensayar.

45

Fig. 3.- Muestra como el compuesto 4b induce citoquinas de tipo Th1 y Th2 producidas por células NKT. Cuantificación de la producción de $\text{IFN}\gamma$ (Fig. 3A) e IL-4 (Fig. 3B) tras la estimulación *in vitro* de cultivos de células de bazo de ratón conteniendo agonistas lipídicos de células iNKT en un ensayo dosis-respuesta. Los datos muestran la media \pm SD de un experimento representativo con 2 ratones, cultivos duplicados de cada ratón a las concentraciones indicadas de agonista y 3 determinaciones ELISA para cada sobrenadante de cultivo.

50

55 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que desarrollan el proceso de selección de los compuestos de la invención.

60

Preparación de amidas derivadas de fitoesfingosina

Ejemplo 1

65 *N*-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benciloxi)-1-hidroxioctadecan-2-il)octanamida

A una disolución de 249 mg (0.5 mmol) de 3,4 di-*O*-bencilfitoesfingosina (C. Xia *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006, 16, 2195-2199) en THF (tetrahidrofurano) (10 mL) se añade ácido octanoico (143 mg, 1.1

ES 2 345 377 A1

mmol) y el hidrocloreuro de *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC, 1.1 mmol) y la mezcla de reacción se agita a reflujo durante 3 h. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se añade disolución saturada de NH₄Cl. Se extrae con Et₂O (éter etílico) y se seca con Na₂SO₄ anhidro. Se filtra el sólido y se evaporan los disolventes para dar un crudo que se purifica cromatografía en sílica gel utilizando una mezcla (acetato de etilo/hexano 1:10 a 1:5 v:v).
5 Se obtiene el producto (249 mg) en forma de aceite con un rendimiento del 81%.

[α]_D = - 32.3 (CDCl₃, c, 1.0); IR (neat, cm⁻¹): 3305, 2929, 1654, 1540, 1070; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.35 (m, 10H); 6.06 (d, *J* = 8.5, 1H); 4.73 (d, *J* = 12, 1H); 4.67 (d, *J* = 12, 1H); 4.62 (d, *J* = 12, 1H); 4.46 (d, *J* = 12, 1H); 4.15 (m, 1H); 4.00 (dd, *J* = 11.5, 3, 1H); 3.70 (m, 2H); 3.62 (dd, *J* = 11.5, 4.5 1H); 3.05 (br, 1H); 2.00 (m, 2H), 1.77-1.41 (m, 6H); 1.26 (m, 30 H); 0.88 (t, *J* = 7, 6H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.8, 138.1, 137.7, 128.6-127.7 (10 C), 82.1, 79.0, 73.0, 72.8, 62.9, 50.5, 36.6, 31.8, 31.6, 30.7, 29.6-29.0 (11 C), 25.9, 25.6, 22.6 (2C), 14.0 (2C). HRMS (Espectro de masas de alta resolución). Calculado para C₄₀H₆₅NO₄ (M+H⁺): 624.4992. Encontrado: 624.5015.

Ejemplo 2

N-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benciloxi)-1-hidroxi-octadecan-2-il)hexacosanamida

De manera análoga a la descrita en el ejemplo 1 se obtiene la amida a partir de 302 mg de ácido hexacosanoico, 251 mg de 3,4 di-O-bencilfiteosfingosina y 215 mg de EDC para dar un sólido incoloro (83%).

Pf: 102-103; [α]_D = - 27.2 (CDCl₃, c, 1.0); IR (neat, cm⁻¹): 3310, 2945, 1659, 1533, 1063; ¹H-NMR (CDCl₃, 100 MHz); δ 7.34 (m, 10 H); 6.03 (d, *J* = 8, 1H); 4.72 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.66 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.61 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.45 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.13 (m, 1H); 3.99 (dd, *J* = 11.5, 3 1H); 3.70 (m, 2H); 3.61 (dd, *J* = 11.5, 4.4, 1H); 3.05 (br, 1H); 2.00 (m, 2H), 1.76-1.40 (m, 6H); 1.27 (m, 66H); 0.87 (t, *J* = 7, 6H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.8, 138.1, 137.8, 128.7-127.8 (10C), 82.3, 79.0, 73.0, 72.9, 63.0, 50.5, 36.7, 31.9 (2C), 30.8, 29.7-29.3 (29C), 26.0, 25.6, 22.7 (2C), 14.1 (2C). HRMS. Calculado para C₅₈H₁₀₁NO₄ (M+H⁺): 876.7609. Encontrado: 876.7828.

Preparación de aldehídos

Ejemplo 3

N-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benciloxi)-1-oxooctadecan-2-il)octanamida

De acuerdo con un método descrito [M. Ocejo, *et al* Synlett 2005, 13, 2110-2112] se disuelven 123 mg (0.2 mmol) de *N*-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benciloxi)-1-hidroxi-octadecan-2-il)octanamida preparada en el ejemplo 1 en acetato de etilo (AcOEt) (40 mL) y se añaden 224 mg (0.8 mmol) de ácido o-iodoxibenzoico (IBX) a temperatura ambiente. Se calienta a reflujo durante 3 h y se lleva seguidamente la mezcla a temperatura ambiente, se diluye con hexano (40 mL) y se filtra el sólido. El filtrado se evapora para dar 120 mg del aldehído de gran pureza con rendimiento cercano al 100%. Este material se utiliza de manera inmediata en las reacciones siguientes.

IR (film, cm⁻¹): 3383, 2903, 1708, 1497, 1041, 738. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ : 9.67 (s, 1H), 7.30-7.28 (m, 10H); 6.06 (d, *J* = 7.5, 1H); 4.96 (dd, 7.5, *J* = 2.5, 1H); 4.61 (m, 2H); 4.54 (m, 2H); 3.94 (m, 1H); 3.62 (q, *J* = 5.5, 1H); 2.04 (m, 2H); 1.71 (m, 2H); 1.53 (m, 2H); 1.28 (m, 32H); 0.90 (t, *J* = 7, 6H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 198.0, 172.1, 137.3, 137.1, 128.5-127.8 (10C), 81.3, 76.6, 72.0, 71.5, 58.6, 36.8, 31.9, 30.3, 29.6-28.9 (13C), 25.5, 24.6, 22.8, 14.1(2C).

Ejemplo 4

N-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benciloxi)-1-oxooctadecan-2-il)hexacosanamida

De acuerdo con el procedimiento del ejemplo 3 se obtiene el aldehído por oxidación con IBX de *N*-((2*S*,3*S*,4*R*)-3,4-bis(benciloxi)-1-hidroxi-octadecan-2-il)hexacosanamida obtenida según el ejemplo 2.

IR (film, cm⁻¹): 3381, 2900, 1711, 1502, 1045, 740. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ : 9.68 (s, 1H), 7.39-7.28 (m, 10H); 6.06 (d, *J* = 8, 1H); 4.96 (dd, *J* = 7.5, 2.5, 1H); 4.62 (d, *J* = 11, 1H) 4.61 (d, *J* = 11, 1H); 4.54 (d, *J* = 11, 1H) 4.53 (d, *J* = 11, 1H); 3.94 (dd, *J* = 5.5, 2.5, 1H); 3.63 (q, *J* = 5.5, 1H); 2.04 (m, 2H), 1.72 (m, 2H); 1.53 (m, 2H); 1.28 (m, 68H); 0.90 (t, *J* = 7, 6H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 198.1, 173.5, 137.5, 137.4, 128.6-127.8 (10C), 81.5, 76.9, 72.1, 71.7, 58.7, 36.4, 31.9, 30.1, 29.7-29.2 (31C), 25.5, 24.7, 22.7, 14.1(2C).

Aminación reductora

Ejemplo 5

(2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-il)octanamida

Una disolución de 158 mg (0.25 mmol) de (1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2,3,4,5,6-pentakis(benciloxi)ciclohexanamina [Serrano *et al.* J Org Chem 2005, 70, 7829] en metanol/CH₂Cl₂ (1:3, v/v) (4 mL) bajo atmósfera de argón se

ES 2 345 377 A1

trata sucesivamente y por este orden con cianoborohidruro de sodio (3 equiv.) ácido acético (20 μ L) y *N*-((2S,3S,4R)-3,4-bis(benciloxi)-1-oxooctadecan-2-il)octanamida obtenida según el procedimiento del ejemplo 3. Se agita durante 18 h a temperatura ambiente, la mezcla se trata con agua (3 mL) y se extrae con acetato de etilo (3 X 20 mL). Los extractos orgánicos se combinan, se lavan con agua y se secan con sulfato de sodio anhidro. Se filtra el sólido y se evaporan los volátiles para dar un crudo que se purifica por cromatografía en gel de sílice eluyendo con mezclas de hexano/acetato de etilo (3:1 a 1:1, v/v), para dar 89 mg, 0.07 mmoles (29%) del producto en forma de aceite claro.

$[\alpha]_D = -6.0$ (CDCl₃, c, 1.0); IR (neat, cm⁻¹): 3336, 2915, 2847, 1642, 1451, 1048; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.35-7.20 (m, 35 H); 6.39 (d, *J* = 8.5, 1H); 4.96-4.83 (m, 7 H); 4.78 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.74 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.65 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.58 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.54 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.50 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.40 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.08 (m, 1H); 3.71 (dd, *J* = 5, 4, 1H); 3.57 (m, 3H); 3.45 (m, 1H); 3.24 (m, 3H); 2.95 (dd, *J* = 13, 4.5, 1H); 2.58 (t, *J* = 10, 1H); 1.75 (m, 2H), 1.58 (m, 2H); 1.40 (m, 4H); 1.28 (m, 30H); 0.90 (t, *J* = 7, 3H); 0.88 (t, *J* = 7, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.6, 138.6, 138.5, 138.3, 138.2 (2C), 138.1 (2C), 128.4-127.1 (35C), 84.1, 83.9, 83.0, 82.4, 82.1, 80.1, 75.7 (2C), 75.6, 75.4, 74.5, 73.4, 71.3, 62.4, 49.9, 48.7, 36.3, 31.8, 30.0; 29.8-29.3 (12C), 25.7, 25.6, 22.6 (2C), 14.1, 14.0. HRMS. Calculado para C₈₁H₁₀₆N₂O₈ (M+H⁺): 1235.8027. Encontrado: 1235.8049.

Ejemplo 6

(2S,3S,4R)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'rs,2'RS,3'SR,4'SR,5'RS,6'SR)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida

Por un procedimiento análogo al descrito en el ejemplo 5 se obtiene la amida a partir de (1s,2R,3S,4r,5R,6S)-2,3,4,5,6-pentakis(benciloxi)ciclohexanamina (cfr. Serrano *et al.* *J Org Chem* 2005, 70, 7829) y *N*-((2S,3S,4R)-3,4-bis(benciloxi)-1-oxooctadecan-2-il)hexacosanamida por aminación reductora con un 28% de rendimiento.

Aceite, $[\alpha]_D = -6.3$ (CDCl₃, c, 1.0); IR (film, cm⁻¹): 3513, 2933, 2855, 1719, 1450, 1074; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.39-7.22 (m, 35 H); 6.42 (d, *J* = 8.8, 1H); 4.95-4.82 (m, 7H); 4.79 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.73 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.63 (d, *J* = 11.5, 1 H); 4.59 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.53 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.49 (d, *J* = 11.5, 1 H); 4.40 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.08 (m, 1H); 3.71 (dd, *J* = 5, 4, 1 H); 3.57 (m, 3H); 3.46 (m, 1H); 3.25 (m, 3H); 2.96 (dd, *J* = 13, 4.5, 1H); 2.58 (t, *J* = 10, 1H); 1.74 (m, 2H), 1.58 (m, 2H); 1.40 (m, 4H); 1.28 (m, 66H); 0.90 (t, *J* = 7, 6H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.8, 138.5 (2C), 138.3, 138.2 (4C), 128.4-127.1 (35C), 84.1, 83.9, 83.0, 82.3, 82.0, 80.0, 75.8 (2C), 75.6, 75.4, 74.5, 73.4, 71.3, 62.3, 49.4, 48.7, 48.5, 36.3, 31.9, 31.7; 29.9-29.0 (30C), 25.7, 25.6, 22.6, 22.5 14.1, 14.0. HRMS. Calculado para C₉₉H₁₄₂N₂O₈ (M+H⁺): 1488.0844. Encontrado: 1488.0773.

Ejemplo 7

(2S,3S,4R)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'R,2'S,3'R,4'S,5'S,6'S)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida

Según un procedimiento descrito en serie racémica (Serrano *et al.* *J Org Chem* 2005, 70, 7829) se prepara a partir de (+)-tetra-*O*-bencilconduritol B epóxido (cfr. González-Bulnes *et al.*, *Carbohydr Res* 2007, 342, 1947-52) el compuesto (1R,2S,3R,4S,5S,6S)-2,3,4,5,6-pentahidroxiciclohexilamina, que se hace reaccionar de acuerdo con el procedimiento de aminación reductora descrito en el ejemplo 5 con el aldehído intermedio *N*-((2S,3S,4R)-3,4-bis(benciloxi)-1-oxooctadecan-2-il)hexacosanamida para dar el compuesto requerido con un 40% de rendimiento.

Aceite, $[\alpha]_D = +1.6$ (CDCl₃, c, 1.0); IR (film, cm⁻¹): 3431, 2916, 2847, 1653, 14940, 1061; ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.38-7.28 (m, 30 H); 6.16 (d, *J* = 8, 1H); 4.89-4.56 (m, 11 H); 4.44 (d, *J* = 12, 1H); 4.24 (m, 1H); 4.01 (m, 1H); 3.98 (dd, *J* = 9, 4, 1 H); 3.81 (m, 3H); 3.73 (t, *J* = 4, 1 H); 3.56 (dd, *J* = 11, 5, 1H); 3.16 (t, *J* = 4, 1H); 2.94 (dd, *J* = 11, 4, 1H); 2.61 (dd, *J* = 11, 5, 1H); 2.00 (m, 2H), 1.64 (m, 2H); 1.57 (m, 2H); 1.28 (m, 68H); 0.91 (t, *J* = 7, 3H); 0.90 (t, *J* = 7, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.3, 138.8, 138.7, 138.3(2C), 138.2, 137.9, 128.4-127.3 (30C), 82.4, 81.9, 81.5, 80.4, 79.1, 79.0, 75.9, 75.6, 73.8, 73.1, 72.3, 71.4, 67.3, 58.2, 48.5, 48.4, 36.7, 31.8, 30.2, 29.7-29.3 (31C), 25.6, 25.4, 22.6, 14.0 (2C). HRMS. Calculado para C₉₂H₁₃₆N₂O₈ (M+H⁺): 1398.0375. Encontrado: 1398.0386.

Ejemplo 8

(2S,3S,4R)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'R,2'S,3'R,4'S,5'S,6'S)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)octanamida

Se prepara por aminación reductora según el ejemplo 7 a partir de (1R,2S,3R,4S,5S,6S)-2,3,4,5,6-pentahidroxiciclohexilamina y del aldehído intermedio *N*-((2S,3S,4R)-3,4-bis(benciloxi)-1-oxooctadecan-2-il)hexacosanamida con un 38% de rendimiento.

Aceite. $[\alpha]_D = +2.0$ (CDCl₃, c, 1.0); IR (film, cm⁻¹): 3414, 2918, 2854, 1649, 1451, 1096; ¹H-NMR (CDCl₃) 500 MHz); δ 7.36-7.25 (m, 30H); 6.16 (d, *J* = 8, 1H); 4.86-4.56 (m, 11H); 4.43 (d, *J* = 12, 1H); 4.23 (m, 1H); 4.01 (m, 1H); 3.98 (dd, *J* = 9, 4, 1H); 3.82 (m, 3H); 3.73 (t, *J* = 4, 1 H); 3.57 (dd, *J* = 11, 5, 1H); 3.17 (t, *J* = 4, 1H); 2.95 (dd, *J* = 11, 4, 1H); 2.62 (dd, *J* = 11, 5, 1H); 1.98 (m, 2H), 1.66 (m, 2H); 1.54 (m, 2H); 1.28 (m, 32H); 0.91 (t, *J* = 7, 3H); 0.85

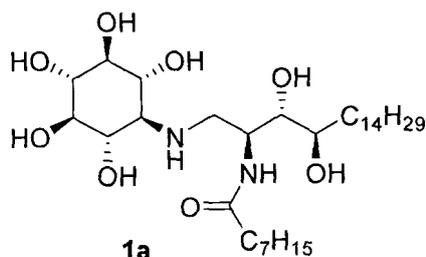
ES 2 345 377 A1

(t, $J = 7, 3\text{H}$). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 172.3, 138.8, 138.7, 138.3(2C), 138.2, 137.9, 128.4-127.4 (30C), 82.4, 81.8, 81.5, 80.4, 79.1, 79.0, 75.9, 75.6, 73.8, 73.1, 72.4, 71.4, 67.3, 58.2, 48.6, 48.5, 36.7, 31.8, 30.2, 29.7-29.3 (13C), 25.6, 25.4, 22.6, 14.1, 14.0. HRMS. Calculado para $\text{C}_{74}\text{H}_{100}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 1145.7558. Encontrado: 1145.7560.

5 Reacciones de desbencilación de productos procedentes de aminación reductiva

Ejemplo 9

10 (2*S*,3*S*,4*R*)-2-octanamido-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxyciclohexilamino)octadecano-3,4-diol (Compuesto 1a)



25 Una disolución en diclorometano (2 mL) de 53 mg (0.05 mmol) de (2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)octanamida se enfría a -78°C mediante un baño externo y se mantiene bajo argón. Se añade una disolución de BCl_3 (1M) en heptano (2 equiv. por cada grupo OBn). La mezcla de reacción se deja que llegue a temperatura ambiente y se agita durante 16 h. pasado este tiempo, se vuelve a enfriar a -78°C , y se añaden 2 mL de metanol gota a gota. Se retira el baño y se deja llegar a temperatura ambiente, tras lo cual se concentra a vacío. Seguidamente, se añade AcOEt (3 mL) al residuo resultante y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 5-7 minutos. El sólido resultante se recoge por filtración. Se lava con AcOEt (3x1 mL) y se seca a vacío, para dar el compuesto 27 mg (0.042 mmol, 85%) en forma de hidrocloreuro.

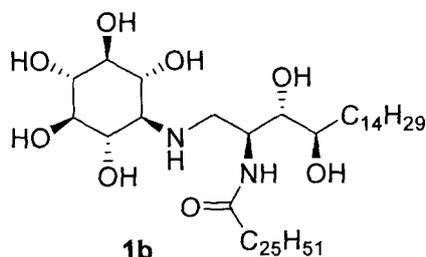
30

35 Pf = 241-243. $[\alpha]_{\text{D}} = +9.6$ (MeOH, c, 0.8); IR (film): 3358, 2931, 2852, 1657, 1458, 1111. ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz); δ 4.37 (q, $J = 5.5$, 1H); 3.68 (t, $J = 5.5$, 1H); 3.63 (dd, $J = 12, 5.5$, 1H); 3.55 (m, 3H); 3.39 (dd, $J = 13, 6$, 1H); 3.33-3.2 (m, 4H); 3.05 (t, $J = 11$, 1H); 2.29 (t, $J = 7$, 2H); 1.64 (m, 2H); 1.29 (m, 34H); 0.90 (t, $J = 7$, 6H); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 177.6, 77.9, 77.4 (2C), 76.0, 74.1, 71.2, 71.1, 64.5, 49.6, 49.4, 37.9, 33.9, 33.6; 31.7-31.3 (10 C), 31.3, 31.2, 31.0, 27.8, 27.6, 24.6 15.3 (2C). HRMS. Calculado para $\text{C}_{32}\text{O}_{64}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 605.4741. Encontrado: 605.4739.

40

Ejemplo 10

45 (2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*sr*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxyciclohexilamino)octadecano-3,4-diol (Compuesto 1b)



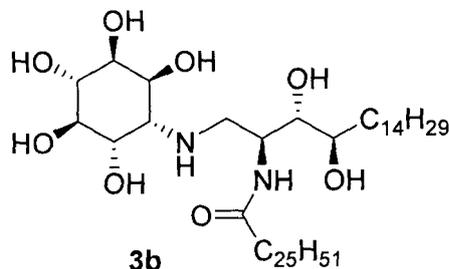
60 Se prepara por desbencilación con BCl_3 según el procedimiento del ejemplo 9 del producto (2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida. Rendimiento 83%.

65 Pf = 242-244. $[\alpha]_{\text{D}} = +8.1$ (MeOH, c, 0.8). IR (film): 3363 (br), 2922, 2845, 1649, 1455, 1069. ^1H -NMR (CD_3OD , 400 MHz); δ 4.36 (m, 1H); 3.65 (dd, $J = 6, 4.8$, 1H); 3.56 (m, 2H); 3.48 (m, 2H); 3.36-3.13 (m, 5H); 3.01 (t, $J = 10$, 1H); 2.26 (t, $J = 7$, 2H); 1.61 (m, 2H); 1.29 (m, 70H); 0.90 (t, $J = 7$, 6H); ^{13}C -NMR (DMSO , 60°C , 100 MHz): δ 173.9, 76.1, 75.6 (2C), 74.5, 71.6, 69.7, 69.6, 63.3, 48.3, 48.1, 36.2, 32.7, 31.9; 29.7-29.3 (31 C), 26.0, 25.7, 22.7 14.4 (2C). HRMS. Calculado para $\text{C}_{50}\text{H}_{100}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 857.7558. Encontrado: 857.7563.

ES 2 345 377 A1

Ejemplo 11

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-octanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol
(Compuesto 3b)

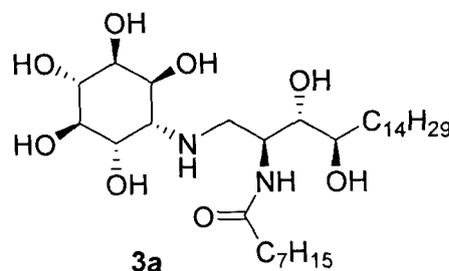


Se prepara por desbencilación con BCl_3 según el procedimiento del ejemplo 9 del producto (2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)octanamida. Rendimiento 84%.

Pf = 214-216. $[\alpha]_D = -6.8$ (MeOH, c, 0.75); IR (film): 3417, 2931, 2850, 1650, 1443, 1034. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz): δ 4.36 (q, $J = 5.2$, 1H); 4.15 (m, 2H), 3.90 (m, 2H); 3.86 (m, 1H); 3.65 (t, $J = 5$, 1H); 3.57 (m, 2H), 3.40 (dd, $J = 12.5$, 6, 1H); 3.20 (dd, $J = 12.5$, 6, 1H), 2.23 (t, $J = 7$, 2H); 1.60 (m, 2H), 1.29 (m, 34H); 0.88 (t, $J = 7$, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ 176.7, 77.0, 74.7, 73.6, 72.9, 72.8, 69.9, 66.3, 59.9, 48.4, 47.8, 36.9, 33.5, 33.0, 32.8, 30.7 (8C), 30.4, 30.3, 30.1, 26.9, 26.7, 23.7 (2C), 14.4 (2C). HRMS. Calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 605.4741. Encontrado: 605.4738.

Ejemplo 12

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol (Compuesto 3a)



Se prepara por desbencilación con BCl_3 según el procedimiento del ejemplo 9 del producto (2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-dibenciloxi-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2',3',4',5',6'-pentabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida. Rendimiento 89%.

Pf = 235-237; $[\alpha]_D = -9.3$ (MeOH, c, 0.75). IR (film): 3368, 2923, 2847, 1645, 1461, 1042. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 45°C, 400 MHz): δ 4.37 (q, $J = 5$, 1H); 4.16 (m, 2H), 3.98 (m, 2H); 3.88 (m, 1H); 3.67 (t, $J = 5$, 1H); 3.57 (m, 2H), 3.40 (dd, $J = 10$, 5.2, 1H); 3.21 (dd, $J = 10$, 5.2, 1H), 2.23 (t, $J = 7$, 2H); 1.60 (m, 2H), 1.29 (m, 70H); 0.88 (t, $J = 7$, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 45°C, 100 MHz): δ 176.7, 77.0, 74.7, 73.6, 72.9, 72.8, 69.9, 66.3, 59.9, 48.4, 47.8, 36.9, 33.5, 33.0, 30.7-30.4 (31C), 26.9, 26.8, 23.7, 14.4 (2C). HRMS. Calculado para $\text{C}_{50}\text{H}_{101}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 857.7558. Encontrado: 857.7580.

Preparación de tetrahidroxiciclohexilaminas

Ejemplo 13

(1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanol

Una disolución de O-tetrabencilconduritol B [González-Bulnes *et al* Carbohydr Res 2007, 342, 1947-52] (1 g, 1.97 mmol) en THF (50 mL) se agita a 0°C mientras se añade $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1 M en THF, 6 mL, 6 mmol) gota a gota durante unos 5 min. La mezcla de reacción se lleva a temperatura ambiente y se continúa la agitación durante 16 h. Se añade NaOH (1 M aq., 8 mL), y peróxido de hidrógeno (30% w/v aq., 4 mL) y se agita vigorosamente durante 1 h a

ES 2 345 377 A1

temperatura ambiente. Se extrae con éter y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua y disolución saturada de NaCl, se secan (Na_2SO_4) y se concentran a vacío para dar un sólido que se purifica por cromatografía flash (Hexano: AcOEt, 7:3), para dar un sólido blanco (723 mg, 70%).

5 $[\alpha]_{\text{D}} = +8$ (CHCl_3 , C, 1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.34 (m, 20H); 5.03-4.95 (m, 3H); 4.87 (t, $J = 10$, 2H); 4.89 (m, 3H); 3.61 (t, $J = 9$, 1H); 3.53 (m, 3H); 3.36 (t, $J = 9$, 1H); 2.37 (dt, $J = 13$, 4, 1H); 2.33 (br, 1H); 1.48 (q, $J = 13$, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 138.6, 138.4 (2C), 138.2, 128.6-127.6 (20C), 85.8 (2C), 83.3, 77.4, 75.8 (2C), 75.4, 72.3, 68.3, 33.9. HRMS. Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 525.2641. Encontrado: 525.2644.

10 Ejemplo 14

(1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanol

15 Una disolución de (1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanol (540 mg, 1.02 mmol) preparado de acuerdo con el ejemplo 9 y trietilamina (0.44 mL, 3 mmol) en THF (15 mL) se trata con MsCl (cloruro de metansulfonilo) (232 mg, 2.04 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 3 h, se diluye con H_2O (20 mL), y se extrae con AcOEt (3x15 mL). los extractos se secan con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora para dar el mesilato intermedio, que se disuelve en DMF(dimetilformamida)/ H_2O (98/2) (10 mL) y se agita a 140°C en tubo cerrado durante 96 h. Se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se trata con Et_2O (10 mL), se lava con H_2O (3X10 mL), se seca y se evapora para dar una aceite que se purifica mediante cromatografía flash (hexano/AcOEt 7:3) para dar el alcohol (60 mg, 30%).

25 Pf = 65-67; $[\alpha]_{\text{D}} = -4$ (CHCl_3 , C, 1); IR (neat, cm^{-1}): 3361, 2943, 1427, 1118, 986. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.33 (m, 20H); 4.95-4.65 (m, 8H); 4.12 (m, 1H); 3.95 (m, 1H); 3.84 (t, $J = 9.2$, 1H); 3.49 (m, 2H); 2.84 (dt, $J = 14$, 4, 1H); 1.40 (ddd, $J = 14$, 12, 2.4, 1H), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ 138.8, 138.7, 138.6, 137.9, 128.5-127.4 (20 C), 85.7, 82.8, 81.5, 77.0, 76.0, 75.7, 72.9, 72.8, 65.9, 32.4. HRMS. Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 525.2641. Encontrado: 525.2644.

Ejemplo 15

30 (1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanamina

35 Una disolución de (1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanol (mg, 0.28 mmol) preparado de acuerdo con el ejemplo 9 y trietilamina (0.12 mL, 0.84 mmol) en diclorometano (10 mL) se trata con MsCl (43 μL , 0.56 mmol) a 0°C. La mezcla se agita y se lleva a temperatura ambiente durante dos horas. Se añade diclorometano (10 mL) y se lava tres veces con NaOH 1N (10 mL). La fase orgánica se lava con agua y se seca Na_2SO_4 anhidro, se filtra y se concentra a vacío para dar un aceite que se disuelve en DMF (5 mL). Se añade NaN_3 (182 mg, 2.8 mmol) y se calienta la mezcla a 90°C durante 12 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente, se añade éter dietílico (20 mL), y se extrae con disolución acuosa saturada de NaCl (3x20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y se concentra a vacío para dar la azida intermedia que se purifica por cromatografía flash en silica gel (hexano/AcOEt 9:1). (109 mg, 71%), sólido blanco: Pf = 87-89, $[\alpha]_{\text{D}} = -8.5$ (CHCl_3 , C, 1).

45 La azida se reduce a la amina mediante LiAlH_4 (13 mg, 0.36 mmol) que se añade en una porción a una disolución de la misma en THF (10 mL) a 0°C y se agita a esta temperatura 1 h y durante 1 h a temperatura ambiente. Tras enfriar a 0°C la mezcla de reacción se añaden gota a gota 0.3 mL de disolución acuosa saturada de Na_2SO_4 . Las sales se filtran sobre Celite[®] que se lava con Et_2O y los filtrados se evaporan a vacío para dar la amina pura en forma de sólido blanco (96 mg, 93%).

50 Pf = 74.76. $[\alpha]_{\text{D}} = +2$ (CHCl_3 , C, 1); IR (film, cm^{-1}): 3351, 2957, 2362, 1433, 1112. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.30 (m, 20H); 4.87 (m, 4H); 4.69 (m, 4H); 3.96 (m, 2H); 3.46 (m, 3H); 2.80 (dt, $J = 14$, 3.2, 1H); 1.43 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ : 139.0, 138.9, 138.7, 138.5, 128.4-127.4 (20C), 86.2, 83.1, 81.4, 77.1, 75.9, 75.6, 72.8, 72.4, 46.8, 33.5. HRMS. Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{NO}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 524.2801. Encontrado: 524.2821.

Ejemplo 16

55 (1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanamina

Se prepara a partir de (1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanol de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 11 para dar un sólido blanco (45 mg, 55%).

60 Pf = 102-103. $[\alpha]_{\text{D}} = -11.5$ (CDCl_3 , C, 1.0). IR (neat, cm^{-1}): 3355, 2923, 2366, 1454, 1069. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.31 (m, 20H); 4.98 (m, 3H); 4.84 (m, 2H); 4.67 (m, 3H), 3.54 (m, 3H); 3.18 (t, $J = 9.2$, 1H); 2.71 (m, 1H); 2.20 (dt, $J = 13.2$, 4, 1H); 1.57 (br, 2H, NH_2), 1.31 (m, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 138.6, 138.4 (2C), 138.3, 128.5-127.5 (20C), 86.8, 86.0, 84.4, 78.4, 75.7 (2C), 75.5, 72.3, 49.8, 35.1. HRMS. Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{NO}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 524.2801. Encontrado: 524.2819.

ES 2 345 377 A1

Reacciones de sustitución de aziridinas derivadas de fitoesfingosina

Ejemplo 17

- 5 *Preparación de N-((1S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-2-((1S,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexilamino)etil)-2-nitrobenzenosulfonamida*

A una disolución de 70 mg (0.13 mmol) de (1S,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanamina en MeCN seco (5 mL) se añaden 68 mg (0.13 mmol) de (S)-2-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina (cfr. Y. Harrak *et al. Eur J Org Chem* 2008, 4647-4654). La mezcla se agita a reflujo durante 3 h, se enfría a temperatura ambiente y se concentra a vacío. Se purifica el residuo por cromatografía en columna (hexano/AcOEt 4:1) para dar un aceite incoloro (118 mg, 87%).

[α]_D = +5.1 (CDCl₃, C, 1.0). IR (film, cm⁻¹): 3316, 2924, 2853, 1541, 1306, 1070, 697. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 8.12 (d, *J* = 7.5, 1H); 7.65 (t, *J* = 7, 1H); 7.56 (m, 2H); 7.31 (m, 20H); 4.84 (m, 4H); 4.60 (m, 4H); 4.13 (m, 2H); 3.85 (m, 3H); 3.53 (dd, *J* = 9.5, 4, 1H); 3.49 (t, *J* = 9, 1H); 3.01 (d, *J* = 2.5, 1H); 2.87 (dd, *J* = 12, 4, 1H); 2.72 (dd, *J* = 12, 3.5, 1H); 2.17 (dt, *J* = 14, 3.5, 1H); 1.51 (m, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.27 (m, 27 H); 0.91 (t, *J* = 7, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 147.7, 139.1, 139.0, 138.9, 138.5, 135.3, 133.3, 132.7, 129.7, 128.3-127.3 (20C), 125.3, 107.9, 85.7, 82.6, 81.6, 78.2, 77.5, 77.4, 75.8, 75.4, 72.7, 72.5, 54.1, 53.4, 49.1, 31.9, 29.8-29.3 (11C), 27.4, 26.7, 25.2, 22.7, 14.1. HRMS. Calculado para C₆₁H₈₁N₃O₁₀S (M+H⁺): 1048.5721. Encontrado: 1048.5742.

Ejemplo 18

- 25 *N-((1S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-2-((1R,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexilamino)etil)-2-nitrobenzenosulfonamida*

De acuerdo con el procedimiento del ejemplo 17 se hacen reaccionar (1R,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexanamina y (S)-2-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina (cfr. Y. Harrak *et al., Eur J Org. Chem* 2008, 4647-4654) para dar un aceite incoloro (71 mg, 87%).

[α]_D = +30 (CDCl₃, C, 1.0); IR (film): 3340, 2924, 2853, 1593, 1365, 1072. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz); δ 8.03 (d, *J* = 7.6, 1H); 7.61 (t, *J* = 7.6, 1H); 7.52 (t, *J* = 7.6, 1H); 7.44 (d, *J* = 8, 1H); 7.28 (m, 21H); 4.96-4.54 (m, 8H); 4.08 (m, 2H); 3.66 (m, 1H); 3.44 (m, 3H); 3.16 (t, *J* = 9.2, 1H); 2.80 (d, *J* = 10, 1H); 2.55 (d, *J* = 10, 1H); 2.42 (t, *J* = 10, 1H); 2.23 (m, 1H); 1.51 (m, 3H); 1.33 (s, 3H); 130 (s, 3H); 1.27 (m, 24H); 0.87 (t, *J* = 7, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 147.7, 138.6, 138.4 (2C), 138.3, 135.3, 133.3, 132.6, 130.0, 128.4-127.4 (20 C), 125.1, 107.8, 85.8, 84.8, 82.9, 78.3, 77.5, 76.6, 75.7 (2C), 74.8, 72.3, 55.4, 54.3, 45.7, 32.0, 31.8, 29.6-29.2 (10 C), 27.8, 26.3, 25.5, 22.6, 14.1. HRMS. Calculado para C₆₁H₈₁N₃O₁₀S (M+H⁺): 1048.5721. Encontrado: 1048.5739.

Desprotección de 2-nitrobenzenosulfonamidas

Ejemplo 19

- 45 *(S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1S,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexil)etano-1,2-diamina*

A una disolución de N-((1S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-2-((1S,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexilamino)etil)-2-nitrobenzenosulfonamida (105 mg, 0.1 mmol) en CH₃CN seco (2 mL), se añaden tiofenol (44 mg, 0.4 mmol) y Cs₂CO₃ (98 mg, 0.3 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y se añade disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (20 mL), extrayéndose la fase acuosa con CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos combinados se secan sobre MgSO₄, se filtran y se concentran a presión reducida para dar un aceite que se purifica por cromatografía en columna (CH₂Cl₂/MeOH 99:1) para dar un líquido claro (73 mg, 85%).

[α]_D = +10.0 (CDCl₃, C, 1.0); IR (film): 3350, 2920, 2832, 1449, 1367, 1081. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.31 (m, 20H); 4.87 (m, 4H); 4.67 (m, 4H); 4.12 (m, 1H); 3.91 (m, 1H); 3.75 (dd, *J* = 9.5, 5.5, 1H); 3.55 (dd, *J* = 9.5, 4, 1H); 3.48 (m, 2H); 3.11 (m, 1H); 2.88 (m, 1H); 2.69 (dd, *J* = 12, 3, 1H); 2.56 (dd, *J* = 12, 6.5, 1H); 2.23 (dt, *J* = 13.5, 4.5, 1H); 1.54 (m, 3H); 1.42 (s, 3H); 1.30 (s, 3H); 1.27 (m, 24H); 0.90 (t, *J* = 7, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 138.9 (2C), 138.7, 138.4, 128.3-127.4 (20C), 107.7, 86.2, 83.1, 82.1, 80.0, 77.9, 76.7, 75.9, 75.7, 72.7, 72.2, 53.6, 51.8, 50.2, 31.9, 30.2-29.3 (11C), 28.3, 26.2, 25.9, 22.6, 14.1. HRMS. Calculado para C₅₅H₇₈N₂O₆ (M+H⁺): 863.5938. Encontrado: 863.5942.

Ejemplo 20

- 65 *(S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1R,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexil)etano-1,2-diamina*

De acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 19 se hace reaccionar (S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1R,2S,3R,4R,5S)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexil)etano-1,2-diamina con tiofenol y carbonato de cesio para dar el producto en forma de aceite con un 82% de rendimiento.

ES 2 345 377 A1

$[\alpha]_D = -7$ (CDCl₃, C, 1.0); R (film): 3402, 2924, 2853, 1454, 1367, 1069. ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz); δ 7.33 (m, 20H); 5.02-4.68 (m, 8H); 4.13 (m, 1H); 3.77 (dd, $J = 8.4, 5.6$, 1H); 3.56 (m, 3H); 3.38 (t, $J = 8.8$, 1H); 2.84 (dd, $J = 11.2, 3.2$, 1H); 2.77 (dt, $J = 8.4, 2.8$, 1H); 2.52 (m, 1H); 2.35 (dt, $J = 12.8, 4$, 1H); 1.50 (m, 3H); 1.39 (s, 3H); 1.31 (s, 3H); 1.28 (m, 24H); 0.90 (t, $J = 7.2$, 3H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 138.7, 138.5, 138.4, 138.3, 128.4-127.5 (20C), 107.8, 85.8, 84.7, 84.2, 80.6, 78.5, 77.8, 75.8, 75.7, 75.4, 72.4, 55.6, 50.8, 50.1, 32.4, 31.9, 30.2-29.3 (10C), 28.3, 26.0, 25.9, 22.6, 14.1. HRMS. Calculado para C₅₅H₇₈N₂O₆ (M+H⁺): 863.5938. Encontrado: 863.5943.

Reacciones de acilación de aminas

10 Ejemplo 21

(2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-isopropilidendioxi-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-2',3',4',5'-tetrabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida

15 A una disolución de (S)-1-((4*S*,5*R*)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-*N*²-((1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexil)etano-1,2-diamina (70 mg, 0.08 mmol) y ácido cerótico (32 mg, 0.08 mmol) en THF seco (10 mL) se añade EDC (23 mg, 0.12 mmol). La reacción se calienta a refuljo durante 12 h, se enfría a temperatura ambiente y se añade agua (10 mL). Se extrae con AcOEt, se lava con agua, NaCl sat y se seca la fase orgánica con MgSO₄. Se filtra y se concentra a vacío para dar un aceite que se purifica por cromatografía en columna en sílica gel
20 (hexano/AcOEt 7/3) para dar un sólido blanco (67 mg, 68%).

Pf = 72-74. $[\alpha]_D = +16.2$ (CDCl₃, C, 1.0); IR (film, cm⁻¹): 3325, 2918, 2850, 1650, 1470, 1095. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.32 (m, 20H); 5.98 (d, $J = 9.5$, 1H); 4.93 (d, $J = 11$, 1H); 4.87 (m, 2H); 4.83 (d, $J = 11$, 1H); 4.65 (m, 3H); 4.58 (d, $J = 11$, 1H); 4.19 (m, 1H); 4.13 (m, 1H); 4.00 (t, $J = 6.5$, 1H); 3.93 (t, $J = 9.5$, 1H); 3.87 (m, 1H); 3.09 (d, $J = 3$, 1H); 2.80 (dd, $J = 12, 3.5$, 1H); 2.20 (dt, $J = 15.5, 4$, 1H); 2.10 (m, 2H); 1.56 (m, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.27 (m, 73H); 0.89 (t, $J = 7$, 6H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.3, 138.8 (2C), 138.4, 138.3, 128.4-127.5 (20C), 107.7, 85.8, 82.8, 82.0, 77.9, 77.8, 77.7, 75.9, 75.8, 72.9, 72.4, 53.2, 48.5, 47.7, 37.0, 31.9, 29.7-29.3 (33C), 27.7, 26.6, 25.8, 25.3, 22.7, 14.1(2C). HRMS. Calculado para C₈₁H₁₂₈N₂O₇ (M+H⁺): 1241.9800. Encontrado: 1241.9766.

30 Ejemplo 22

(2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-isopropilidendioxi-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-2',3',4',5'-tetrabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida

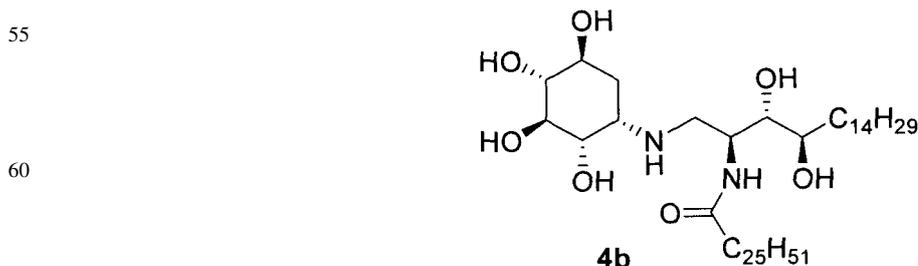
35 Por reacción de (S)-1-((4*S*,5*R*)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-*N*²-((1*R*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexil)etano-1,2-diamina con ácido cerótico y EDC, de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 21, se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 63%.

40 Pf = 85-87°C. $[\alpha]_D = -8$ (CHCl₃, C, 1.0); IR (neat, cm⁻¹): 3331, 2925, 2849, 1664, 1444, 1111. ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.34 (m, 20H); 5.97 (br, 1 H); 5.04-4.68 (m, 8H); 4.02 (m, 2H); 3.95 (m, 1H); 3.52 (m, 3H); 3.31 (m, 1H); 3.02 (d, $J = 12.5$, 1H); 2.64 (d, $J = 13$, 1H); 2.46 (m, 1H); 2.29 (m, 1H); 1.96 (m, 2H); 1.62 (br, 1H); 1.55 (m, 3H); 1.40 (s, 3H); 1.32 (s, 3H); 1.26 (m, 70H); 0.89 (t, $J = 7$, 6H). ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 172.5, 138.6, 138.4 (2C), 138.3, 128.5-127.6 (20C), 107.7, 85.8, 84.7, 84.6, 78.5, 77.7, 77.0, 75.9, 75.8, 75.7, 72.6, 57.1, 48.3, 46.9, 36.7, 33.4, 31.9, 29.7-29.3 (31 C), 29.0, 27.9, 26.5, 25.7, 25.3, 22.7, 14.1 (2C). HRMS. Calculado para C₈₁H₁₂₈N₂O₇ (M+H⁺):
45 1241.9800. Encontrado: 1241.9773.

Reacciones de debencilación de productos procedentes de aperturas de aziridinas

50 Ejemplo 23

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5-tetrahidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol (Compuesto 4b)



65 De acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 9 se tratan 30 mg (0,024 mmol) de (2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-isopropilidendioxi-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-2',3',4',5'-tetrabenciloxiciclohexilamino)octadecan-2-il)hexacosanamida con

ES 2 345 377 A1

BCl₃ (1M en heptano, 0.24 mL, 0.24 mmol). Para dar 15 mg (0,015 mmol, 73%) del hidrocloreto de (2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol en forma de sólido blanco.

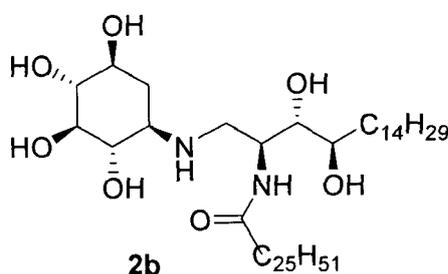
5 Pf = 213-215. [α]_D = -25 (MeOH, C, 0.2); IR (neat, cm⁻¹): 3351 (br), 2942, 2833, 1642, 1433, 1021; ¹H-NMR (MeOH, 500 MHz, 50°C): δ 4.33 (c, *J* = 5, 1H); 3.90 (dd, *J* = 7, 4, 1H); 3.84 (m, 1H); 3.65 (m, 4H); 3.53 (m, 2H); 3.13 (dd, *J* = 13, 6.5, 1H); 2.27 (m, 2H); 1.78 (m, 1H); 1.64 (m, 3H); 1.32 (m, 70H); 0.92 (t, *J* = 7, 6H). ¹³C-NMR (DMSO, 100 MHz): δ 174.0, 75.9, 75.5, 72.8, 71.8, 70.5, 68.2, 56.6, 48.2, 46.5, 36.1, 33.1, 31.9, 29.7-29.3 (31C), 28.8, 25.9, 25.8, 22.7, 14.5 (2C). HRMS. Calculado para C₅₀H₁₂₇N₂O₇ (M+H⁺): 841.7609. Encontrado: 841.7628.

10

Ejemplo 24

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol (Compuesto 2b)

15



30

De acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 9 se tratan 30 mg (0.024 mmol) de (2*S*,3*S*,4*R*)-(3,4-isopropilidendioxi-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*)-2',3',4',5'-tetrabencilociclohexilaminooctadecan-2-il)hexacosamida con BCl₃ (1M en heptano, 0.24 mL, 0.24 mmol). Se obtienen 10 mg (0,011 mmol, 46%) del hidrocloreto de (2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol en forma sólido blanco.

35

Pf = 227-229. [α]_D = +12 (MeOH, C, 0.2); IR (neat, cm⁻¹): 3343 (br), 29512, 2812, 1668, 1427, 1007; ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz, 60°C): 4.22 (m, 1H); 3.81 (m, 1H); 3.48-2.98 (m, 8H); 2.13 (m, 3H); 1.46 (m, 5H); 1.26 (m, 68H); 0.87 (m, 6H). HRMS. Calculado para C₅₀H₁₂₇N₂O₇ (M+H⁺): 841.7609. Encontrado: 841.7628.

40

Preparación de compuestos de fórmula (I) a partir de otros aminociclitoles

Ejemplo 25

45

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxi-6-metoxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol

Este compuesto fue preparado en cuatro etapas: 1) siguiendo el método descrito en el ejemplo 17 por reacción de (1*S*,2*S*,3*R*,4*R*,5*S*,6*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)-6-metoxiciclohexanamina con (*S*)-2-((4*S*,5*R*)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina [Y. Harrak *et al.* Eur J Org. Chem 2008, 4647-4654] para dar la correspondiente amina (79% rendimiento) 2) desprotección del grupo nitrobenzenosulfonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 19 para dar el compuesto (*S*)-1-((4*S*,5*R*)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-*N*²-((1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)-6-metoxiciclohexil)etano-1,2-diamina (78% rendimiento) 3) Acilación con ácido cerótico de la amina primaria siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 21 para dar la amida con un rendimiento del 76%; y 4) desprotección de los sustituyentes hidroxilados mediante reacción con BCl₃ siguiendo el procedimiento detallado en el ejemplo 9 para dar con un 91% de rendimiento el hidrocloreto de (2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxi-6-metoxiciclohexilamino) octadecano-3,4-diol en forma de aceite denso.

60

[α]_D = -9 (MeOH, 0.5); IR (film, cm⁻¹): 3364 (br), 2948, 2828, 1671, 1436, 1063. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz, 50°C): δ 4.34 (m, 1H); 4.26 (m, 1H); 4.20 (m, 1H); 4.04 (m, 1H); 3.91 (m, 1H); 3.86 (m, 1H); 3.70 (m, 2H); 3.47 (s, 3H); 3.25 (m, 1H); 2.25 (m, 2H); 1.60 (m, 4H); 1.28 (m, 68H); 0.90 (m, 6H). ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz, 55°C): δ 177.5, 77.8, 76.8, 74.6, 73.8, 73.6, 71.0, 59.5, 58.0, 50.1, 49.6, 48.8, 37.9, 34.5, 33.8 (2C), 31.6-31.2 (29C), 27.8, 27.6, 24.5 (2C), 14.2(2C). HRMS. Calculado para C₅₁H₁₀₃N₂O₈ (M+H⁺): 871.7714. Encontrado: 871.7755.

65

ES 2 345 377 A1

Ejemplo 26

(2S,3S,4R)-2-Hexacosanamido-1-(1'S,4'S,5'S,6'S)-4',5',6'-trihidroxiciclohexenilaminoctadecano-3,4-diol

5 Este compuesto fue preparado en cuatro etapas: 1) siguiendo el método descrito en el ejemplo 17 por reacción de (1S,4S,5S,6S)-4,5-isopropilidendioxi-3-hidroxiciclohexenilamina con (S)-2-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina [Y. Harrak *et al.* Eur J Org. Chem 2008, 4647-4654] para dar la correspondiente amina (97% de rendimiento) 2) desprotección del grupo 2-nitrobenzenosulfonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 19 para dar el compuesto (S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1'S,4'S,5'S,6'S)-4',5'-isopropilidendioxi-3'-hidroxiciclohexenil)etano-1,2-diamina (78% rendimiento) 3) Acilación con ácido cerótico de la amina primaria siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 21 para dar (2S,3S,4R)-(3,4-isopropilidendioxi)-1-(1'S,4'S,5'S,6'S)-4',5'-isopropilidendioxi-3'-hidroxiciclohexenilaminoctadecano-2-il)hexacosanamida con un rendimiento del 75%; y 4) desprotección de los sustituyentes hidroxilados mediante reacción con metanol y ácido clorhídrico siguiendo el siguiente procedimiento.

15 A una disolución de la amida obtenida en el paso 3 (18 mg, 0.02 mmol) en 10 mL de CH₃OH se añade una gota de HCl (36% en agua) y se agita durante 24 h. Se evaporan los disolventes para dar un aceite que solidifica lentamente (30 mg, 92%).

20 $[\alpha]_D = +4$ (MeOH, C, 0.5); IR (film, cm⁻¹): 3427 (br), 2973, 1659, 994. ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz, 70°C, mezcla de rotámeros y confórmeros); δ : 5.80 (d, J = 10.5, 1H), 5.70 (d, J = 10.5, 1H); 4.85 (m, 1H); 4.23 (m, 2H), 3.95 (m, 2H); 3.82 (m, 2H), 3.40 (m, 2H); 2.37 (m, 2H); 1.55 (m, 4H), 1.24 (m, 68H); 0.85 (m, 6H). ¹³C-NMR (DMSO, 100 MHz, 60°C, mezcla de rotámeros y confórmeros): δ 172.0, 134.6, 119.4, 74.9, 70.5, 69.9, 65.8, 64.2, 55.3, 47.4, 43.3, 35.3, 33.7, 30.9, 28.6 (30 C), 24.7, 24.0, 21.7 (2C), 13.3 (2C). HRMS. Calculado para C₅₀H₉₉N₂O₆ (M+H⁺): 823.7503. Encontrado: 823.7546.

Ejemplo 27

(2S,3S,4R)-2-Hexacosanamido-1-(1'S,4'S,5'S,6'S)-4',5',6'-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol

30 Se prepara por hidrogenación catalítica con Pd/C al 5% (5 mg) que se añaden a a una disolución de 5 mg de (2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-(1'S,4'S,5'S,6'S)-4',5',6'-trihidroxiciclohexenilamino)octadecano-3,4-diol en 5 mL de metanol. La mezcla se agita bajo 1 atm de hidrógeno durante 24 horas a temperatura ambiente. Se filtra el catalizador y se concentra para dar el compuesto con rendimiento cuantitativo.

35 $[\alpha]_D = -5$ (MeOH, C, 0.5); IR (film, cm⁻¹): 3429 (br), 2859, 1670, 978. ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz, 60°C, mezcla de rotámeros y confórmeros); δ 8.90 (br, 3H), 8.17 (br, 1H), 4.20-3.08 (m, 8H), 2.32 (m, 2H); 2.14 (m, 1H), 1.80-1.22 (m, 75H); 0.84 (m, 6H). ¹³C-NMR (DMSO, 100 MHz, 60°C, mezcla de rotámeros y confórmeros): δ 173.0, 75.8, 72.5, 71.6, 68.3, 66.8, 57.2, 50.5, 44.5, 36.2, 34.7, 32.9, 32.0, 30.9, 29.7 (30C), 26.6, 25.0, 22.7 (2C), 14.3 (2C). HRMS. Calculado para C₅₀H₁₀₀N₂O₆ (M+H⁺): 825.7660. Encontrado: 823.7624.

Ejemplo 28

(2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-((1'S,2'S,3'S,4'S,5'S,6'R)-5'-hidroximetil-2',3',4',6',-tetrahidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol

Este compuesto fue preparado en cuatro etapas:

50 1) formación de la amina siguiendo el método descrito en el ejemplo 17 por reacción de (1S,2S,3S,4S,5S,6R)-5-hidroximetil-2,3,4,5-tetrakis(benciloxi)ciclohexilamina con (S)-2-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina [Y. Harrak *et al.* Eur J Org. Chem 2008, 4647-4654] para dar la correspondiente amina (83% rendimiento)

55 2) desprotección del grupo nitrobenzenosulfonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 19 para dar el compuesto (S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1'S,2'S,3'S,4'S,5'S,6'R)-5'-hidroximetil-2',3',4',6'-tetrakis(benciloxi))etano-1,2-diamina (79% rendimiento);

60 3) Acilación con ácido cerótico de la amina primaria en dicha diamina siguiendo un procedimiento análogo al descrito en el ejemplo 21 para dar (2S,3S,4R)-(3,4-isopropilidendioxi)-1-(1'S,2'S,3'S,4'S,5'S,6'R)-5'-hidroximetil-2,3,4,6-tetrabenciloxiciclohexilaminoctadecano-2-il)hexacosanamida correspondiente con un rendimiento del 79%;

65 y 4) desprotección de los sustituyentes hidroxilados de dicha amida mediante hidrogenación catalítica siguiendo el siguiente procedimiento. Una disolución de (0.02 mmol) en 10 mL de CH₃OH conteniendo dos gotas de HCl conc. se agita bajo H₂ (2 atm) en presencia de 10 mg de Pd-C, 5% durante 48 h. La mezcla de reacción se filtra y se concentra a presión reducida para dar el hidrocloreto de (2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-((1'S,2'S,3'S,4'S,5'S,6'R)-5'-hidroximetil-2',3',4',6'-tetrahidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol en forma de sólido ligeramente marrón con un rendimiento del 85%.

ES 2 345 377 A1

Pf = 277-279, $[\delta]_D = +3$ (MeOH, C, 0.5); IR (film): 34000-3200 (br), 2861, 1672, 985. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz); δ 4.36 (m, 1H); 4.26 (m, 1H), 4.14 (m, 3H); 4.00 (m, 2H); 3.92-3.57 m (m, 3H); 3.44 (dd, $J = 12.5, 6.5$, 1H); 3.26 (dd, $J = 12.5, 6$, 1H); 2.45 (m, 1H); 2.40 (br, 1H); 2.26 (m, 2H); 1.63 (m, 4H); 1.23 (m, 68H); 0.90 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100 MHz, 60°C): δ 173.3, 75.6, 71.7, 71.4, 67.1, 66.3 (2C), 59.5, 57.1, 46.5, 45.6, 41.8, 35.7, 31.4(2C), 29.7-28.8 (29C), 25.5, 25.3, 22.1 (2C), 13.5, 13.4. HRMS. Calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{102}\text{N}_2\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 871.7714. Encontrado: 871.7713.

Ejemplo 29

10 *(2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-((1'S,2'S,3'S,4'S,5'R)-5-hidroximetil-2',3',4',-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol*

Este compuesto fue preparado en cuatro etapas:

15 1) siguiendo el método descrito en el ejemplo 17 por reacción de (1S,2S,3S,4S,5R)-5-hidroximetil-2,3,4-tris(benciloxi)ciclohexilamina con (S)-2-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina [Y. Harrak *et al.* Eur J Org. Chem 2008, 4647-4654] para dar la correspondiente amina (88% rendimiento);

20 2) desprotección del grupo nitrobenzenosulfonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 19 para dar el compuesto (S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1'S,2'S,3'S,4'S,5'R)-5'-hidroximetil-2',3',4'-tris(benciloxi)etano-1,2-diamina (69% rendimiento);

25 3) Acilación con ácido cerótico de la amina primaria siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 21 para dar (2S,3S,4R)-(3,4-isopropilidendioxi-1-(1'S,2'S,3'S,4'S,5'R)-5'-hidroximetil-2',3',4'-tribenciloxiciclohexilaminoctadecano-2-il)hexacosanamida con un rendimiento del 74%;

30 y 4) desprotección de los sustituyentes hidroxilados mediante reacción con metanol y ácido clorhídrico siguiendo el siguiente procedimiento: una disolución de (0.02 mmol) en 10 mL de CH_3OH conteniendo dos gotas de HCl conc. se agita bajo H_2 (2 atm) en presencia de 10 mg de Pd-C, 5% durante 48 h. La mezcla de reacción se filtra y concentra a vacío para dar el hidrocloreuro de (2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-((1'S,2'S,3'S,4'S,5'R)-5-hidroximetil-2',3',4'-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol en forma de sólido ligeramente marrón con un rendimiento del 88%.

35 IR (film, cm^{-1}): 3300-3400 (br), 2966, 2851, 1659, 1440, 1024. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz); δ 4.8 (br, 1H); 4.22 (br, 1H); 3.85-3.15 (m, 10H); 2.44 (m, 2H); 2.15(m, 1H); 2.0 (m, 1H); 1.7 (m, 1H); 1.5 (m, 2H); 1.23 (m, 70H); 0.84 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100 MHz, 60°C): δ 174.9, 76.3, 73.4, 71.8, 68.9, 68.8, 61.4, 58.2, 48.4, 38.7, 36.5, 33.3, 31.8(2C), 29.7-29.0 (30 C), 25.8, 25.1, 22.7 (2C), 14.2 (2C). HRMS. Calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{102}\text{N}_2\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 871.7765. Encontrado: 871.7742.

40 Ejemplo 30

(2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-((1'R,2'S,3'S,4'S,5'R)-5-hidroximetil-2',3',4'-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol

45 Este compuesto fue preparado en cuatro etapas:

50 1) siguiendo el método descrito en el ejemplo 17 por reacción de (1R,2S,3S,4S,5R)-5-hidroximetil-2,3,4-tris(benciloxi)ciclohexilamina con (S)-2-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-1-(2-nitrofenilsulfonil)aziridina (cfr. Y. Harrak *et al.*, Eur J Org. Chem 2008, 4647-4654) para dar la correspondiente amina (88% rendimiento);

55 2) desprotección del grupo nitrobenzenosulfonilo de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 19 para dar el compuesto (S)-1-((4S,5R)-2,2-dimetil-5-tetradecil-1,3-dioxolan-4-il)-N²-((1'R,2'S,3'S,4'S,5'R)-5'-hidroximetil-2',3',4'-tris(benciloxi)etano-1,2-diamina (69% rendimiento);

3) Acilación con ácido cerótico de la amina primaria siguiendo el procedimiento descrito en el ejemplo 21 para dar (2S,3S,4R)-(3,4-isopropilidendioxi-1-(1'R,2'S,3'S,4'S,5'R)-5'-hidroximetil-2,3,4-tribenciloxiciclohexilaminoctadecano-2-il)hexacosanamida con un rendimiento del 74%;

60 y 4) desprotección de los sustituyentes hidroxilados mediante reacción con metanol y ácido clorhídrico siguiendo el siguiente procedimiento: una disolución de 22.5 mg (0.018 mmol) de la amida en 10 mL de CH_3OH conteniendo dos gotas de HCl conc. se agita bajo H_2 (2 atm) en presencia de 10 mg de Pd-C, 5% durante 48 h. La mezcla de reacción se filtra y concentra a vacío para dar 14 mg (0.015 mmol) del hidrocloreuro de (2S,3S,4R)-2-hexacosanamido-1-((1'R,2'S,3'S,4'S,5'R)-5-hidroximetil-2',3',4'-trihidroxiciclohexilamino)octadecano-3,4-diol en forma de sólido ligeramente marrón con un rendimiento del 81%.

65 IR (neat, cm^{-1}): 3381 (br), 2963, 2841, 1655, 1439, 1024. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz); δ 4.83 (br, 1H); 4.23 (br, 1H); 3.85-3.17 (m, 10H); 2.42 (m, 2H); 2.13 (m, 1H); 2.00 (m, 1H); 1.71 (m, 1H); 1.51 (m, 2H); 1.23 (m, 70H); 0.84 (m, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 100 MHz, 60°C): δ 173.9, 76.1, 73.4, 71.7, 68.9, 68.7, 61.6 58.0, 48.3, 38.6, 36.1, 33.1,

ES 2 345 377 A1

31.9(2C), 29.7-29.3 (30C), 25.9, 25.1, 22.6 (2C), 14.4 (2C). HRMS. Calculado para $C_{51}H_{102}N_2O_7$ (M+H⁺): 871.7765. Encontrado: 871.7742

Ensayos biológicos de los compuestos de fórmula (I)

5

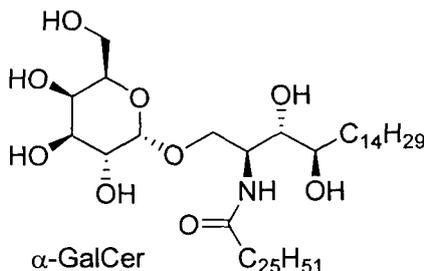
Ejemplo 31

Determinación de la expansión de células iNKT de ratón inducida por los compuestos de tipo aminociclitol *in vitro*

10 La determinación de la capacidad de inducir la activación de las células iNKT por los compuestos de la invención se realizó de acuerdo con los métodos conocidos por un experto en la materia.

15 En primer lugar, se determinó la capacidad de inducir la proliferación específica de iNKT de ratón mediante experimentos de cultivos *in vitro*. Para ello se aislaron células de bazo provenientes de ratones B57Bl/6 de hembras entre 10 a 20 semanas y se eliminaron los hematíes mediante lisis hipotónica. Las células de bazo se distribuyen en placas de 96 pocillos en U, entre 100.000 y 500.000 células por pocillo y se incuban en presencia de cada uno de los compuestos 1a, 1b, 2b, 3a, 3b y 4b a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio de cultivo RPMI-1640, 10% suero fetal, 100 mM glutamina, 1% metanol. Al día 2 de cultivo se añadió interleucina 2 humana recombinante, a una concentración final de 25 unidades/mL, condiciones que no indujeron la proliferación inespecífica de las células NK. 20 El cultivo se analizó a día 5 ó 6 mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos específicos del TCR y NK1.1 En presencia del control α -GalCer:

25



35

40 la población de células NKT se expandió más de 5 veces sobre las condiciones basales, en concordancia con los resultados establecidos en la literatura científica. En las mismas condiciones, el compuesto 4b induce una fuerte proliferación de las iNKT, similar a la α -GalCer, representando un aumento del 1,2 al 6,2% de las células T (fig 1). Asimismo, los compuestos 3a y 3b, inducen una débil expansión de las iNKT (aproximadamente 2 veces), pero los resultados son demasiado pequeños para atribuir una capacidad inestimuladora de forma inequívoca. El uso de dimetilsulfóxido (DMSO) en vez de metanol como disolvente o el uso de concentraciones superiores de los compuestos, sólo permiten confirmar la tendencia estimuladora sobre las iNKT, pero los experimentos muestran una variabilidad demasiado elevada como para extraer conclusiones definitivas, debido a la baja solubilidad de los compuestos. 45

Cuantificación de la capacidad estimuladora de las células iNKT del compuesto 4b

50 Los ligandos glicolipídicos de CD1d inducen una desviación de la producción de citocinas por parte de las células iNKT hacia Th1 o Th2, dependiendo de su capacidad de ser presentados por CD1d y de sus características estructurales reconocidas por el TCR. Para cuantificar más precisamente la capacidad inestímuladora del compuesto 4b y determinar si induce una desviación de la respuesta iNKT, se titula su capacidad de inducir la producción de IFN γ e IL-4 en los cultivos celulares usando diferentes concentraciones, y comparándola con los dos ligandos prototípicos, α -GalCer y OCH (disueltos en MeOH), que han sido descritos como inductores de de una respuesta Th1 y Th2 respectivamente. 55

60 El compuesto 4b induce la producción de IFN γ a una concentración de 333 ng/mL, alcanzando el plateau de máxima respuesta a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo éste de menor magnitud y a una mayor concentración de compuesto que en el caso de la respuesta producida por α -GalCer (fig. 3a). α -GalCer se representa como aGC en las figuras 2 y 3. El compuesto 4b induce una mayor producción relativa de IL-4 frente a IFN γ , comparada con la inducida por aGalCer (relación de IFN γ /IL-4 de 2 en el caso del compuesto 4b frente a una relación de 10 en el caso de α -GalCer). Esta capacidad de inducción de IL-4 se mantiene con alta eficiencia a una concentración de 100 ng/mL, siendo aún significativa a 33 ng/mL (fig 3b). Comparando con el prototipo de respuesta Th2, OCH, el compuesto 4b induce una menor respuesta, pero conserva un perfil similar, de forma que ambos compuestos mantienen una capacidad muy superior de inducción de IL-4 frente a IFN γ a dosis menores, en contraste con el alto perfil Th1 de la α -GalCer. Por tanto, el compuesto 4b induce preferiblemente una respuesta de tipo Th2 tras su reconocimiento por las iNKT. 65

Cultivos celulares

Esplenocitos de ratones C57BL/6 se obtienen mediante aislamiento del bazo de ratones hembras de 8 a 12 semanas de edad, según protocolos aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal y Humana de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los bazos son disgregados con el émbolo de una jeringa en placas de 60 mL en cabina de flujo laminar, eliminando los hematíes con tampón de lisis (Sigma-Aldrich). 5×10^5 células se depositan en pocillos de placas de 96 con fondo en U y se incuban con 100 ng/mL de α -GalCer, OCH, o 1 μ g/mL de los compuestos 1a, 1b, 2b, 3a, 3b, y 4b en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS) (Labclinics), 2-mercaptoetanol 50 μ M, L-glutamina 2 mM y 1% de metanol (concentración no tóxica para las células) y se cultivan a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ humidificada. Se añaden 25 U/mL de interleucina 2 humana recombinante a día 2 de cultivo.

Para las determinaciones de IL-4 e IFN γ , se toman los sobrenadantes de cultivo a día 4 o día 7 y se almacenan a -70°C o se usan inmediatamente en ensayos de ELISA (eBioscience) para la cuantificación de citocinas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las curvas estándar se generan con las citocinas recombinantes incluidas en el kit. La significación estadística de los resultados se analiza usando un test de t-Student, considerándose significativas diferencias con un $p < 0,01$.

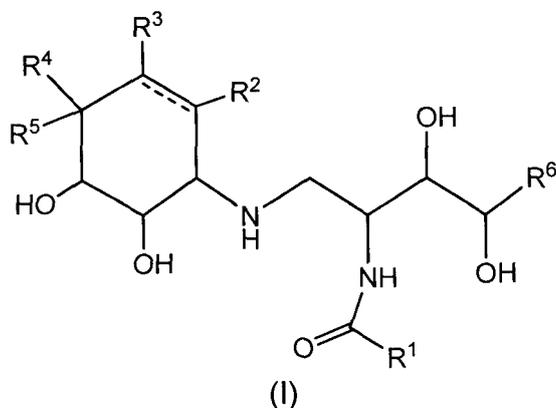
Los compuestos 1a, 1b, 2b, 3a, 3b, y 4b se resuspenden en 100% de metanol o 100% dimetilsulfóxido a una concentración de 1 mg/mL, y se prepara una dilución de uso 1/10 en PBS, con una concentración final de 100 μ g/mL. Los compuestos se calientan a 56°C durante 10-30 min y se sonicán, antes de ser diluidos en medio de cultivo completo, con una concentración final de 1% del vehículo en el ensayo celular.

Análisis por citometría de flujo

Los cultivos de esplenocitos cultivados en las condiciones indicadas se analizan mediante citometría de flujo en un FACS Calibur (Beckton Dickinson Bioscience) para cuantificar los niveles de proliferación de las iNKT tras la incubación con los compuestos 1a, 1b, 2b, 3a, 3b, y 4b. Los cultivos de bazo estimulados son lavados y preincubados con 50 μ l de medio de tinción (PBS con 2% de FCS) con anti-CD16 (clone 2.4G2) durante 20 min en hielo. Posteriormente se lavan y se resuspenden las células en medio de tinción con anticuerpo anti-TCR de ratón conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clone H57-597, BD-Pharmingen) y anti-NK1.1 conjugado con avidina (clone PK-136, BD-Pharmingen) durante 30 min en hielo. Se lavan las células y se resuspenden en medio de tinción con estreptavidina-phicoeritrina (Southern Biotechnology) durante 30 min en hielo. Se lavan dos veces las células y se resuspenden en medio de tinción. Las muestras se analizan en el citómetro de flujo (FACS Calibur) y los datos se procesan usando el programa CellQuest (BD Bioscience).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



5

10

15

20

25 donde:

R^1 es un grupo alquilo (C_5-C_{35}), sustituido o no sustituido.

30

R^2 , R^3 , R^4 y R^5 son iguales o diferentes entre sí y se seleccionan de la lista que comprende hidrógeno, hidroxilo, alcoxilo o alquilo (C_1-C_6), sustituido o no sustituido;

R^6 se selecciona de la lista que comprende un alquilo (C_5-C_{35}), arilo, cicloalquilo, heterociclo; y

---- representa la existencia o no de un doble enlace;

35

o un isómero, sus sales y/o solvato del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde R^1 es un grupo alquilo (C_7-C_{25}).

40

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde R^2 , R^3 , R^4 y/o R^5 son hidroxilo.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde R^4 es hidroxilo y/o R^5 es hidrógeno.

45

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R^2 es hidrógeno o alcoxilo.

6. Compuesto según la reivindicación 5, donde R^2 es metoxilo.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R^3 es hidroxilo o un hidroxialquilo (C_1-C_3).

50

8. Compuesto según la reivindicación 7, donde R^3 es hidroximetilo.

9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R^6 es un grupo alquilo ($C_{10}-C_{20}$).

55

10. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-octanamido-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*SR*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

60

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*rs*,2'*RS*,3'*SR*,4'*sr*,5'*RS*,6'*SR*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-octanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2',3',4',5',6'-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

65

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5,6-pentahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

ES 2 345 377 A1

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*R*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

5 (2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-(1'*S*,2'*S*,3'*R*,4'*R*,5'*S*,6'*S*)-2,3,4,5,-tetrahidroxil-6-metoxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-4',5',6'-trihidroxiciclohexenilaminooctadecano-3,4-diol;

10 (2*S*,3*S*,4*R*)-2-Hexacosanamido-1-(1'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*)-4',5',6'-trihidroxiciclohexilaminooctadecano-3,4-diol;

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-((1'*S*,2'*S*,3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*R*)-5-hidroximetil-2,3,4,6,-tetrahidroxiciclohexilamino) octadecano-3,4-diol;

15 (2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-((1'*S*,2'*S*,3'*S*,4'*S*,5'*R*)-5-hidroximetil-2,3,4,-trihidroxiciclohexilamino) octadecano-3,4-diol; o

(2*S*,3*S*,4*R*)-2-hexacosanamido-1-((1'*R*,2'*S*,3'*S*,4'*S*,5'*R*)-5-hidroximetil-2,3,4,-trihidroxiciclohexilamino) octadecano-3,4-diol.

20

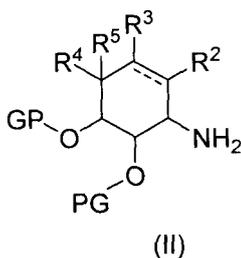
11. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho compuesto es una sal de un clorhidrato.

12. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula general (I) que comprende:

25

- el acoplamiento de un aminociclitol de fórmula general (II)

30

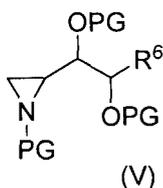


35

40

con una aziridina de fórmula general (V) mediante ataque nucleofílico,

45

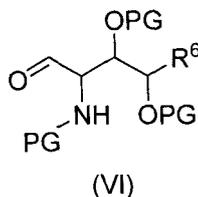


50

55

o con un aldehído de fórmula general (VI) mediante aminación reductiva:

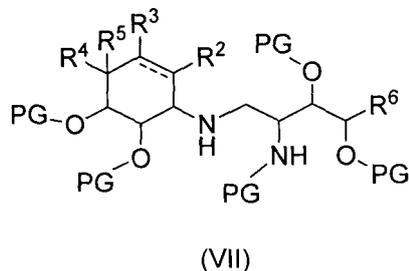
60



65

ES 2 345 377 A1

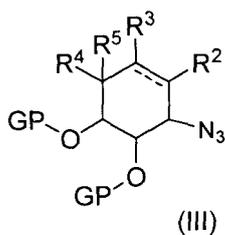
para dar los compuestos intermedios (VII),



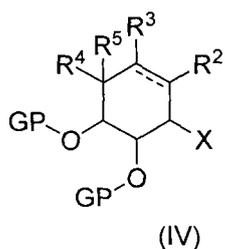
- 15
- y la posterior eliminación de los grupos protectores PG y acilación,
- 20
- donde: R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ están descritos en la reivindicación 1 y PG es un grupo protector.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde el aminociclitol de fórmula general (II) se obtiene:

- 25
- por reducción del compuesto de fórmula general (III);



- 35
- o por sustitución de compuestos de fórmula general (IV)
- 40



55

donde: R¹, R², R³, R⁴ y R⁵ están descritos en la reivindicación 1, X es haluro o sulfonato y PG es un grupo protector.

14. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica.

60

15. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de enfermedades a través de la estimulación de las células iNKT.

65

16. Uso según la reivindicación 15, donde las enfermedades tratables o prevenibles a través de la estimulación de las células iNKT se seleccionan de la lista que comprende: enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones microbianas o enfermedades inflamatorias.

ES 2 345 377 A1

17. Uso según la reivindicación 16, donde las enfermedades autoinmunes se seleccionan de la lista que comprende asma, EPOC, colitis crónica, diversas alergias, lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus de tipo 1, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren o artritis reumatoide.

5 18. Uso según la reivindicación 16, donde las infecciones causadas por microorganismos patógenos se seleccionan de la lista que comprende gripe, SIDA, hepatitis, clamidiosis, leishmaniosis, malaria, tuberculosis, tripanosomiasis, estreptococosis, o pseudomoniasis.

10 19. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20. Composición farmacéutica según la reivindicación 19 que además comprende otro principio activo.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

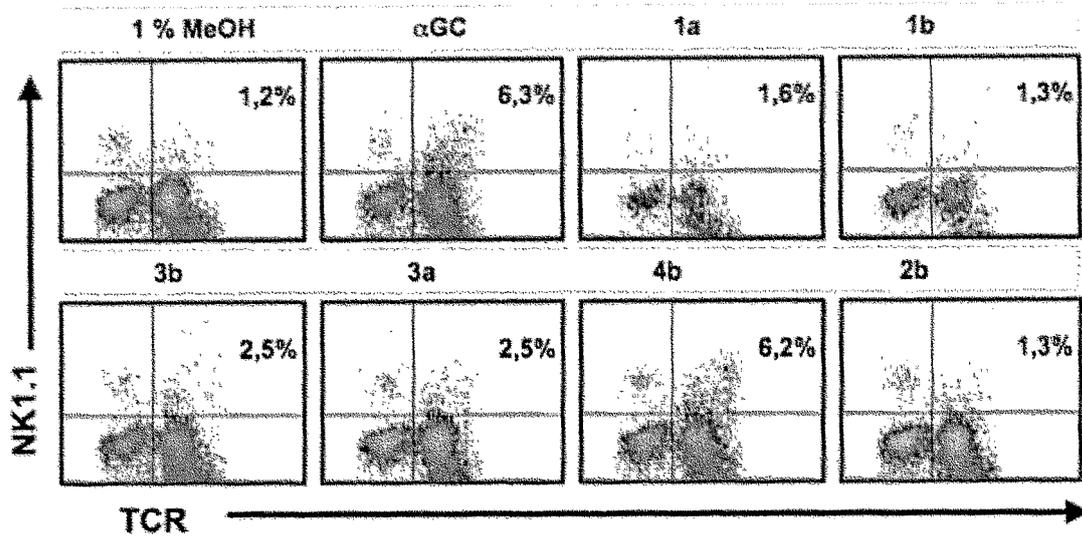


FIG. 1

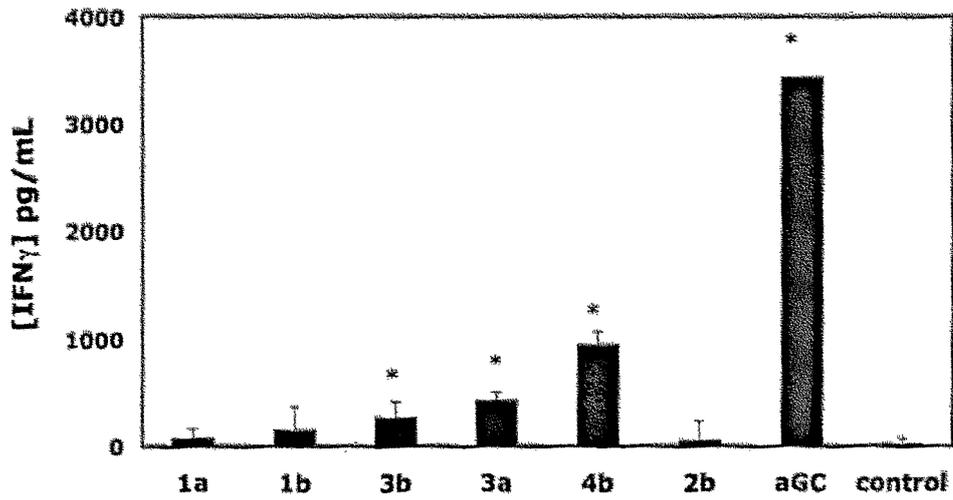


FIG. 2A

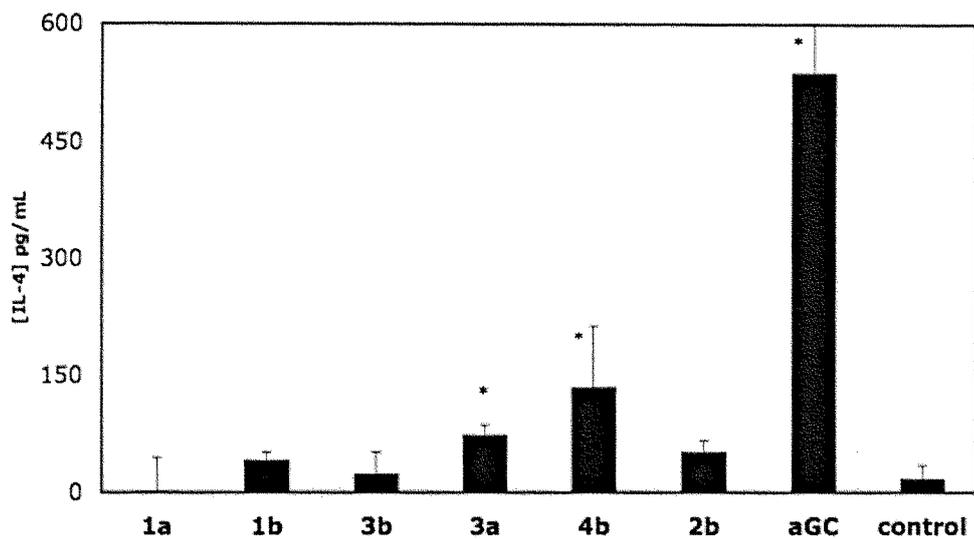


FIG. 2B

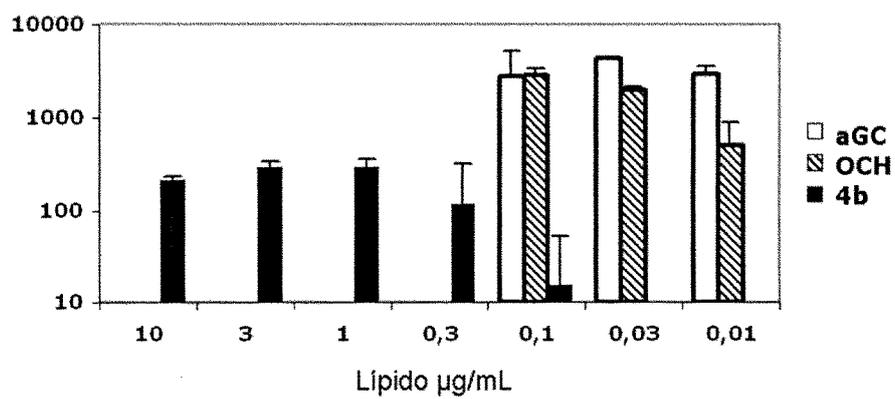


FIG. 3A

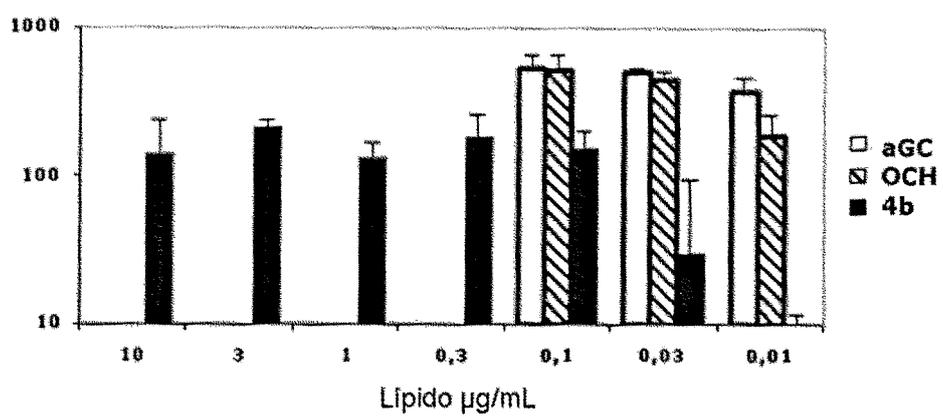


FIG. 3B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 345 377

② Nº de solicitud: 200900755

③ Fecha de presentación de la solicitud: **20.03.2009**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** **C07C 233/36** (2006.01)
C07H 5/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2008/128062 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY, THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE), 23-10-2008 todo el documento, citada en la solicitud	1-20
A	WO 2007/118234 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE), 18-10-2007 todo el documento	1-20
A	M Egido Gabas et al, Organic Biomolecular Chemistry 2005, vol 3, pp 1195-1201. "New aminocyclitols as modulators of glucosylceramide metabolism" resumen, introducción	1-20

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

07.06.2010

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/4

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

C07C

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

INVENES,EPODOC,WPI,CAS,REGISTRY

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200900755

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SÍ
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión:

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

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	WO 2008/128062 A1	23-10-2008
D02	WO 2007/118234 A2	18-10-2007
D03	Organic Biomolecular Chemistry 2005, vol 3, pp 1195-1201	2005

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

La solicitud se refiere a los compuestos aminociclitolos de fórmula general (I) (ver reivindicación 1), potencialmente análogos de galactosilceramida, al procedimiento de preparación de estos compuestos y a su uso en composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades asociadas con alteraciones de células iNKT.

El documento D1 divulga glicolípidos antígenos de células NKT de fórmulas (I) y (II) (ver resumen y reivindicaciones de D1), en los compuestos de la solicitud el resto glicosídico ha sido sustituido por un resto aminociclitol, es decir no se trata de un sacárido, por lo que los compuestos descritos en la solicitud son distintos de los divulgados en D1.

El mismo razonamiento se aplica al documento D2 en el que los compuestos divulgados (ver reivindicación 1) presentan un resto glicósido sustituido por nitrógeno en el carbono adyacente al oxígeno heterocíclico.

El documento D3 divulga aminociclitolos, ver fórmulas 1-13 en el esquema 1, y procedimientos para su síntesis (esquemas 3 y 4), no se divulgan compuestos con restos ceramida (ver sustituyentes R en los compuestos 10-13 y R2 en los compuestos 1-9) tal como los descritos en la solicitud.

Del estado de la técnica divulgado en los documentos D1, D2 y D3 se concluye que los compuestos de fórmula (I) descritos en las reivindicaciones 1-11 de la solicitud son nuevos y tienen actividad inventiva, pues no han sido divulgados compuestos de este tipo en los que se sustituya el resto sacárido por una ciclohexilamina ni resulta evidente que dicha sustitución sea una alternativa válida

al radical glicósido; asimismo el procedimiento para sintetizarlos (reivindicaciones 12 y 13) y su aplicación farmacéutica, puesto que se trata de productos nuevos.

Por tanto, se concluye que las reivindicaciones 1-20 de la solicitud son nuevas y tienen actividad inventiva, por lo que cumplen los criterios establecidos en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.