

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 951**

21 Número de solicitud: 201031642

51 Int. Cl.:
A61K 31/133 (2006.01)
A61K 31/164 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **08.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
04.06.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (Titular al 76%)
Serrano, 117
28006 Madrid, ES
UNIVERSIDAD DE BARCELONA (Titular al 24%)**

72 Inventor/es:
**ABAD SAIZ, JOSE LUIS;
FABRIAS DOMINGO, GEMMA;
CASAS BRUGULAT, JOSEFINA;
GARRIDO MARTINEZ, MARIA;
CAMACHO CASTILLO, LUZ DEL CARMEN;
SIMBARI, FABIO y
DELGADO CIRILO, ANTONIO**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **DERIVADOS DE AMINOETANOL SUSTITUIDOS EN C2 Y SU USO COMO ANTITUMORALES.**

57 Resumen:
Derivados de aminoetanol sustituidos en C2 y su uso como antitumorales.
La presente invención proporciona un grupo de compuestos con capacidad antitumoral a través de la inhibición de la ceramidasasa ácida y la dihidroceramida desaturasa para provocar un aumento de los niveles de dihidroceramidas celulares, así como a una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos y al uso de los mismos para la fabricación de un medicamento, y más particularmente un medicamento para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

ES 2 381 951 A1

DESCRIPCIÓN

Derivados de aminoetanol sustituidos en C2 y su uso como antitumorales.

La presente invención proporciona un grupo de compuestos con capacidad antiproliferativa o citotóxica a través de la inhibición de la ceramidasa ácida y la dihidroceramida desaturasa para provocar un aumento de los niveles de dihidroceramidas celulares, así como a una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos y el uso de los mismos para la fabricación de un medicamento, y más particularmente un medicamento para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las ceramidases son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de las ceramidas en esfingosina y ácidos grasos en mamíferos, bacterias y hongos. Según su pH óptimo, las ceramidases se agrupan en ácidas, neutras y alcalinas. Hasta la fecha, se han clonado y expresado de forma funcional cinco ceramidases distintas: la ceramidasa ácida, la neutra y tres alcalinas.

Existen evidencias que ponen de manifiesto el papel importante que desempeñan las ceramidases, especialmente la ceramidasa ácida, en el desarrollo y la progresión del cáncer, así como en la respuesta de los tumores a la terapia. La ceramidasa ácida está sobreexpresada en diversas líneas celulares y tejidos cancerosos, lo que parece contribuir a la disminución de los niveles de ceramida y al aumento de los de esfingosina-1-fosfato, con el consiguiente aumento de la proliferación celular y resistencia a la muerte celular. En muchos casos, la inhibición de la ceramidasa ácida conduce a apoptosis. En numerosos trabajos se confirma la relación entre el aumento de la actividad ceramidasa ácida y la resistencia a la radio y quimioterapia, así como el interés del uso de inhibidores de la ceramidasa ácida como fármacos anticancerosos, tanto solos como en combinación con otras terapias. En células de glioblastoma resistentes a la radiación se observaron niveles elevados en la expresión de ceramidasa ácida. El tratamiento de dichas células con *N*-oleoiletanolamina aumentó su sensibilidad frente a la radiación, con el consiguiente aumento de los niveles de ceramida, activación de caspasas y apoptosis.

Respecto a la ceramidasa neutra, no se ha examinado con tanto detalle su papel en el cáncer. Sin embargo, Wu y col [*Biochim Biophys Acta* **2009**, 1791, 730-739] comprobaron que la disminución de actividad ceramidasa neutra inducida por gemcitabina da lugar a una parada de ciclo celular en la fase G(0)/G(1) en un tipo particular de células endoteliales murinas. Por último, el aumento de la muerte celular inducida por el inhibidor de la ceramidasa neutra DMAPP es otro de los ejemplos que sustancia el papel de la ceramidasa neutra en el desarrollo y progresión del cáncer.

La búsqueda de inhibidores de la ceramidasa ácida ha recibido una mayor atención dado su interés como posibles fármacos antiproliferativos y citostáticos en la quimioterapia del cáncer. Uno de los primeros inhibidores descritos fue la *N*-oleoiletanolamina, usado solamente como herramienta farmacológica, puesto que su escasa potencia hace inviable su uso terapéutico. Se ha descrito que la *N*-oleoiletanolamina inhibe las ceramidases neutra y alcalina de queratinocitos, así como la glucosilación de las ceramidas naturales en células CHP-100 de neuroepitelioma a concentraciones no tóxicas, proceso que va acompañado de un aumento de ceramidas y la inducción de la apoptosis.

El compuesto B13 ((1*R*,2*R*)-2-(*N*-tetradecanoilamino)-1-(4-nitrofenil)-1,3-propanodiol) (Figura 1) es otro inhibidor de la ceramidasa ácida. Es selectivo de esta ceramidasa, ya que no modifica la actividad de las ceramidases neutra y alcalinas. El B13 induce la acumulación de ceramida y la muerte de células SW403 (adenocarcinoma humano), [Selzner y col *Cancer Res.* **2001**, 61, 1233-1240] melanoma, [Raisova y col *FEBS Lett* **2002**, 516, 47-52] y células LNCaP de próstata [Samsel y col *Prostate* **2004**, 58, 382-393]. Además, el B13 previene el crecimiento de tumores *in vivo* y sensibiliza tumores de próstata frente a la apoptosis inducida por radiación. Puesto que el B13 es una molécula neutra y lipófila, no es muy adecuada para alcanzar y acumularse en el lisosoma, el compartimento ácido en el que se encuentra la ceramidasa ácida. Por ello, se han diseñado diversos análogos estructurales con objeto de mejorar la capacidad de alcanzar la diana biológica. De estos trabajos han surgido tres familias de análogos con diferente especificidad respecto al orgánulo intracelular: a) alquilaminas lisosomotrópicas (por ejemplo, LCL204); b) análogos catiónicos mitocondriotrópicos (como el LCL85); c) análogos neutros sin selectividad respecto al compartimento en el que se acumulan (LCL15). Entre los análogos lisosomotrópicos, el LCL204 es capaz de localizarse selectivamente en lisosomas y de inducir apoptosis en células de cáncer de próstata y apoptosis inducida por Fas en células escamosas de cáncer. Sin embargo, el LCL204 (o AD2646) provoca la desestabilización lisosomal y una rápida degradación, dependiente de catepsina, de la ceramidasa ácida, lo que sugiere una falta de especificidad tumoral. Un efecto similar ha sido descrito para la desipramina, que es capaz de disminuir la actividad de la ceramidasa ácida por estimulación de su degradación proteolítica dependiente de catepsina, así como para otros compuestos anfifílicos (cloropromazina, cloroquina), aunque no para otros agentes lisosomotrópicos (cloruro amónico, bafilomicina A1).

Se ha descrito una nueva generación de inhibidores lisosomotrópicos de la ceramidasa ácida desprovistos de la capacidad desestabilizadora del lisosoma del LCL204. Este tipo de inhibidores muestran un grupo ω -aminoacilo junto con la combinación de elementos estructurales del B13 y del LCL204 (AD2646). Dentro de este grupo

destacan el LCL464, capaz de inhibir la ceramidasa ácida tanto *in vivo* como *in vitro*, pero sin capacidad para inducir su degradación proteolítica. Además, el compuesto LCL464 provoca un aumento de la apoptosis dependiente de caspasas en diversos tipos de cáncer.

5 De forma paralela al desarrollo de análogos del B13, se introdujeron modificaciones estructurales similares en la estructura del DMAPP. Este es un compuesto utilizado frecuentemente por sus propiedades inhibitorias de las ceramidasa neutra y alcalinas, tal y como se indica en el trabajo de [Bielawska y col *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, *16*, 1032-1045].

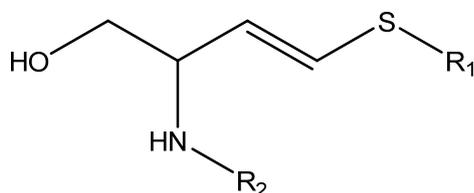
10 Por último, se han publicado diversas familias de inhibidores de la ceramidasa ácida con estructura de análogos de ceramidas o de aminoetanolos sustituidos en C2 [Bedia et al., *Org. Biomol. Chem.* 2005 *3*, 3707-12. Grijalvo et al., *Chem. Phys. Lipids.* 2006 *144*, 69-84. Bedia et al., *Chem. Phys. Lipids.* 2008 *156*, 33-40]. Una de estas familias posee estructura de tioéter, aunque presenta poca actividad citotóxica frente a células tumorales.

15 La enzima dihidroceramida desaturasa cataliza la última etapa de la secuencia de la biosíntesis *de novo* de la ceramida. Para esta enzima se han descrito dos homólogos, *Des1* y *Des2* [Ternes y col *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25512-25518; Omae y col *Biochem. J.* **2004**, *379*, 687-695]. El primero muestra una actividad dihidroceramida desaturasa elevada y una escasa actividad C4 hidroxilasa, mientras que el *Des2* muestra unos niveles de actividad similares como desaturasa y como hidrolasa. Los inhibidores descritos de la dihidroceramida desaturasa comprenden los esfingolípidos ciclopropénicos GT11 y derivados y el derivado de la tiadihidroceramida XM462. Además, se ha demostrado que la fenretinida inhibe la desaturación de la ceramida, [Zheng y col *Biochim Biophys Acta* **2006**, *1758*, 1864-1884; Kravcka y col *J Biol Chem* **2007**, *282*, 16718-16728; Illuzzi y col *J Biol Chem* *285*, 18594-18602], tal y como se sugiere en los trabajos de Schulz y col en *J Biol Chem* **2006**, *281*, 2784-2794. Este proceso de desaturación también resulta inhibido por el resveratrol, otro compuesto fenólico relacionado estructuralmente con la fenretinida y por el celecoxib, un inhibidor de la COX. La inhibición de *Des1* y el consiguiente aumento de los niveles intracelulares de dihidroceramida se han relacionado con la inducción de la autofagia y también con la parada del ciclo celular y la muerte celular por apoptosis.

25 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe una familia de compuestos con actividad antiproliferativa o citotóxica mediante la inhibición de la ceramidasa ácida y la dihidroceramida desaturasa.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



30 (I)

donde

R_1 se selecciona entre alquilo, cicloalquilo o arilo sustituidos o sin sustituir y R_2 se selecciona entre H o un grupo -C(O) R_3 , siendo R_3 -C(O)alquilo C_1 - C_{16} , alquilo, alqueno, alquino o arilo sustituidos o sin sustituir o sus sales, isómeros o solvatos farmacéuticamente aceptables.

35 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 18, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, decilo, dodecilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, arilo, mercapto y alquiltio, y preferiblemente carbonilo. Estas cadenas hidrocarbonadas también pueden tener insertados heteroátomos como O, S ó N.

45 El término "cicloalquilo" se refiere, en la presente invención, a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, tal como ciclopentilo, ciclohexilo o adamantilo y que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos tales como alquilo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término "alqueno" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 18, que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, y que están unidos al resto de la molécula por un enlace simple, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-

butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alqueniilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, arilo, mercapto y alquiltio. Estas cadenas hidrocarbonadas también pueden tener insertados heteroátomos como O, S ó N.

- 5 El término "alquinilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonada, lineal o ramificada, que tienen de 2 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 18, que tienen uno o más triples enlaces carbono-carbono y que están unidos al resto de la molécula por un enlace simple por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, etc. El grupo alquinilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro, arilo, mercapto y alquiltio. Estas cadenas hidrocarbonadas también pueden tener insertados heteroátomos como O, S ó N.

10 El término "arilo" se refiere en la presente invención a un radical fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo o antracilo, preferiblemente fenilo. El radical arilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como alquilo, haloalquilo, aminoalquilo, dialquilamino, hidroxilo, alcoxilo, fenilo, mercapto, halógeno, nitro, ciano y alcóxicarbonilo.

- 15 En una realización preferida R_1 es un alquilo $C_{10}-C_{18}$, en una realización más preferida R_1 es $-(CH_2)_{12}CH_3$.

En otra realización preferida R_1 es un *terc*-butilo.

En una realización preferida R_1 es un cicloalquilo, y en una realización más preferida R_1 es un ciclohexilo.

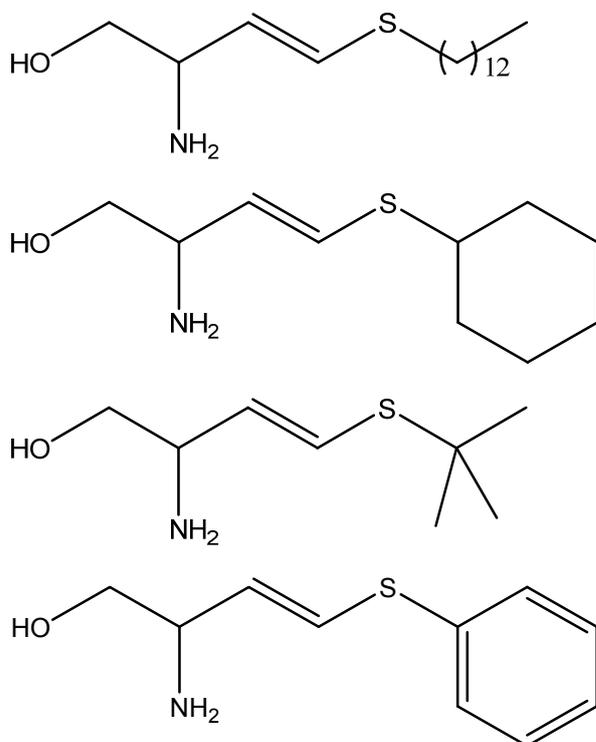
En otra realización preferida R_1 es un arilo, y en una realización más preferida R_1 se selecciona de entre fenilo, bencilo o naftilo.

- 20 Preferiblemente R_2 es un grupo $-C(O)R_3$. Más preferiblemente R_3 es un alquilo C_4-C_{15} , y aún más preferiblemente R_3 se selecciona de entre *terc*-butilo, heptilo, nonilo, undecilo, tridecilo o pentadecilo.

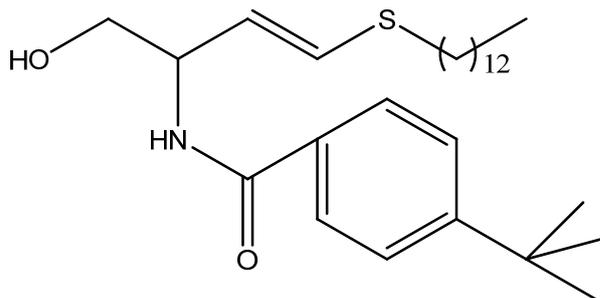
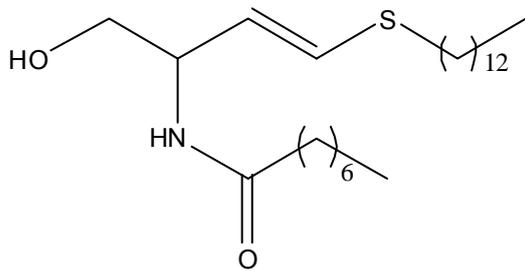
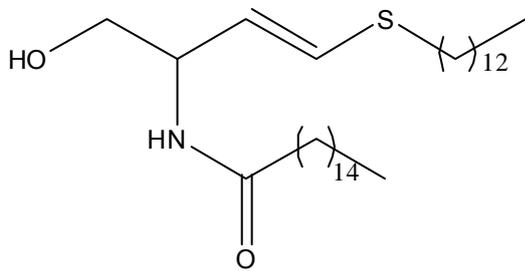
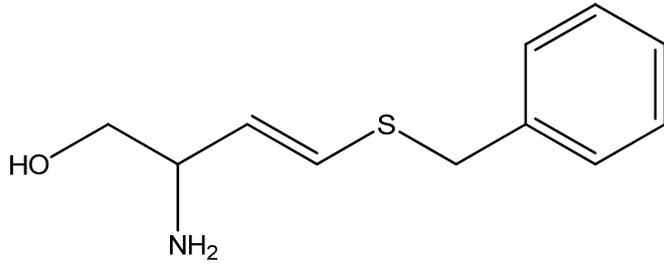
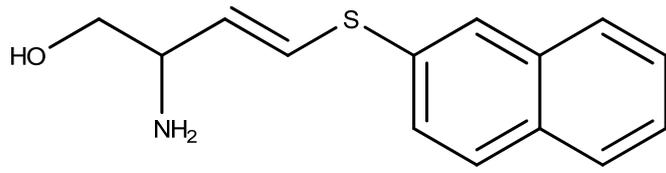
Preferiblemente, también puede ser R_3 un arilo, y aún más preferiblemente R_3 es un fenilo sustituido por un grupo alquilo C_1-C_6 , preferiblemente *terc*-butilo.

Más preferiblemente R_3 es un grupo $-C(O)$ -alquilo C_1-C_{16} .

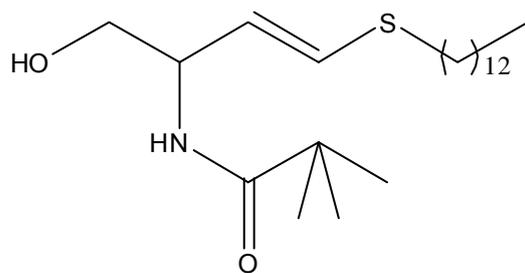
- 25 En una realización preferida, el compuesto, según se ha descrito anteriormente, se selecciona de la lista que comprende:

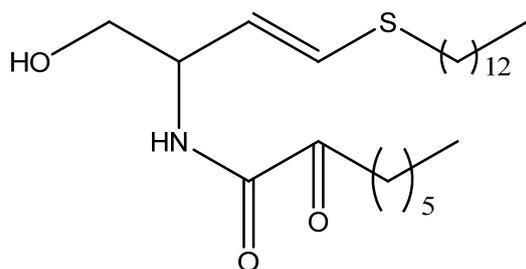


30



5

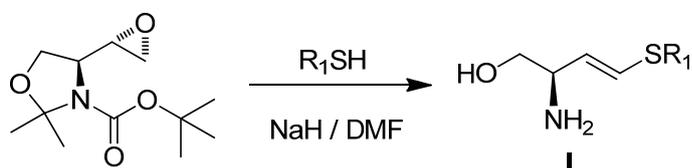




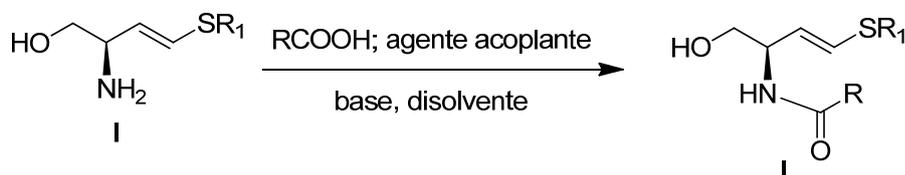
o sus sales, isómeros o solvatos farmacéuticamente aceptables.

- 5 Los compuestos de fórmula (I) o sus isómeros, sales o solvatos están preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura. Por forma farmacéuticamente aceptable se entiende, entre otros, que tienen 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%, más preferiblemente, superiores al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o isómeros.
- 10 Algunos de los compuestos de fórmula (I) de la presente invención pueden tener uno o más centros estereogénicos. La presente invención abarca todos los posibles estereoisómeros no sólo sus mezclas racémicas sino también sus isómeros ópticamente activos. La obtención de un único enantiómero puede conseguirse mediante alguno de los procedimientos comúnmente empleados, por ejemplo, por resolución de la mezcla racémica mediante técnicas de recristalización, síntesis quiral, resolución enzimática, biotransformación o resolución cromatográfica.
- 15 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos, tales como mesilatos, fumaratos, clorhidratos, citratos, maleatos y tartratos. También pueden formarse sales fisiológicamente aceptables con los ácidos sulfúrico y fosfórico. Asimismo, pueden formarse sales de tipo básico de un metal alcalino, como por ejemplo el sodio, o de un metal alcalinotérreo, por ejemplo calcio o magnesio. Puede haber más de un catión o anión dependiendo del número de funciones con carga y de la valencia de los cationes y aniones.
- 20 Algunos de los compuestos de fórmula (I) de la presente invención pueden existir como formas no solvatadas o como solvatos, por ejemplo como hidratos. La presente invención comprende todas las formas anteriormente citadas que sean farmacéuticamente activas.
- Algunos de los compuestos de fórmula general (I) pueden presentar polimorfismo, comprendiendo esta invención todas las formas polimórficas posibles.
- 25 Un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la fabricación de un medicamento.
- Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que cursan con hiperproliferación celular, incluyendo pero no limitándose al tratamiento del cáncer o neoplasia, como el de próstata, páncreas, cerebro, colon, pulmón, mama, ovario, laringe, vejiga urinaria, útero, sarcomas, linfomas o leucemia.
- 30 Un cuarto aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I). En una realización preferida, dicha composición comprende otro principio activo.
- Los compuestos y composiciones de esta invención pueden ser empleados solos o junto con otros principios activos o medicamentos para proporcionar una terapia combinada. Los otros medicamentos pueden formar parte de la misma composición, o ser proporcionados como una composición separada, para su administración al mismo tiempo o en un momento diferente. Los medicamentos a ser combinados con los compuestos de la presente invención pueden ser medicamentos aprobados para el tratamiento de alguna de las enfermedades, o ser de nuevo desarrollo.
- 35 Los compuestos de fórmula (I), sus estereoisómeros, sales, o solvatos farmacéuticamente aceptables, pueden ser utilizados, por tanto, en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno que requiera modulación de las enzimas ceramidasa y/o dihidroceramida desaturasa. Las composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I), sus estereoisómeros, sales, o solvatos farmacéuticamente aceptables, junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables, constituyen un aspecto adicional de la presente invención.
- 40 Los compuestos de fórmula (I) pueden ser preparados siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular por los procedimientos generales que se describen a continuación. Los materiales de partida están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos de la literatura.
- 45

En primer lugar, se hace reaccionar un tiol R_1SH , donde R_1 se define como anteriormente, con el epóxido de Garner, obtenido según [Moore, W. and Luzzio, F. A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6599-6602] en presencia de una base fuerte, como por ejemplo hidruro sódico en atmósfera inerte a una temperatura entre 20 y 60° C en presencia de un disolvente orgánico, como por ejemplo *N,N*-dimetilformamida, para obtener el correspondiente amino alcohol de fórmula I.



La amina obtenida en la etapa anterior puede acilarse haciéndola reaccionar con un cloruro de ácido en presencia de una base. Alternativamente, también puede emplearse un ácido carboxílico en presencia de un agente acoplante adecuado como, por ejemplo, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), el *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N'*-tetrametiluronio hexafluoro fosfato (HATU) o el benzotriazol-1-iloxi-tris pirrolidinofosfonio (PyBOP) y un activador como el 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt), en presencia de una base como trietilamina, en un disolvente como diclorometano y bajo atmósfera inerte.



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 dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Muestra el efecto de los compuestos I1A, I1B, I1C, I1D y I1E sobre la actividad de la ceramidasa ácida in vitro (A) y en células intactas (B) utilizando concentraciones equimolares de sustrato e inhibidor de 40 micromolar. Los datos son la media \pm DE de 2 experimentos independientes con triplicados.

Fig. 2. Muestra el efecto de la concentración de los compuestos I1B, I1C y I1D sobre la actividad de la ceramidasa ácida in vitro utilizando una concentración de sustrato de 40 μ M y las concentraciones de inhibidores indicadas. Los datos son la media \pm DE de 2 experimentos independientes con triplicados. La concentración μ M de cada inhibidor que reduce un 50 % la actividad enzimática (IC_{50}) se indica sobre el eje de abscisas.

Fig. 3. Efecto de los compuestos I1B, I1C y I1D sobre la metabolización de la *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-*D-erythro*-dihidroesfingosina (dhCerC6NBD) en células A549. Las rutas metabólicas se indican debajo del diagrama de barras. Las células se incuban con la dhCerC6NBD y los inhibidores, ambos a una concentración de 16 μ M durante 4 h. Después las células se recogen y se tratan con metanol y los extractos se analizan por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia, empleando longitudes de onda de absorción y emisión de 360 nm y 460 nm, respectivamente. Los datos corresponden a la media \pm DE de un experimento representativo con triplicados. Los asteriscos indican significación estadística a $p \leq 0,05$ (Test t de student de dos colas para datos no apareados). Las abreviaturas corresponden a: dhCerC6NBD, *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-*D-erythro*-dihidroesfingosina; CerC6NBD, *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-*D-erythro*-esfingosina; GlcdhCerC6NBD, *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-*D*-glucosil- β 1-1'-dihidroesfingosina; GlcCerC6NBD, *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-*D*-glucosil- β 1-1'-esfingosina; dhSMC6NBD, *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-dihidroesfingosina-1-fosfocolina; SMC6NBD, *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil]-esfingosina-1-fosfocolina.

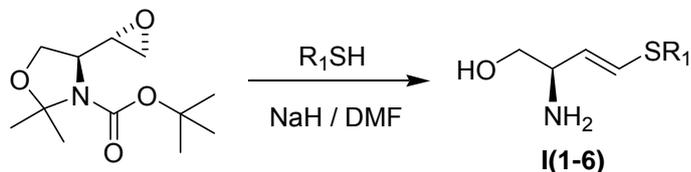
Fig. 4. Efecto de los compuestos I1B y I1D sobre la producción de dihidroceramidas con distintos grupos *N*-acilo en células A549 (A) y HCT116 (B). Las células se incuban con los inhibidores a una concentración de 20 μ M durante 24 h, se procesan para la extracción de esfingolípidos y se analizan por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo. Los datos corresponden a la media \pm DE de un experimento representativo con triplicados. Los asteriscos indican significación estadística a $p \leq 0,05$ (Test t de student de dos colas para datos no apareados). Las especies de dihidroceramidas observadas y cuantificadas son la *N*-hexadecanoildihidroesfingosina (C16), *N*-octadecanoildihidroesfingosina (C18), *N*-docosanoildihidroesfingosina (C22) and *N*-tetracosanoildihidroesfingosina (C24)

EJEMPLOS

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

A. Preparación de los compuestos de fórmula general I

5 1. Obtención de los amino alcoholes I1-6



A una suspensión de NaH (66 mg; 1,64 mmol) en DMF (2 mL) se le añade una disolución del tiol correspondiente (1,64 mmol) en DMF (2 mL) a 0°C y bajo atmosfera de argón. Se deja reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se adiciona una disolución del epóxido de Garner (200 mg; 0,82 mmol) en DMF (2 mL) gota a gota. Se lleva el sistema a 40°C y se deja reaccionar durante 4 horas. Finalizada la reacción, se añade agua y se hacen extracciones de la fase acuosa con éter (3 x10 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan con MgSO₄ y se elimina el exceso de disolvente a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna flash con CH₂Cl₂/MeOH como eluyente, obteniéndose los compuestos I.

(R,E)-2-amino-4-(trideciltio)but-3-en-1-ol (I1)

15 Aceite, rendimiento 52%. R_f = 0.24 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). [α]_D = -1.1 (c = 0.96, CHCl₃). Analisis elemental, calculado para C₁₇H₃₅NOS: C, 67.72; H, 11.70; N, 4.65; Encontrada: C, 67.78; H, 11.69; N, 4.39; Masa exacta, calculada para C₁₇H₃₅NOS (M+1): 302.2518; Encontrada: 302.2522.

20 ¹HRMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.32 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 5.45 (dd, J = 14.9, 6.4 Hz, 1H), 3.84 (m, 4H), 3.63 (m, 2H), 3.45 (m, 1H), 2.67 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.65–1.56 (m, 2H), 1.37 (m, 2H), 1.25 (s, 18H), 0.87 (t, J = 5.7 Hz, 3H). ¹³CRMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 129.0 (CH), 124.4 (CH), 65.2 (CH₂), 55.8 (CH), 32.4 (CH₂), 32.1 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.5 (CH₂), 29.4 (CH₂), 29.2 (CH₂), 29.0 (CH₂), 22.8 (CH₂), 14.3 (CH₃).

(R,E)-2-amino-4-(ciclohexiltio)but-3-en-1-ol (I2)

Aceite, rendimiento 79%. R_f = 0.61 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). Masa exacta, calculada para C₁₀H₁₉NOS (M+1): 202.1266; Encontrada: 202.1265.

25 ¹HRMN (400 MHz): δ = 6.24 (d, J = 15.3 Hz, 1H), 6.16 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.59 (dd, J = 15.3, 6.9 Hz, 1H), 5.49 – 5.43 (dd, 1H), 3.77 – 3.63 (m, 1H), 3.58 (dd, J = 10.4, 4.3 Hz, 1H), 3.35 (dd, J = 10.3, 7.7 Hz, 1H), 2.90 – 2.81 (m, 1H), 2.04 – 1.72 (m, 4H), 1.44 – 1.19 (m, 6H). ¹³CRMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 129.7 (CH), 125.2 (CH), 66.3 (CH₂), 55.8 (CH), 44.9 (CH), 33.5 (CH₂), 26.1 (CH₂), 25.7 (CH₂).

(R,E)-2-amino-4-(terc-butiltio)but-3-en-1-ol (I3)

30 Aceite, rendimiento 78%. R_f = 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). Masa exacta, calculada para C₈H₁₇NOS (M+1): 176.1109; Encontrada: 176.1104.

¹HRMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.65 (d, J = 15.2 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 5.67 (dd, J = 15.6, 8.5 Hz, 1H), 3.97 (m, 1H), 3.73 (dd, J = 31.1, 10.0 Hz, 2H), 1.35 (s, 6H), 1.33 (s, 3H). ¹³CRMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 131.4 (CH), 121.4 (CH), 62.4 (CH₂), 55.8 (CH), 44.4 (C), 31.1 (CH₃).

(R,E)-2-amino-4-(benciltio)but-3-en-1-ol (I4)

35 Aceite, rendimiento 76 %. R_f = 0.32 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). Masa exacta, calculada para C₁₁H₁₅NOS (M+1): 210.0953; Encontrada: 210.0950.

40 ¹HRMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.26 (td, J = 10.5, 4.2 Hz, 5H), 6.52 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.54 – 5.42 (m, 2H), 4.69 (s, 3H), 3.89 (s, 2H), 3.85 – 3.50 (m, 3H). ¹³CRMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 136.6(C), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 127.6 (CH), 121.2 (CH), 119.8 (CH), 62.9 (CH₂), 55.7 (CH), 36.7 (CH₂).

(R,E)-2-amino-4-(feniltio)but-3-en-1-ol (I5)

Aceite, rendimiento 67%. R_f = 0.52 (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). Masa exacta, calculada para C₁₀H₁₃NOS (M+1): 196.0796; Encontrada: 196.0795.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.38 – 7.22 (m, 5H), 6.41 (dd, *J* = 15.2, 1.1 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 9.4, 0.9 Hz, 1H), 5.80 (dd, *J* = 15.2, 6.7 Hz, 1H), 5.69 (dd, *J* = 9.5, 8.4 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 10.3, 4.4 Hz, 1H), 3.59 – 3.52 (m, 1H), 3.38 (dd, *J* = 10.3, 7.5 Hz, 1H), 1.75 (s, 4H). ¹³CRMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 134.9 (C), 133.6 (CH), 130.0 (CH), 129.3 (CH), 127.1 (CH), 125.0 (CH), 66.5 (CH₂), 55.5 (CH).

5 (R,E)-2-amino-4-(2-naftiltio)but-3-en-1-ol (I6)

Aceite, rendimiento 59 %. R_f = 0.59 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1). Masa exacta, calculada para C₁₄H₁₅NOS (M+1): 246.0953; Encontrada: 246.0951.

10 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.72 – 7.53 (m, 4H), 7.36 (dd, *J* = 6.1, 3.2 Hz, 3H), 6.60 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.39 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 5.70 (dd, *J* = 15.1, 7.4 Hz, 2H), 5.43 (s, 1H), 3.84 (m, 1H), 3.62 (dd, *J* = 29.9, 9.4 Hz, 2H). ¹³CRMN (100 MHz, CDCl₃): δ = 133.7 (C), 132.3 (C), 131.2 (C), 130.4 (CH), 128.9 (CH), 128.7 (CH), 127.8 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 126.7 (CH), 126.3 (CH), 125.4 (CH), 63.4 (CH₂), 55.4 (CH).

2. Síntesis de amidas. Método general

15 A una disolución de EDC (52 mg; 0,27 mmol) y HOBT (27 mg; 0.20 mmol) en CH₂Cl₂ (3 mL), en atmósfera inerte, se le añade una disolución del correspondiente ácido (0,19 mmol) en CH₂Cl₂ (1 mL). Tras 5 minutos de reacción, la mezcla se añade lentamente sobre una disolución de 0,17 mmol de la amina de partida I, en CH₂Cl₂ (3 mL) y Et₃N (0,1 mL) en atmósfera inerte. Tras 1 hora de reacción a temperatura ambiente, se adicionan 5 mL de agua y la mezcla resultante se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). Las fases orgánicas reunidas se secan sobre MgSO₄ anhidro y se elimina el exceso de disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purifica por cromatografía flash con CH₂Cl₂/MeOH (97,5:2,5) obteniéndose la correspondiente amida I(A-H).

20 (R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)palmitamida (I1A)

Rendimiento: 72%; Masa exacta, calculada para C₃₃H₆₆NO₂S (M+1): 540.4814; encontrada: 540.4825

25 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.26 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, CH=CH-S), 5.84 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NHCO), 5.46 (dd, 1H, *J* = 15.3, 6.7 Hz, CH=CH-S), 4.60-4.53 (m, 1H, CHNH), 3.67 (qd, 2H, *J* = 11.1, 4.7 Hz, CH₂OH), 2.66 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 2.20 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, COCH₂), 1.67-1.56 (m, 4H, S-CH₂CH₂, COCH₂CH₂), 1.37 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.25 (br.s., 42H, 21CH₂), 0.87 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz, 2CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 173.7 (CO), 128.9 (CH=CH-S), 122.8 (CH=CH-S), 65.8 (CH₂OH), 53.9 (CHNH₂), 37.0 (COCH₂), 32.5 (SCH₂), 32.1, 29.9, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.0, 25.9 (22CH₂), 22.8 (2CH₂CH₃), 14.3 (2CH₃).

(R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)octanamida (I1B)

Rendimiento: 67%; Masa exacta, calculada para C₂₅H₅₀NO₂S (M+1): 428.3562; encontrada: 428.3577

30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.27 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, CH=CH-S), 5.74 (br.s., 1H, NHCO), 5.46 (dd, 1H, *J* = 15.3, 6.8 Hz, CH=CH-S), 4.61-4.54 (m, 1H, CHNH), 3.74-3.62 (m, 2H, CH₂OH), 2.67 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 2.48 (br.s., 1H, CH₂OH), 2.21 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, COCH₂), 1.68-1.57 (m, 4H, S-CH₂CH₂, COCH₂CH₂), 1.42-1.34 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.25 (br.s., 26H, 13CH₂), 0.88 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz, 2CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 173.7 (CO), 128.7 (CH=CH-S), 123.0 (CH=CH-S), 65.7 (CH₂OH), 53.8 (CHNH₂), 37.0 (COCH₂), 32.4 (SCH₂), 32.0, 31.8, 29.8, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.3, 29.3, 29.1, 29.0, 25.9 (14CH₂), 22.8, 22.7 (2CH₂CH₃), 14.3, 14.2 (2CH₃).

(R,E)-4-terc-butil-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)benzamida (I1C)

Rendimiento: 73%; Masa exacta, calculada para C₂₈H₄₈NO₂S (M+1): 462.3406; encontrada: 462.3399

40 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H), 7.43 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Ar-H), 6.59 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, NHCO), 6.32 (d, 1H, *J* = 15.3 Hz, CH=CH-S), 5.56 (dd, 1H, *J* = 15.3, 6.6 Hz, CH=CH-S), 4.80-4.72 (m, 1H, CHNH), 3.76 (qd, 2H, *J* = 11.1, 4.5 Hz, CH₂OH), 2.66 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 1.60 (quint, 2H, *J* = 7.0 Hz, S-CH₂CH₂), 1.41-1.34 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.32 (s, 9H, 3CH₃), 1.25 (br.s., 18H, 9CH₂), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 167.6 (CO), 155.4, 131.3, 128.9 (CH=CH-S), 127.0, 125.6, 122.9 (CH=CH-S), 65.6 (CH₂OH), 54.2 (CHNH₂), 35.1 (C(CH₃)₃), 32.4 (SCH₂), 32.0 (CH₂), 31.3 (C(CH₃)₃), 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.0, (9CH₂), 22.8 (CH₂CH₃), 14.3 (CH₃).

45 (R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)pivalamida (I1D)

Rendimiento: 84%; Masa exacta, calculada para C₂₂H₄₄NO₂S (M+1): 386.3093; encontrada: 386.3088

50 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.24 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, CH=CH-S), 5.95 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, NHCO), 5.47 (dd, 1H, *J* = 15.3, 6.7 Hz, CH=CH-S), 4.57-4.51 (m, 1H, CHNH), 3.75-3.72 (m, 1H, CH₂OH), 3.70-3.62 (m, 1H, CH₂OH), 2.75 (br.s., 1H, CH₂OH), 2.66 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 1.61 (quint, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂CH₂), 1.40-1.33 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.25 (br.s., 18H, 9CH₂), 1.21 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz, CH₃). ¹³C RMN (101 MHz,

CDCl₃): δ 179.0 (CO), 128.7 (CH=CH-S), 123.0 (CH=CH-S), 65.9 (CH₂OH), 53.8 (CHNH₂), 38.9 (C(CH₃)₃), 32.4, 32.0, 29.8, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.0 (10CH₂), 27.7 (C(CH₃)₃), 22.8 (2CH₂CH₃), 14.3 (CH₃).

(R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)-2-oxooctanamida (I1E)

Rendimiento: 41%; Masa exacta, calculada para C₂₅H₄₈NO₃S (M+1): 442.3355; encontrada: 442.3374

- 5 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.26 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, CH=CH-S), 5.80 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, NHCO), 5.46 (dd, 1H, *J* = 15.3, 6.7 Hz, CH=CH-S), 4.60-4.52 (m, 1H, CHNH), 3.72-3.61 (m, 2H, CH₂OH), 3.47 (q, 3H, *J* = 7.0 Hz), 2.66 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 2.20 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, COCH₂), 1.67-1.55 (m, 4H, S-CH₂CH₂, COCH₂CH₂), 1.41-1.34 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.25 (br.s., 24H, 12CH₂), 0.91-0.84 (m, 6H, 2CH₃). ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 173.6 (2CO), 128.9 (CH=CH-S), 122.8 (CH=CH-S), 65.9 (CH₂OH), 53.9 (CHNH₂), 37.0 (SCH₂), 32.4, 32.1, 31.7, 29.8, 29.8, 29.7, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 29.0, 25.8 (14CH₂), 22.8, 22.6 (2CH₂CH₃), 14.3, 14.2 (2CH₃).

(R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)decanamida (I1F)

Rendimiento: 71%; Masa exacta, calculada para C₂₇H₅₄NO₂S (M+1): 456.3875; encontrada: 456.3877.

- 15 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.25 (d, 1H, *J* = 15.4 Hz, CH=CH-S), 5.73 (br.s., 1H, NHCO), 5.47 (dd, 1H, *J* = 15.4, 6.8 Hz, CH=CH-S), 4.62-4.55 (m, 1H, CHNH), 3.72-3.65 (m, 2H, CH₂OH), 2.64 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 2.46 (br.s., 1H, CH₂OH), 2.23 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, COCH₂), 1.65-1.53 (m, 4H, S-CH₂CH₂, COCH₂CH₂), 1.44-1.37 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.23 (br.s., 30H, 15CH₂), 0.89 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz, 2CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 172.7 (CO), 124.6 (CH=CH-S), 123.6 (CH=CH-S), 65.3 (CH₂OH), 53.6 (CHNH₂), 37.7 (COCH₂), 32.3 (SCH₂), 32.0-25.6 (16CH₂), 22.9, 22.6 (2CH₂CH₃), 14.4, 14.2 (2CH₃).

(R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)dodecanamida (I1G)

- 20 Rendimiento: 75%; Masa exacta, calculada para C₂₉H₅₈NO₂S (M+1): 484.4188; encontrada: 484.4190.

- 25 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.26 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, CH=CH-S), 5.75 (br.s., 1H, NHCO), 5.49 (dd, 1H, *J* = 15.2, 6.8 Hz, CH=CH-S), 4.64-4.56 (m, 1H, CHNH), 3.75-3.63 (m, 2H, CH₂OH), 2.67 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 2.49 (br.s., 1H, CH₂OH), 2.26 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, COCH₂), 1.67-1.52 (m, 4H, S-CH₂CH₂, COCH₂CH₂), 1.46-1.35 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.21 (br.s., 34H, 17CH₂), 0.85 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz, 2CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 172.9 (CO), 124.5 (CH=CH-S), 123.4 (CH=CH-S), 65.6 (CH₂OH), 53.7 (CHNH₂), 37.5 (COCH₂), 32.2 (SCH₂), 31.5-25.8 (18CH₂), 22.5-22.1 (2CH₂CH₃), 14.5-14.3 (2CH₃).

(R,E)-N-(1-hidroxi-4-(trideciltio)but-3-en-2-il)tetradecanamida (I1H)

Rendimiento: 72%; Masa exacta, calculada para C₃₁H₆₂NO₂S (M+1): 512.4501; encontrada: 512.4505.

- 30 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.25 (d, 1H, *J* = 15.2 Hz, CH=CH-S), 5.73 (br.s., 1H, NHCO), 5.51 (dd, 1H, *J* = 15.2, 6.8 Hz, CH=CH-S), 4.65-4.55 (m, 1H, CHNH), 3.73-3.67 (m, 2H, CH₂OH), 2.69 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, S-CH₂), 2.51 (br.s., 1H, CH₂OH), 2.24 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, COCH₂), 1.65-1.55 (m, 4H, S-CH₂CH₂, COCH₂CH₂), 1.47-1.36 (m, 2H, S-CH₂CH₂CH₂), 1.25 (br.s., 38H, 19CH₂), 0.85 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz, 2CH₃). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 173.1 (CO), 124.6 (CH=CH-S), 123.5 (CH=CH-S), 65.7 (CH₂OH), 53.9 (CHNH₂), 37.3 (COCH₂), 32.1 (SCH₂), 31.4-25.9 (20CH₂), 22.6-22.2 (2CH₂CH₃), 14.7-14.2 (2CH₃).

35 **B. Ensayos biológicos.**

Medición de la actividad ceramidasa ácida

Esta actividad se puede medir in vitro con homogeneizados celulares y sobre células vivas intactas. Se utiliza una línea celular de Farber corregida para sobreexpresar la ceramidasa ácida.

- 40 Para la medición de la actividad ceramidasa ácida in vitro, las células son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100 µl de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sonica. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y se guardan los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y después de los cálculos, el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a cantidades iguales de proteína. El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74 µL de disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético 0,1 M a pH 4,5, 0,5 µL de la disolución de sustrato de la ceramidasa ácida 4 mM en etanol (concentración final de sustrato 20 µM; concentración final de etanol 0,5%), y una cantidad de proteína fija (entre 10 y 25 µg) en un volumen de 25 µl de sacarosa 0,2 M. La placa se incuba a 37°C durante 3 horas sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición en cada pocillo de 50 µl de metanol y después 100 µl de una disolución de NaIO₄ de 2,5 mg/mL en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6. La placa se mantiene a 37 °C protegida de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

Para la medición de la actividad ceramidasa ácida en células en cultivo, las células se siembran a una densidad de 200000 células/mL (0.1 mL/pocillo). Después de 24 h, se añade el sustrato disuelto en etanol o en DMSO (0,1 µL, 40 mM) para tener una concentración final de 40 µM. Se incuba a 37 °C durante 3 h en el incubador de CO₂ y luego se añaden secuencialmente 25 µL de MeOH y 100 µL de una disolución de NaIO₄ de 2,5 mg/mL en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6. La placa se mantiene a 37 °C protegida de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm). Las muestras blanco se preparan añadiendo el sustrato inmediatamente antes de la adición de MeOH y NaIO₄.

Medición de la actividad dihidroceramida desaturasa.

Esta actividad se puede medir in vitro con homogeneizados celulares y sobre células vivas intactas. Se utiliza la línea de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

Para la medición de la actividad dihidroceramida desaturasa in vitro, las células se lavan dos veces con PBS, se recolectan y se lisan suspendiéndolas en disolución amortiguadora de fosfatos 0,2 M a pH 7,4 (100 µL/1-2x10⁶ células) y sometiéndolas a ciclos de sonicación /inmersión en hielo. El sustrato, con o sin inhibidor, previamente añadido al vial de reacción y secado mediante corriente de nitrógeno, se disuelve en 10 µL de etanol y se añaden 80 µL de una disolución de BSA de 10 mg/mL en disolución amortiguadora de fosfatos 0,2 M a pH 7,4. La mezcla se sonica en un baño de ultrasonidos durante 3 minutos. A continuación se añade el lisado celular (0,3 mg de proteína) y 30 µL de una disolución de NADH en disolución amortiguadora de fosfatos 0,2 M a pH 7,4. El volumen de reacción se completa hasta 300 µL con disolución amortiguadora de fosfatos 0,2 M a pH 7,4 y la mezcla se incuba a 37 °C durante 1h. La reacción se para añadiendo 0,8 mL de metanol, se enfría a 4° C durante 8 h, se centrifuga a 14.000 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante se analiza cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia empleando longitudes de onda de absorción y emisión de 360 nm y 460 nm, respectivamente.

Para la medición de la actividad dihidroceramida desaturasa en células en cultivo, las células se siembran a una densidad de 250000 células/mL (0,4 mL/pocillo). Después de 24 h, se añaden los compuestos problema a las concentraciones deseadas a partir de disoluciones madre en etanol, y se incuba durante 24 h más. Al final de este periodo, se añade la dhCerC6NBD, a partir de una disolución madre en etanol, para alcanzar una concentración final de 16 µM. Después de 4 horas, se recoge el medio y las células. Al medio se añade 1 mL de metanol y las células se lavan y se tripsinizan con 0,4 mL de tripsina-EDTA y se añade 0,6 mL de medio y 1 mL de metanol. Tanto el medio como el extracto celular se analizan por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia empleando longitudes de onda de absorción y emisión de 360 nm y 460 nm, respectivamente.

Medición de la actividad sobre la producción de dihidroceramidas

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la producción de esfingolípidos, las células de la línea A549 se siembran a una densidad de 250000 células/mL (0,4 mL/pocillo). Después de 24 h, se añaden los compuestos problema a las concentraciones deseadas a partir de disoluciones madre en etanol, y se incuba durante 24 h más. Al final de este periodo, las células se lavan y se desadhieren con tripsina y el residuo celular se extrae y analiza por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo tal como se describe en [Munoz-Olaya, J. M.; Matabosch, X.; Bedia, C.; Egidio-Gabas, M.; Casas, J.; Llebaria, A.; Delgado, A.; Fabrias, G., Synthesis and Biological Activity of a Novel Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase. *ChemMedChem* 2008, 3, (6), 946-953]. Los resultados se muestran en la figura 4.

Medición de la citotoxicidad

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, las células de las líneas A549 y de cáncer de colon HCT116 se siembran en placas de 96 pocillos a una densidad de 100000 células/mL (0,1 mL/pocillo). Al cabo de 24 h, el medio se reemplaza por medio fresco conteniendo los compuestos problema a distintas concentraciones entre 1 y 400 uM. El número de células viables se determina al cabo de 24 horas mediante el test del MTT.

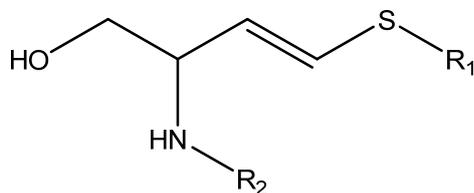
Compuesto	A549	HCT116
Compuesto I1A	383	345
Compuesto I1B	19	28
Compuesto I1C	76	81
Compuesto I1D	24	30
Compuesto I1E	15	12

Tabla 1. Muestra las concentraciones (μM) de los compuestos I1A, I1B, I1C, I1D y I1E que reducen la viabilidad celular un 50 % respecto a las células sin tratar en dos modelos de adenocarcinoma humano de pulmón (A549) y de colon (HCT116). Los valores de IC_{50} (μM) se determinan mediante regresión de las curvas obtenidas con distintas concentraciones de los compuestos problema. Las curvas de dosis-respuesta proceden de dos experimentos con triplicados.

5

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):



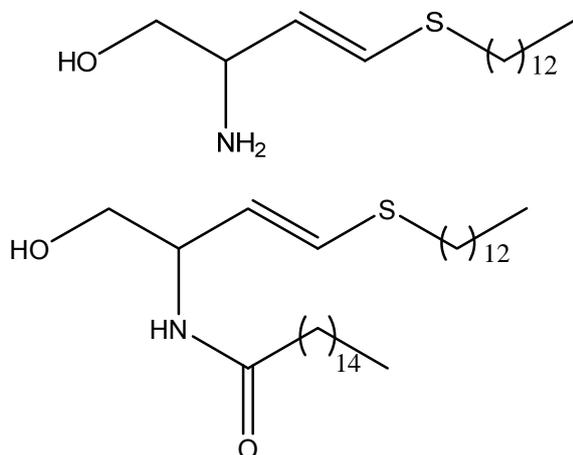
(I)

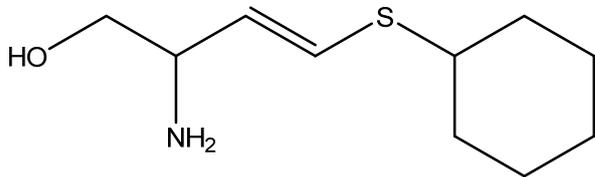
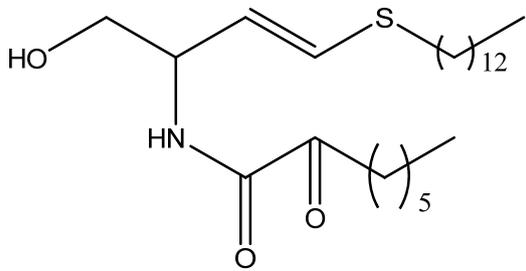
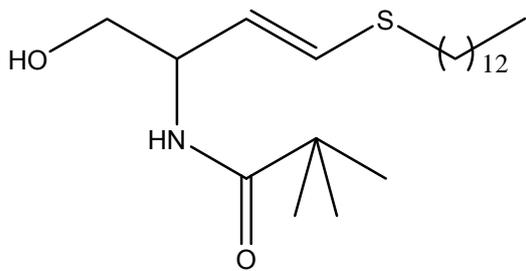
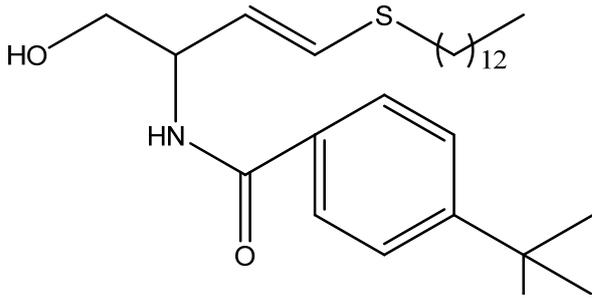
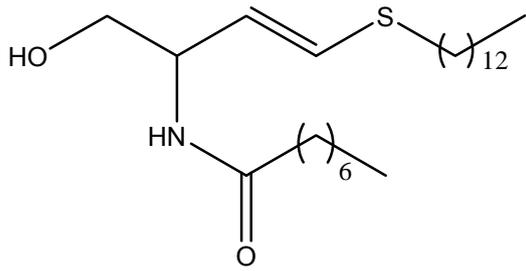
5 donde

R₁ se selecciona entre alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo o arilo sustituidos o sin sustituir y R₂ se selecciona entre H o un grupo -C(O)R₃, siendo R₃ -C(O)alquilo C₁-C₁₆, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo sustituidos o sin sustituir,

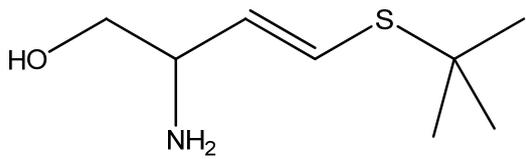
o una sal o isómero o solvatos farmacéuticamente aceptable del mismo.

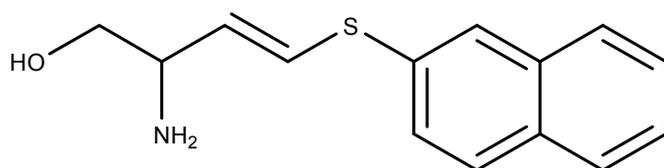
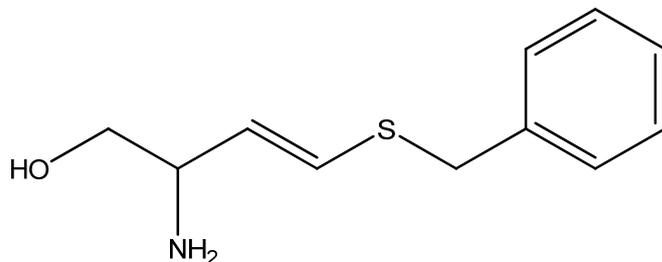
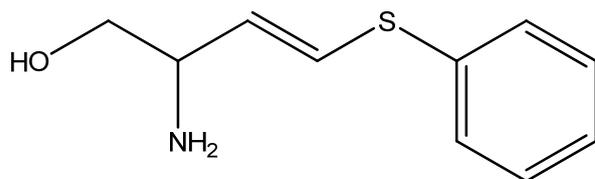
- 10 2. Compuesto según la reivindicación 1 donde R₁ es un alquilo C₁₀-C₁₈.
3. Compuesto según la reivindicación 2 donde R₁ es -(CH₂)₁₂CH₃.
4. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ es un *tert*-butilo.
5. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ es un cicloalquilo.
6. Compuesto según la reivindicación 5, donde R₁ es un ciclohexilo.
- 15 7. Compuesto según la reivindicación 1, donde R₁ es un arilo.
8. Compuesto según la reivindicación 7, donde R₁ se selecciona del grupo que consiste en fenilo, bencilo y naftilo.
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde R₂ es un grupo -C(O)R₃.
10. Compuesto según la reivindicación 9, donde R₃ es un alquilo C₄-C₁₅.
- 20 11. Compuesto según la reivindicación 10, donde R₃ se selecciona del grupo que consiste en *tert*-butilo, heptilo, nonilo, undecilo, tridecilo y pentadecilo.
12. Compuesto según la reivindicación 9, donde R₃ es un arilo.
13. Compuesto según la reivindicación 12, donde R₃ es un fenilo sustituido por un alquilo C₁-C₆.
14. Compuesto según la reivindicación 9, donde R₃ es un grupo -C(O)-alquilo C₁-C₁₆.
- 25 15. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que se selecciona de la lista que comprende:





5





o una sal o isómero o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5
16. Uso del compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la fabricación de un medicamento.
17. Uso del compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o neoplasia.
- 10
18. Uso según la reivindicación 17 donde el cáncer o neoplasia se selecciona entre leucemia, sarcoma, linfoma o carcinoma de próstata, páncreas, cerebro, colon, pulmón, mama, ovario, laringe, vejiga urinaria o útero
19. Procedimiento de obtención del compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado por comprender las etapas:
- 15
- a) adición de un tiol R_1SH , donde R_1 se define según la reivindicación 1, a una suspensión de base fuerte en un disolvente orgánico en una atmósfera inerte, seguido de reacción de la mezcla resultante con un epóxido a una temperatura de entre 20 y 60°C y durante menos de 10 horas y
- b) activación del ácido carboxílico o un derivado y reacción con el compuesto obtenido en (a).
- 20
20. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20 que comprende otro principio activo.

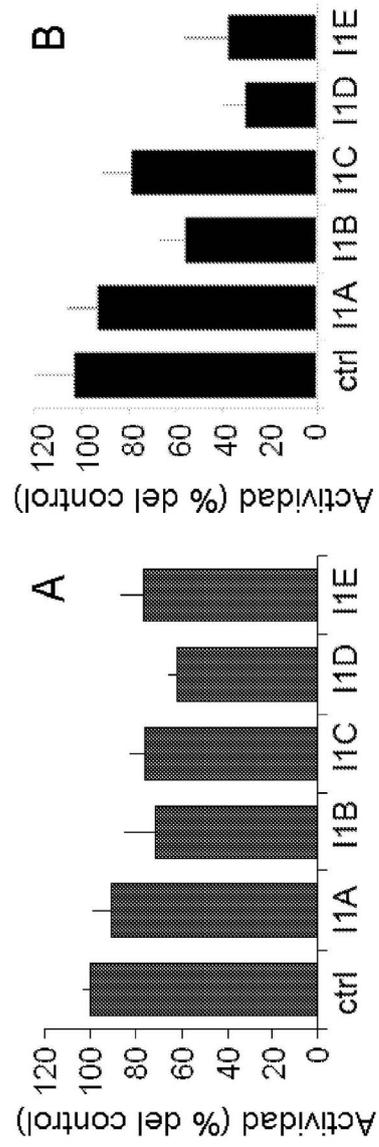


Fig. 1

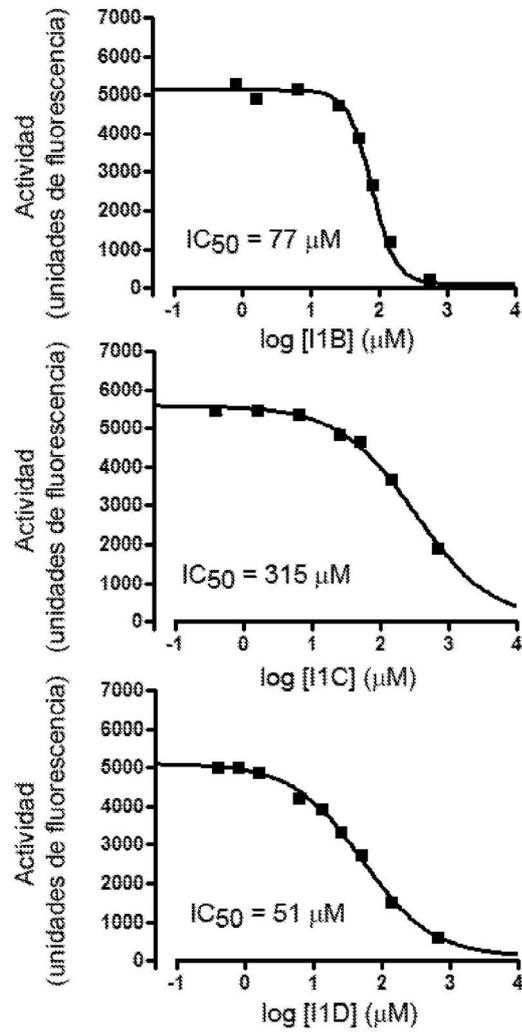
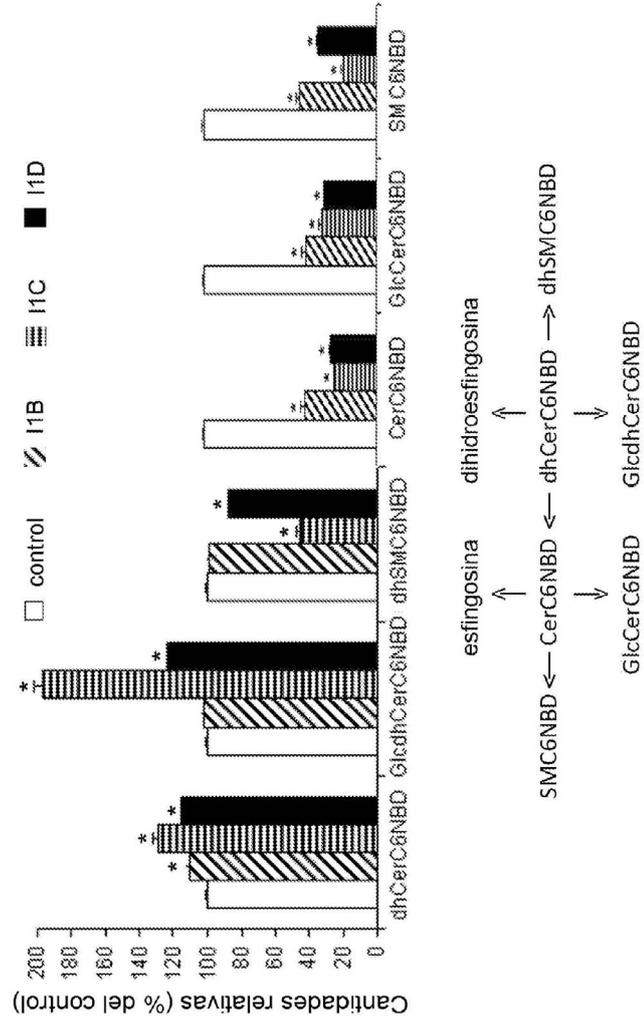


Fig. 2



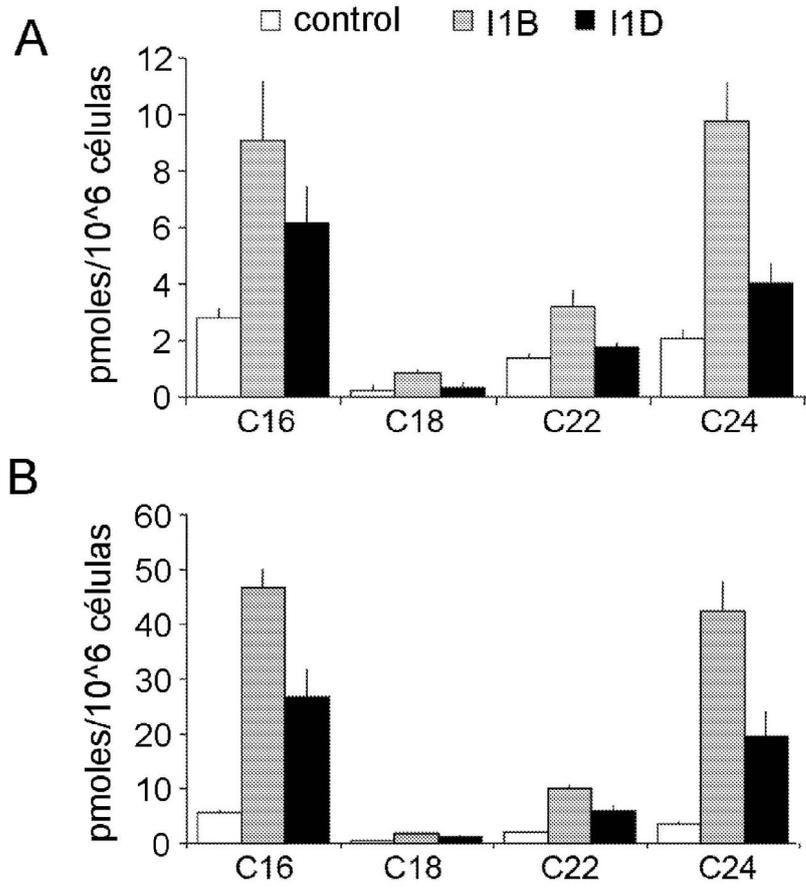


Fig. 4



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031642

②② Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GRIJALVO, S. y col. Design, synthesis and activity as acid ceramidase inhibitors of 2-oxooctanoyl and N-oleylethanolamine analogues. Chemistry and Physics of Lipids. Octubre 2006, Vol. 144, Nº 1, páginas 69-84. Todo el documento en especial página 70, figura 1.	1-21
A	BEDIA, C. y col. Cytotoxicity and acid ceramidase inhibitory activity of 2-substituted aminoethanol amides. Chemistry and Physics of Lipids. Noviembre 2008, Vol. 156, Nº 1-2, páginas 33-40. Todo el documento en especial página 34, figura 1.	1-21
A	BEDIA, C. y col. Analogs of the dihydroceramide desaturase inhibitor GT11 modified at the amide function: synthesis and biological activities. Organic & Biomolecular Chemistry. 2005, Vol. 3, Nº 20, páginas 3707-3712. Todo el documento.	1-21
A	SELZNER, M. y col. Induction of Apoptotic Cell Death and Prevention of Tumor Growth by Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer. Cancer Research. Febrero 2001, Nº 61, páginas 1233-1240. Todo el documento.	1-21

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
27.05.2011

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/133 (2006.01)

A61K31/164 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, BEILSTEIN, MEDLINE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-21	SI
	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 se publica.

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GRIJALVO, S. y col. Design, synthesis and activity as acid ceramidase inhibitors of 2-oxooctanoyl and N-oleoylethanolamine analogues. Chemistry and Physics of Lipids. Octubre 2006, Vol. 144, Nº 1, páginas 69-84.	
D02	BEDIA, C. y col. Cytotoxicity and acid ceramidase inhibitory activity of 2-substituted aminoethanol amides. Chemistry and Physics of Lipids. Noviembre 2008, Vol. 156, Nº 1-2, páginas 33-40.	
D03	BEDIA, C. y col. Analogs of the dihydroceramide desaturase inhibitor GT11 modified at the amide function: synthesis and biological activities. Organic & Biomolecular Chemistry. 2005, Vol. 3, Nº 20, páginas 3707-3712.	
D04	SELZNER, M. y col. Induction of Apoptotic Cell Death and Prevention of Tumor Growth by Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer. Cancer Research. Febrero 2001, Nº 61, páginas 1233-1240.	

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 presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I) derivados de aminoetanol sustituidos en C2 por un grupo vinil sulfuro, a las composiciones farmacéuticas que los contienen, a su procedimiento de obtención y a su uso en la fabricación de un medicamento útil en el tratamiento de cáncer o neoplasia como leucemia, sarcoma, linfoma, carcinoma de próstata, páncreas, cerebro, colon, pulmón, mama, ovario, laringe, vejiga urinaria o útero. La capacidad antiproliferativa o citotóxica de estos compuestos se debe a que son inhibidores de la ceramidasa ácida y la dihidroceramida desaturasa.

El documento D01 divulga un estudio sobre inhibidores de la ceramidasa ácida derivados de N-aciletanolamina, en concreto 2-oxooctanamidas y oleamidas, sustituidas en C2 del etanol por grupos éter o tioéter.

El documento D02 describe la síntesis y actividad biológica de varias amidas de derivados de aminoetanol sustituidos en C2. Los compuestos SC16-c7 y SAR-c7 figura 1 (página 34, figura 1) incluyen grupos tioéter.

El documento D03 divulga análogos del inhibidor de la dihidroceramidasa GT11. Estos compuestos llevan un grupo ciclopropeno en la sustitución de C2 del grupo aminoetanol.

En el documento D04 se describe el inhibidor de la ceramidasa ácida compuesto B13 (2-(N-tetradecanoilamino)-1-(4-nitrofenil)-1,3-propanodiol) como un compuesto prometedor en el tratamiento adyuvante del cáncer de colon primario o con metástasis.

No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica compuestos derivados de aminoetanol sustituidos en C2 por un grupo vinil sulfuro como los descritos en la presente solicitud.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1-21 de la presente solicitud tienen novedad e implican actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).