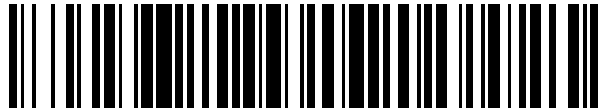


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 122**

51 Int. Cl.:

C07D 319/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2002 E 02750099 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **21.04.2004 EP 1409467**

54 Título: **Un inhibidor de N-acilesfingosina glucosiltransferasa**

30 Prioridad:

16.07.2001 US 305814 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2013

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (50.0%)
One Kendall Square
Cambridge Massachusetts 02139-1562, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HIRTH, BRADFORD H.;
SIEGEL, CRAIG;
SHAYMAN, JAMES A.;
NELSON, CAROL ANNE;
HARRIS, DAVID J. y
COPELAND, DIANE**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

ES 2 395 122 T3

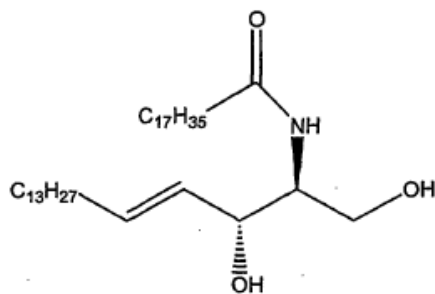
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar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

DESCRIPCIÓN

Un inhibidor de N-acilesfingosina glucosiltransferasa

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 [0001] Los glucoesfingolípidos (GSLs) son una clase de compuestos que ocurren naturalmente que tienen una multitud de funciones biológicas, incluyendo la capacidad de promover crecimiento celular, diferenciación celular, adherencia entre células o entre células y proteínas de matriz, unión de microorganismo y virus a células, y metástasis de células tumorales. Los GSLs se derivan de glucosilceramida (GlcCer), la cual es producida a partir de ceramida y UDP-glucosa por la enzima UDP-glucosa: N-acilesfingosina glucosiltransferasa (GlcCer sintasa). La estructura de ceramida se muestra abajo:



CERAMIDA

10 [0002] La acumulación de GSLs ha sido relacionada con una serie de enfermedades, incluyendo las enfermedades de Tay-Sachs, Gaucher, y Fabry (ver, por ejemplo, Patente U.S. 6.051.598). Los GSLs han sido relacionados con ciertos cánceres. Por ejemplo, se ha encontrado que ciertos GSLs se producen únicamente en tumores o en concentraciones en tumores anormalmente altas; ejercen acciones estimuladoras o inhibitorias marcadas sobre el crecimiento celular cuando se añadieron a células tumorales en medio de cultivo; e inhiben el sistema inmunodefensivo normal del cuerpo cuando se libera por tumores al fluido extracelular circundante. La composición de GSLs de tumor cambia cuando el tumor se vuelve maligno y los anticuerpos para ciertos GSLs inhiben el crecimiento de tumores.

15 [0003] Compuestos que inhiben GlcCer sintasa pueden reducir las concentraciones de GSL y se ha informado que son útiles para tratar a un sujeto con una de las enfermedades antes mencionadas. Una serie de potentes inhibidores de GlcCer, referidos aquí como "compuestos tipo ceramida", son revelados en las Patentes U.S. N° 6.051.598, 5.952.370, 5.945.442, 5.916.911 y 6.030.995. El término "compuestos tipo ceramida" se refiere a análogos de ceramida en los cuales: 1) el alcohol primario es sustituido con un grupo amino sustituido; y 2) el grupo alquenilo es sustituido con un grupo arilo, preferiblemente fenil o fenil sustituido. Los correspondientes compuestos N-deacilados son referidos como "compuestos tipo esfingosina."

20 [0004] Desafortunadamente, los métodos conocidos para preparar compuestos de tipo ceramida son poco adecuados para fabricar a escala industrial. A causa de los dos centros quirales, la mayoría de las síntesis conocidas generaron cuatro diastereoisómeros, que dan lugar a la necesidad de separar diastereómeros por cromatografía y aislar el enantiómero deseado por cristalización tras derivación con reactivos ópticamente activos por ejemplo, isómeros de ácido dibenzoiltartárico (ver, por ejemplo, Inokuchi and Radin, Journal of Lipid Research 28:565 (1987)). Ninguno de los procesos es susceptible de preparaciones a gran escala. Se ha informado de síntesis enantioselectivas de compuestos amino de tipo ceramida que utilizan reducciones diastereoselectivas (Mitchell, y colaboradores., J. Org. Chem. 63:8837 (1998) y Nishida, y colaboradores, SYNLETT 1998:389 (1998)), pero requieren más de 10 pasos, algunos de los cuales utilizaron reactivos caros tales como hidruro de diisobutilaluminio (DIABAL) y Aldehído Gamer (*tert*-butil (R)-(+)-4 formil-2, 2-dimetil - 3-carboxilato de oxazolidina). Así, existe una necesidad fundamental de síntesis enantioselectiva de compuestos amino de tipo ceramida que sean más económicos y eficaces, e impliquen menos pasos que las síntesis conocidas.

25 [0005] Lee y colaboradores (J. Biol. Chem., 247(21), pp14662-14669 (1999)) revela inhibidores específicos de glucosilceramida sintasa. En particular, Lee y colaboradores revela únicamente compuestos con un grupo alcanilo C16 (palmitoil) en el átomo de nitrógeno de la amida.

RESUMEN DE LA INVENCION

30 [0006] Lo que se proporciona aquí es una síntesis eficiente, altamente enantioselectiva de compuestos amino de tipo ceramida. Esta síntesis de compuestos amino de tipo ceramida implica solamente cinco pasos a partir de compuestos conocidos. Por ejemplo, el compuesto comparativo de tipo ceramida designado como "Compuesto 5" en la Figura 1 se produjo en un exceso enantiomérico de al menos 99,6% y un rendimiento total del 9% (ver Ejemplos comparativos 1

[0007] En un primer aspecto la invención se refiere a un compuesto según la Reivindicación 1. Una realización adicional del compuesto es expuesta en la Reivindicación 2.

[0008] La invención, en más aspectos, proporciona los usos de los compuestos como se exponen en la Reivindicación 3 a 9.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009]

La Figura 1 es un esquema que muestra la síntesis del compuesto (5) comparativo de tipo ceramida utilizando los métodos aquí revelados.

10 La Figura 2 es un esquema que muestra la síntesis del compuesto comparativo (13) de tipo ceramida utilizando los métodos aquí revelados.

La Figura 3 muestra las estructura de los Compuestos (5)-(8).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0010] Ejemplos de condiciones específicas para llevar a cabo las reacciones descritas aquí se proporcionan en los Ejemplos comparativos 1 y 2.

15 **[0011]** Se pretende que el término "enantiómero" como se usa aquí, y las fórmulas estructurales que ilustran un enantiómero incluyan el enantiómero "puro" libre de su isómero óptico así como mezclas del enantiómero y su isómero óptico en las que el enantiómero está presente en un exceso enantiomérico, por ejemplo, al menos 10%, 25%, 50%, 75%, 90%, 95%, 98%, o 99% de exceso enantiomérico.

20 **[0012]** Compuestos de esta invención que poseen un grupo funcional suficientemente ácido, uno suficientemente básico, o ambos grupos funcionales, y por consiguiente pueden reaccionar con cualquiera de una serie de bases inorgánicas, y ácidos orgánicos e inorgánicos, para formar una sal. Se proporcionan sales fisiológicamente aceptables. Ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácido son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tal como ácido *p*-toluensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido *p*-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico y ácido acético. Ejemplos de tales sales incluyen el sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato y, mandelato.

30 **[0013]** Sales de adición básica incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos de amonio o álcali o metales alcalinotérreos, carbonatos y bicarbonatos. Tales bases útiles para preparar las sales de esta invención incluyen así hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio y carbonato de potasio.

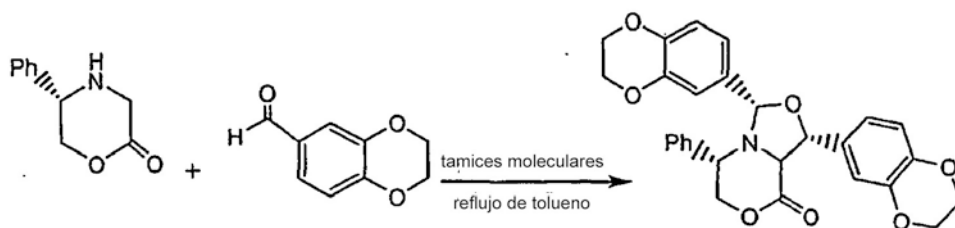
35 EJEMPLIFICACION

Ejemplo Comparativo 1 - Preparación a Pequeña Escala de Compuestos de tipo Ceramida

Sustancia Intermedia 1

(1R,3S,5S,8aS)-1,3-Bis-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6'-il)-5-fenil-tetrahidro-oxazolo[4,3-c][1,4]oxazin-8-ona

[0014]

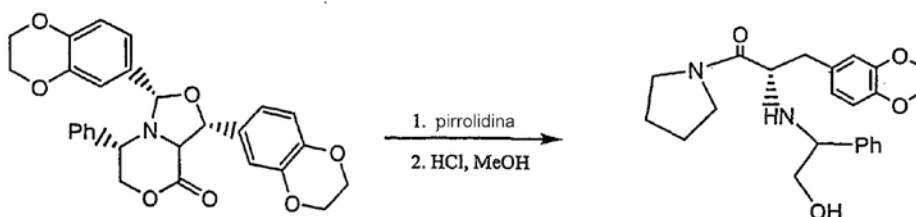


5 **[0015]** A una mezcla agitada de (5S)-5-fenilmorfolim-2-ona (2,00 g, 11,3 mmol) (se preparó como en: Dellaria, J.F.: Santarsiero, B.D. J. Org. Chem., 1989, 54, 3916) y 1,4-benzodioxan-6-carboxaldehído (5,56 g, 33,9 mmol) en tolueno (125 mL) se añadió tamices moleculares de 4Å (aproximadamente 20 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 72 horas, se filtró libre de tamices y se concentró. La goma ámbar resultante se cromatografió flash sobre sílice (hexano/éter dietílico) para suministrar un sólido amarillo pálido. Este material fue además purificado por trituración con éter dietílico para dar 1,89 g (34%) de producto como un sólido blanco esponjoso: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7,31-7,17 (m, 5H), 6,95-6,79 (m, 5H), 5,32-5,27 (m, 2H), 4,43-4,28 (m, 2H), 4,24 (s, 4H), 4,18 (m, 4H), 4,16-4,08 (m, 2H) ppm.

Sustancia Intermedia 2

10 **(2S,3R,1"S)-3-(2',3'-Dihidro-benzo[1,4]dioxin-6'-il)-3-hidroxi-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-1-pirrolidina-1-il-propan-1-ona**

[0016]

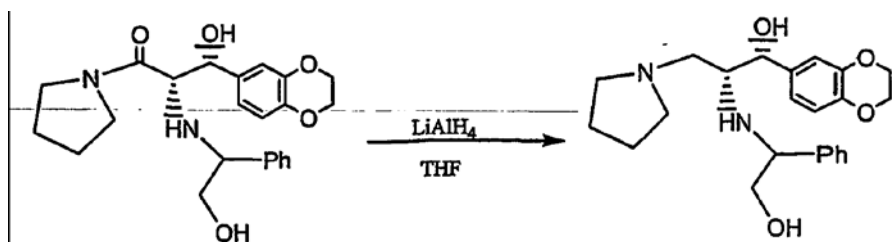


15 **[0017]** A una solución agitada de la Sustancia Intermedia 1 (1,80 g, 3,69 mmol) en cloroformo (20 mL) se añadió pirrolidina (2,0 mL, 24 mmol). La solución fue agitada durante la noche y luego concentrada. La espuma pegajosa incolora resultante fue tomada en metanol (16 mL) y ácido clorhídrico 1 N (4 mL). La mezcla fue refluja durante 1 hora, tratada con ácido clorhídrico 1 N adicional (2 mL) y refluja durante otras 2 horas. La solución de reacción fue concentrada y el residuo resultante particionado entre acetato de etilo y solución de bicarbonato sódico acuoso. La capa orgánica fue secada (sulfato sódico) y concentrada. La goma amarilla pálida resultante fue purificada por cromatografía flash sobre gel de sílice (cloruro de metileno/amoniaco metanólico 2 N) para dar 1,40 g (92%) de Sustancia Intermedia 2 como un sólido espumoso incoloro: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7,31-7,13 (m, 5H), 6,93-6,70 (m, 3H), 4,47 (d, $J = 8,5$, 1H), 4,18 (s, 4H), 3,82 (t, $J = 5,9$, 1H), 3,74 (d, $J = 6,0$, 2H), 3,06 (d, $J = 8,5$, 1H), 3,06-2,97 (m, 1H), 2,92-2,83 (m, 1H), 1,97-1,87 (m, 1H), 1,45-1,15 (m, 4H) ppm.

Sustancia Intermedia 3

25 **(1R,2R,1"S)-1-(2',3'-Dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-3-pirrolidina-1-il-propano-1-ol**

[0018]

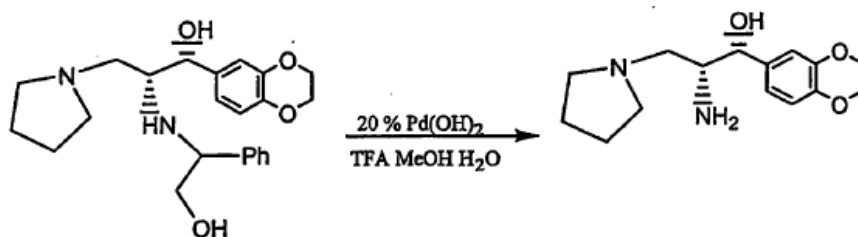


30 **[0019]** A una solución agitada de la Sustancia Intermedia 2 (1,38 g, 3,35 mmol) en tetrahidrofurano (30 mL) se añadió hidruro de aluminio y litio (0,26 g, 6,9 mmol). La suspensión espumosa fue agitada durante la noche y luego enfriada con la adición (gota a gota hasta que deje de echar espuma) de hidróxido de sodio acuoso 1N (13 mL). La mezcla fue diluida con agua y extraída con acetato de etilo. La capa orgánica fue secada (sulfato de sodio) y concentrada para suministrar una goma incolora. Cromatografía flash sobre gel de sílice (cloruro de metileno / amoniaco metanólico 2N) dió 0,94 g (70%) de producto como una espuma pegajosa incolora: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7,36-7,17 (m, 5H), 6,88-6,74 (m, 3H), 4,42 (d, $J = 5,4$, 1H), 4,26 (s, 4H), 3,79-3,69 (m, 1H), 3,64-3,56 (m, 1H), 3,55-3,45 (m, 1H), 3,00-2,90 (m, 1H), 2,67-2,57 (m, 1H), 2,43-2,32 (m, 4H), 2,25-2,15 (m, 1H), 1,75-1,65 (m, 4H) ppm.

Sustancia Intermedia 4

(1R,2R)-2-Amino-1-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-3-pirrolidina-1-il-propan-1-ol

[0020]



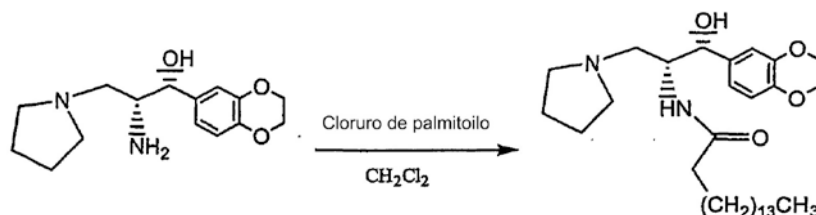
[0021] En una bomba de reacción de alta presión equipada con un agitador mecánico se cargó una Sustancia Intermedia **3** (0,91 g, 2,28 mmol) en 10:1 metanol/agua (22 mL), ácido trifluoroacético (0,18 mL, 2,3 mmol) y 20% de hidróxido de paladio sobre carbono (catalizador de Perlman; 0,91 g). El reactor fue evacuado y relleno con argón tres veces y luego evacuado y relleno con hidrógeno (100 psi). La reacción fue agitada durante dos días y luego evacuada y lavada con nitrógeno. La solución de reacción fue filtrada en Celite y concentrada. La goma verde grisácea resultante fue cromatografiada flash sobre gel de sílice (cloruro de metileno/amoniaco metanólico 2N) para dar 0,165 g (26%) de producto como una goma casi incolora:

¹H NMR (CDCl₃) δ 6.89-6,76 (m, 3H), 4,54 (d, *J* = 3.7, 1H), 4,25 (s, 4H), 3,43 (s, 1H), 3,14-3,07 (m, 1H), 2,68-2,41 (m, 6H), 1,82-1,71 (m, 4H) ppm.

Compuesto 5

(1*R*,2*R*)-ácido hexadecanoico [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidina-1-ilmetil-etil]-amida

[0022]

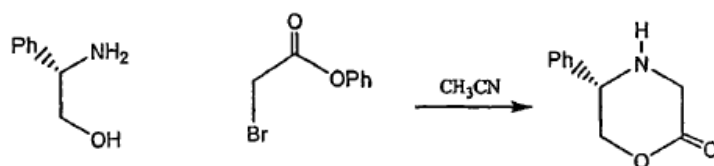


[0023] A una solución agitada de la Sustancia Intermedia **4** (0,165 g, 0,593 mmol) en cloruro de metileno (8 mL) SE añadió cloruro de palmitoilo (0,18 g, 0,59 mmol) seguido de *N,N*-diisopropiletilamina (0,11 mL, 0,65 mmol). La solución fue agitada durante 2 horas y luego concentrada. El residuo fue particionado entre acetato de etilo y solución de bicarbonato sódico acuosa. La capa orgánica fue secada (sulfato sódico) y concentrada. El sólido blanquecino resultante fue cromatografiado flash sobre gel de sílice (cloruro de metileno/amoniaco metanólico 2N) para dar 0,174 g (57%) de producto como un sólido blanco. Comparaciones por espectroscopia ¹H NMR y HPLC quiral analítica (columna: Chirex (S)-VAL y (R)-NE, 4.6 x 250 mm; eluyente: 0,5% de ácido trifluoroacético en 67:31:2 hexano/cloruro de metileno/etanol; caudal: 1mL/min; detección 280 nM) demuestran que esta sustancia era idéntica a una muestra del mismo compuesto preparada por el método de Polt, et al. (J. Org. Chem., 1998, 63, 8837). Se determinó que el exceso enantiomérico era 99,6%. La Ccontaminación total de los dos posibles diastereómeros es determinada como 0,2%. ¹H NMR (CDCl₃) δ 6,88-6,73 (m, 3H), 5,84 (d, *J* = 7,3,1H), 4,90 (d, *J* = 3,8,1H), 4,24 (s, 4H), 4,22-4,15 (m, 1H), 2,86-2,72 (m, 2H), 2,72-2,55 (m, 4H), 2,10 (t, *J* = 7,5, 2H), 1,82-1,74 (m, 4H), 1,58-1,46 (m, 2H), 1,32-1,16 (m, 24H), 0,88 (t, *J* = 6,7, 3H) ppm.

Ejemplo Comparativo 2 – Preparación a Gran Escala de Compuestos de tipo Ceramida

(5S)-5-Fenilmorfolina-2-ona

[0024]

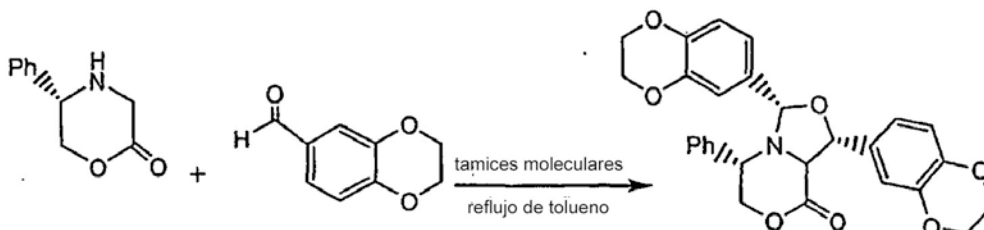


[0025] Una solución de S-(+)-fenilglicinol (Aldrich, 10.17 g, 78.12 mmol) y Diisopropiletilamina (Aldrich, 34 mL, 195 mmol, 2,5 equivalentes) fue preparada en CH₃CN (200 mL). Esta solución se añadió a fenil- α -bromoacetato (18,48 g, 85,9 mmol, 1,1 equivalentes) disuelto en CH₃CN (50 mL) bajo nitrógeno gota a gota durante 2 horas. La solución resultante fue agitada bajo nitrógeno durante 16-20 horas. El disolvente fue extraído por rotoevaporación manteniendo la temperatura del baño por debajo de 25° C. Al aceite se añadió acetato de etilo (120 mL) y la mezcla fue agitada durante 15 minutos. El precipitado blanco resultante fue filtrado y el sólido lavado con acetato de etilo (25 mL). El filtrado fue rotoevaporado hasta un aceite manteniendo la temperatura de baño por debajo de 25° C. Tras secarse bajo vacío durante 0,5 horas, el aceite fue disuelto en CH₂Cl₂ (17 mL) y cargado en una columna de gel de sílice (60 g envasados con 10% acetato de etilo/hexanos. Los puntos del subproducto superior fueron eluados con 10% de acetato de etilo/hexanos y el producto fue eluido con 50% de acetato de etilo/hexanos - 100% acetato de etilo. Las fracciones conteniendo el producto fueron rotoevaporadas a un aceite manteniendo la temperatura de baño por debajo de 25° C. Este aceite fue disuelto en acetato de etilo (12 mL) y se añadieron hexanos (60 mL) lentamente en un baño de hielo para precipitar el producto. El precipitado resultante fue filtrado. El sólido blanco a amarillo fue secado al vacío. La (5S)-5-fenilmorfolina-2-ona obtenida (7.4 g, 41.8 mmol, 53%) fue utilizada directamente en el siguiente paso.

Sustancia Intermedia 1

(1R,3S,5S,8aS)-1,3-Bis-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-5-fenil-tetrahidro-oxazolo[4,3-c][1,4]oxazina-8-ona

[0026]

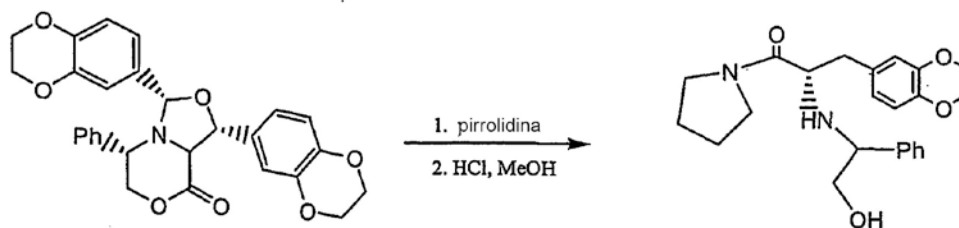


[0027] (5S)-5-fenilmorfolina-2-ona (7,4 g, 41,8 mmol) y benzodioxolano-6-carboxaldehído (Aldrich o Alfa Aesar, 20,56 g, 125,2 mmol, 3,0 equivalentes) se disolvió en tolueno (180 mL). La solución fue colocada en un aparato extractor soxhlet llenado con tamices moleculares 4 Å (ca 30 g). La solución fue refluada bajo nitrógeno durante 2-3 días. Tras enfriarse a temperatura ambiente, el disolvente fue eliminado por rotoevaporación y el aceite fue disuelto en acetato de etilo (200 mL). Se añadió una solución de bisulfito sódico (Aldrich, 50 g) en agua (100 mL) y la mezcla de dos fases fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. El sólido blanco resultante fue filtrado y lavado con acetato de etilo. El filtrado fue colocado en un embudo de decantación y las capas separadas. La capa orgánica fue lavada con agua (100 mL) y solución saturada de cloruro sódico (100 mL). La solución seca (Na₂SO₄) fue filtrada y rotoevaporada a un aceite espumoso amarillo-rojo (23,11 g). Tras secarse al vacío durante 1 hora, se añadió éter dietílico (350 ml) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 16-20 horas. El sólido blanco-amarillo fue filtrado. El sólido se secó al vacío. El cicloaducto fue obtenido con 46% de rendimiento (9,34 g).

Sustancia Intermedia 2

(2S,3R,1"S)-3-(2',3'-Dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-3-hidroxi-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-1-pirrolidina-1-il-propan-1-ona

[0028]

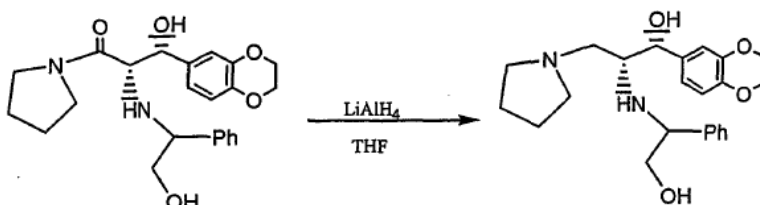


[0029] Al cicloaducto (Sustancia Intermedia 1, 6,7 g, 13.74 mmol) disuelto en cloruro de metileno (40 mL) se añadió pirrolidina (Aldrich, 5.7 mL, 68.7 mmol, 5 equivalentes). La solución fue agitada bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 16-18 horas. El disolvente fue rotoevaporado para dar un aceite amarillo espumoso que fue secado al vacío durante 0,5 horas. El crudo fue disuelto en metanol (115 mL) y se añadió una solución acuosa de HCl 1M (115 mL). La solución fue refluada durante 4 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, el metanol fue extraído por rotoevaporación. Se añadió acetato de etilo (60 mL) y el sistema de dos fases fue agitado a temperatura ambiente durante 5-15 minutos. Las dos capas fueron separadas y la capa orgánica fue extraída con HCl 1M (30 mL). Las capas acuosas combinadas fueron lavadas dos veces con acetato de etilo (60, 30 mL). Se añadió lentamente una solución saturada de bicarbonato sódico (150 mL) a la capa acuosa. El producto fue extraído tres veces con acetato de etilo (60 mL) de la capa acuosa básica (pH = 8-9). Las capas orgánicas combinadas conteniendo el producto fueron lavadas con una solución saturada de cloruro sódico (30 mL). Tras secado con Na₂SO₄ la solución fue filtrada y rotoevaporada para dar un sólido amarillo. La Sustancia Intermedia 2 fue obtenida con 93% de rendimiento (5.26 g).

15 Sustancia Intermedia 3

(1R,2R,1"S)-1-(2',3'-Dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-(2-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-3-pirrolidin-1-il-propan-1-ol

[0030]

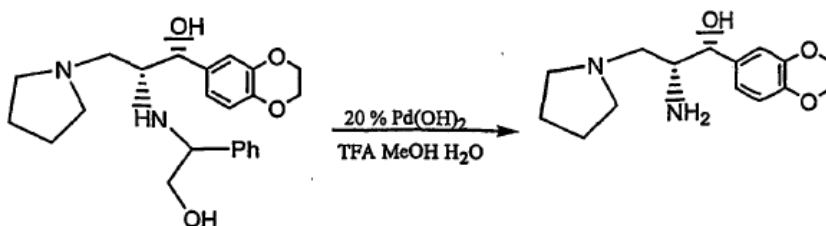


A un matraz de 3 bocas equipado con un embudo de adición y condensador se añadió LiAlH₄ (Aldrich, 1,2 g, 31,7 mmol, 2,5 equivalentes) y THF anhidro (20 mL) bajo nitrógeno. Una solución de Sustancia Intermedia 2 (5,23 g, 12,68 mmol) en THF anhidro (75 mL) se añadió gota a gota a la reacción durante 15-30 minutos. La reacción fue refluada bajo nitrógeno durante 9 horas. La reacción fue enfriada en un baño de hielo y fue cuidadosamente añadida una solución de NaOH 1 M gota a gota. Tras agitarse a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió agua (50 mL) y acetato de etilo (75 mL). Las capas fueron separadas y la capa acuosa fue extraída dos veces con acetato de etilo (75 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con solución saturada de cloruro sódico (25 mL). Tras secado con Na₂SO₄ la solución fue filtrada y rotoevaporada para dar un aceite espumoso incoloro a amarillo. La Sustancia Intermedia 3 fue obtenida con 99% de rendimiento (5,3 g).

Sustancia Intermedia 4

(1R,2R)-2-Amino-1-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-3-pirrolidin-1-il-propan-1-ol

30 [0031]

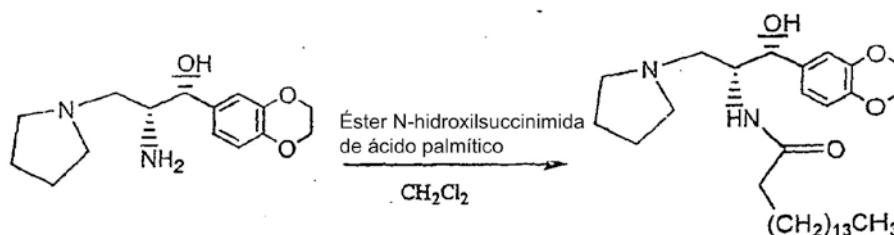


[0032] La Sustancia Intermedia 3 (5,3 g, 13,3 mmol) fue disuelta en metanol (60 mL). Se añadieron Agua (6 mL) y ácido trifluoroacético (2,05 mL, 26,6 mmol, 2 equivalentes). Tras ser colocado bajo nitrógeno, se añadió hidróxido de paladio 20% sobre carbono (catálisis de Pearlman, Lancaster o Aldrich, 5,3 g). La mezcla fue colocada en un Aparato Reactor de Presión Parr con inserto de vidrio. El aparato fue colocado bajo nitrógeno y luego bajo 110-120 psi de presión de hidrógeno. La mezcla fue agitada durante 2-3 días a temperatura ambiente bajo 100-120 psi de presión de hidrógeno. La reacción fue colocada bajo nitrógeno y filtrada por una compresa de Celite. La compresa de Celite fue lavada con metanol (100 mL) y agua (100 mL). El metanol fue extraído por rotoevaporación. La capa acuosa fue lavada con acetato de etilo tres veces (100, 50, 50 mL). Se añadió una solución de NaOH 10 M (10 mL) a la capa acuosa (pH = 12-14). El producto fue extraído de la capa acuosa tres veces con cloruro de metileno (100, 100, 50 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron secadas con Na₂SO₄, filtradas y rotoevaporadas a un aceite incoloro. El aceite espumoso fue secado al vacío durante 2h. La Sustancia Intermedia 4 fue obtenida con 90 % de rendimiento (3,34 g).

Compuesto 5

[15] **(1R,2R)-ácido hexadecanoico [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidina-1-ilmetil-etil] amide**

[0033]



[0034] A una solución de la Sustancia Intermedia 4 (3.34 g, 12.0 mmol) en cloruro de metileno (50 mL) se añadió una solución de éster N-hidroxilsuccinimida de ácido palmítico (Sigma, 4.24 g, 12.0 mmol) durante 15-30 minutos bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 18-20 horas. A la reacción se añadió cloruro de metileno (50 mL) y una solución de NaOH 1M (25 mL). El sistema de dos fases fue agitado a temperatura ambiente durante 15-30 min. Se añadió agua (25 mL) y las capas fueron separadas. La capa acuosa fue extraída de nuevo con cloruro de metileno (25 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas dos veces con agua (25 mL) y una vez con una solución saturada de cloruro sódico (25 mL). La capa orgánica fue secada con Na₂SO₄, filtrada y rotoevaporada a un aceite amarillo claro. El crudo fue recristalizado a partir de hexano (50 mL). El sólido blanco (5.46 g) obtenido fue separado sobre gel de sílice (300 g) con metanol 2%: cloruro de metileno - metanol 4%: cloruro de metileno - amonio 4% en metanol 2M: cloruro de metileno. El sólido blanco obtenido fue recristalizado de hexanos (70 mL). El Compuesto 5 fue obtenido con 66% de rendimiento (4,18 g). La HPLC quiral analítica (columna: Chirex (8)- VAL y (R)-NE, 4.6 x 250 mm; eluyente: ácido trifluoroacético 0.5% en 67:31:2 hexano/cloruro de metileno/etanol; caudal: 1 mL/min; detección: 280 nM) mostró que esta sustancia era 98,98% pura con 0,89% de un diastereoisómero y 0,14% del enantiómero.

Ejemplo comparativo 3 – Preparación Alternativa a Gran Escala de Compuestos tipo Ceramida

Sal (5S)-5- Fenilmorfolina-2-ona de HCl

[0035] Una solución de bromoacetato de fenilo (Aldrich, 862,17 g, 4,0 moles, 1.1 equivalentes) en acetonitrilo (grado del reactivo, 1500 ml) fue enfriada en un baño de hielo (temperatura interna por debajo de 5° C). A esta se añadió una lechada fría (temperatura interna por debajo de 5°C) de S-(+)-2-fenil glicinol (Aldrich, 500 g, 3,65 moles, 1 equivalente) y diisopropiletamina (DIPEA) (Aldrich, 1587 ml, 9,11 moles, 2,5 equivalentes) en acetonitrilo (2900 ml) en porciones manteniendo la temperatura interna por debajo de 10° C. La mezcla fue agitada a esta temperatura durante 30 minutos antes de que se eliminara el baño con hielo y se dejó agitar la mezcla f a temperatura ambiente durante unas 4 horas adicionales. El disolvente fue extraído en vacío mientras se mantenía la temperatura del baño

a 25° C. La mezcla fue coevaporada con acetato de etilo (2 x 500 ml) para producir un aceite viscoso amarillo claro. A la mezcla de reacción se añadió acetato de etilo (4500 ml) y el matraz fue sumergido en un baño con hielo con agitación. La mezcla se dejó enfriar a menos de 8° C. El sólido fue filtrado y lavado con acetato de etilo (3 x 250 ml). La solución fue enfriada a menos de 5° C. Gas de HCl seco fue pasado lentamente por la solución mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 15° C hasta que el pH estuvo por debajo de 2 (papel húmedo pH). La mezcla fue dejada agitar a esta temperatura y pH durante unos 20 minutos más antes de que el sólido fuese filtrado por succión. El sólido fue lavado con acetato de etilo (3 x 200 ml) y secado bajo alto vacío durante unas 20 horas. El rendimiento fue 412 g (53%). ¹H NMR fue coherente con la sal (5S)-5-fenilmorfolina-2-ona de HCl.

Sustancia Intermedia 1

10 **(1R,3S,5S,8aS)-1,3-Bis-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-5-feniltetrahidro-oxazolo [4,3-c][1,4]oxazin-8-ona**

[0036] A una suspensión agitada de sal (5S)-5-fenilmorfolina-2-ona de HCl (381g, 1 equivalente) en acetato de etilo 15% en tolueno (2270 ml) se añadió una solución de bicarbonato sódico (1,1 equivalentes) en agua (2000 ml). La solución bifásica resultante fue agitada a temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. La capa orgánica fue transferida a un matraz conteniendo 1,4-benzodioxan-6-carboxaldehído. El matraz fue luego equipado con una unidad Dean-Stark, un condensador y una entrada de nitrógeno. La mezcla fue calentada a reflujo con agitación mientras que se recogían unos 650 ml de disolvente (mezcla de acetato de etilo y tolueno) por medio de la unidad Dean-Stark. La solución amarilla-roja resultante se dejó a reflujo durante unas 64 horas, bajo nitrógeno mientras el agua formada durante la reacción se recogía en la unidad Dean-Stark. La mayor parte del disolvente fue luego eliminada por destilación a presión atmosférica por la unidad Dean-Stark. El disolvente residual fue luego eliminado por coevaporación con heptano (500 ml) y éter terc-butilmetílico (2 x 725 ml) para producir un producto semi sólido amarillo. El producto semi sólido fue disuelto en acetato de etilo (3400 ml). Se añadió una solución de bisulfito de sodio (920 g) en agua (1500 ml) y la mezcla fue dejada con agitación a temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. El sólido que se formó fue extraído por filtración y lavado con acetato de etilo (3 x 400 ml). El filtrado fue lavado con agua (1450 ml), solución de salmuera 5% (1450 ml) y secado sobre MgSO₄ (100 g). El disolvente fue extraído al vacío para suministrar un sólido amarillo. A esto se añadió éter terc-butilmetílico (2900 ml) y la suspensión fue agitada a temperatura ambiente durante 20 a 22 horas. El sólido amarillo fue filtrado por succión, lavado con éter terc-butilmetílico (2 x 600 ml) y secado por alto vacío a temperatura ambiente durante unas 22 horas. El rendimiento fue 400,5 g (58%). ¹H NMR y TLC fueron coherentes con la Sustancia Intermedia 1.

Sustancia Intermedia 2

30 **2S,3R,1"S)-3-(2',3'-Dihidro-benzo[1,4]dioxin-6'-il)-3-hidroxi-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-1-pirrolidin-1-il-propan-1-ona**

[0037] Una solución de la Sustancia Intermedia 1 (312 g, 0,64 moles), pirrolidina (267 ml, 3,2 moles, 5 equivalentes) y tetrahidrofurano (1350 ml) fue calentada a reflujo durante 4,5 horas en atmósfera de nitrógeno. El disolvente y el exceso de pirrolidina se eliminaron al vacío para producir la sustancia intermedia cruda como un aceite viscoso naranja. El aceite fue disuelto en metanol (3000 ml) y solución de ácido clorhídrico 1M (3000 ml). La solución resultante fue calentada a reflujo durante unas 7 horas. El disolvente fue luego extraído al vacío para dar una mezcla de un aceite y agua. A esto se añadió acetato de etilo (2000 ml) y fue separada la capa acuosa. La capa orgánica fue extraída con HCl acuoso 1M (1000 ml). Las capas acuosas fueron combinadas y lavadas con acetato de etilo (2000 ml). La capa acuosa fue enfriada en un baño de hielo. El pH de la capa acuosa fue ajustado a cerca de 9 (papel pH) con NaOH acuoso 10M (525 ml). La capa acuosa fue extraída con acetato de etilo (3000 ml). La capa orgánica fue lavada con solución de salmuera 5% (1000 ml) y secada (Na₂SO₄). El disolvente fue eliminado en vacío para producir un aceite viscoso amarillo. El rendimiento fue 213,4 g, 81 %. ¹H NMR fue coherente con la Sustancia Intermedia 2.

Sustancia Intermedia 3

45 **1R,2R,1"S)-1-(2',3'-Dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-3-pirrolidin-1-il-propan-1-ol**

[0038] A una suspensión de LiAlH₄ (50,7g, 1,34 moles, 2,6 equivalentes) en tetrahidrofurano (700 ml) se añadió lentamente una solución de la Sustancia Intermedia 2 (213.34 g, 0.517 moles) en tetrahidrofurano (2000 ml) con agitación a temperatura ambiente. La mezcla fue refluja durante unas 4 horas. Análisis de TLC (metanol 10% en cloruro de metileno, v/v) indicó consunción de la materia prima. La mezcla de reacción fue enfriada en un baño de hielo (por debajo de 5° C) y se añadió agua (135 ml) muy lentamente mientras se mantenía la temperatura interna a menos que o igual a 10° C. A esto fue luego añadida una solución NaOH acuosa 15% (70 ml) seguida de agua (200 ml). La mezcla de reacción fue dejada calentar a temperatura ambiente mientras se continuaba con la agitación. Luego se añadió cloruro de metileno (1000 ml) a la mezcla y las sales fueron filtradas por una compresa de Celite. Las sales se lavaron con cloruro de metileno (2 x 500 ml). Los filtrados se combinaron y el disolvente fue eliminado al vacío para producir un aceite amarillo. El aceite fue disuelto en HCl acuoso 1M (1500 ml) y lavado con acetato de etilo (3 x 500 ml). La capa acuosa fue enfriada en un baño de hielo hasta menos de 5° C y el pH de la capa acuosa fue ajustado a 12-13 con una solución acuosa NaOH 10 M (220 ml) manteniendo la temperatura interna menor que o igual a 10° C. La mezcla fue dejada calentar a temperatura ambiente. La capa acuosa fue extraída con cloruro de

metileno (2 x 500 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas y lavadas con solución de salmuera (500 ml), secadas (Na₂SO₄) y el disolvente fue eliminado en vacío para dar un aceite viscoso amarillo. El rendimiento fue 186,4 g (88.5%). ¹H NMR fue coherente con la Sustancia Intermedia 3.

Sal de Dioxalato de Sustancia Intermedia 4

5 Sal de dioxalato de (1R,2R)-2-Amino-1-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-3-pirrolidin-1-il-propan-1-ol

[0039] Una suspensión de la Sustancia Intermedia 3 (358 g, 0.90 moles), etanol (1500 ml), solución de HCl 1M (1500 ml) y Pd(OH)₂ 10% (32 g, 20 % en peso) se hidrogenó a unas 50 psi durante unas 36h a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada por un filtro Cuono. El filtro Cuono fue lavado con 10% de etanol en agua (500 ml). Los filtrados se combinaron y el etanol fue eliminado al vacío. La capa acuosa fue extraída con acetato de etilo (3 x 600 ml). La capa orgánica fue extraída con HCl acuoso 1M (700 ml). Las capas acuosas fueron combinadas y enfriadas en un baño de hielo (0 a unos 5° C). El pH de la capa acuosa fue ajustado a cerca de 12 (papel pH) con solución acuosa de NaOH 10 M (490 ml) manteniendo la temperatura interna por debajo de 10° C. La capa acuosa fue dejada calentar a temperatura ambiente.

15 La capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno (2 x 1500 ml, 1 x 750 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y el disolvente fue eliminado in vacuo para dar un aceite viscoso amarillo. El peso crudo fue 214.3 g (86%). ¹H NMR fue coherente con la Sustancia Intermedia 4.

[0040] Una solución de ácido oxálico (152.4 g, 1.693 moles, 2.2 equivalentes) en metil isobutil cetona (2300 ml) se añadió lentamente con agitación a una solución de la Sustancia Intermedia 4 (214.3 g, 0.77 moles, 1 equivalente) en metil isobutil cetona (800 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante fue agitada a temperatura ambiente durante unas 2,5 horas. El sólido fue filtrado, y triturado con acetona (2000 ml) a temperatura ambiente durante unas 16 horas. El sólido fue filtrado, lavado con acetona (3 x 100 ml) y secado en alto vacío para producir un sólido blanquecino. El rendimiento fue 312.5 g (89%). ¹H NMR fue coherente con la sal de dioxalato de la Sustancia Intermedia 4.

Compuesto 5

25 Ácido (1R,2R)-hexadecanoico [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidin-1-ilmetil-etil]-amida

[0041] A una solución fría (unos 5° C) de sal de dioxalato de la Sustancia Intermedia 4 (507 g, 1.11 moles) en agua (10 L) se añadió una solución acuosa de NaOH 10 M (500 ml) con agitación mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 10° C. La solución fue dejada calentar a temperatura ambiente mientras el pH de la solución fue mantenido a cerca de 14 (papel pH). La capa acuosa fue extraída con cloruro de metileno (3 x 6000 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, lavadas con agua (2000 ml), secadas (MgSO₄) y se eliminó el disolvente al vacío para suministrar un aceite amarillo viscoso, Sustancia Intermedia 4. El rendimiento fue 302 g (98%). ¹H NMR fue coherente con la Sustancia Intermedia 4.

[0042] Una solución de éster NHS de ácido palmítico (Sigma, 382.5 g, 1.01 equivalentes) en cloruro de metileno (2500 ml) se añadió a una solución de la Sustancia Intermedia 4 (302 g) en cloruro de metileno (1500 ml) a temperatura ambiente durante un periodo de 1,25 horas bajo atmósfera de nitrógeno. La se dejó en agitación a temperatura ambiente durante unas 18 horas. Se añadió una solución acuosa de NaOH 1M (2425 ml) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante unas 3 horas. La capa orgánica fue separada y la capa acuosa fue extraída con cloruro de metileno (800 ml). Las capas orgánicas fueron combinadas, lavadas con una solución de NaOH 1M (3 x 1500 ml) y agua (1500 ml). La capa orgánica fue secada sobre MgSO₄ y el disolvente fue eliminado al vacío para dar un semisólido. El semisólido fue coevaporado con heptano (3 x 100 ml). El producto crudo fue transferido a un matraz RB de tres bocas de 12 L y se añadió heptano (7500 ml). La mezcla fue calentada a reflujo con agitación en atmósfera de nitrógeno. La solución fue lentamente enfriada a unos 55° C (temperatura interna) y vertida en otro matraz. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 24 horas en atmósfera de nitrógeno. El sólido blanquecino fue filtrado, lavado con heptano (2 x 500 ml) y secado en alto vacío durante 24 horas. El sólido (397 g) fue transferido a un matraz RB de 12 L y se añadió 30% de acetato de etilo en heptano (8000 ml). La mezcla resultante fue calentada a reflujo durante 30 minutos con agitación. La solución fue enfriada a unos 55° C (temperatura interna) y vertida en otro matraz. La agitación continuó a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno durante unas 24 horas. El sólido fue filtrado, lavado con heptano (2 x 100 ml) y secado a alto vacío para dar un sólido blanquecino. El rendimiento fue 324 g (58%). ¹H NMR yTLC fueron coherentes con el Compuesto 5. mp 96. Análisis HPLC a 1°C: pureza quiral 99.7%, pureza química 99.7%. Anal. Calcd for C₃₁H₅₂N₂O₄: C, 72.05; H, 10.14; N, 5.42. Hallado C, 72.03; H, 10.19; N, 5.42.

Ejemplo 4 – Preparación de Compuestos 6-8

[0043] Ésteres de N- hidroxisuccinimida de ácidos grasos se prepararon por el método de Lapidot, Y. Rappoport, S. and Woman, Y. Journal of Lipid Research 8,1967 o como se describe a continuación :

Éster de N-Hidroxisuccinimida de Ácido Octanoico

[0044] N-hidroxisuccinimida (Aldrich, 20.0 g, 173 mmol) y trietilamina (29 mL, 208 mmol) fueron disueltas en cloruro de metileno en un baño de hielo bajo nitrógeno. Cloruro de octanoilo (Aldrich, 35 mL, 205 mmol) se añadió gota a gota durante 0,5 horas. El baño de hielo fue eliminado y la solución con un sólido blanco fue agitada durante 1 hora a temperatura ambiente. El sólido blanco fue extraído por filtración y el filtrado fue lavado con agua (100 mL) y bicarbonato sódico acuoso saturado (100 mL). La capa orgánica fue secada con sulfato de sodio, filtrada y se añadió heptano (100 mL). La solución fue rotoevaporada para eliminar la mayoría del cloruro de metileno y dejar un precipitado incoloro a blanco escamoso en heptano. El precipitado fue filtrado y lavado con heptano. Tras secado, se obtuvo éster de N-hidroxisuccinimida de ácido octanoico con 84 % de rendimiento (35.4 g). : $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) 2.84 (br s, 4H), 2.60 (t, $J = 7.48$ Hz, 2H), 1.78-1.71 (m, 2H), 1.42-1.26 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 6.7$ Hz, 3H) ppm.

10 Compuesto 6

(1R,2R)-ácido octanoico [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidina-1-ilmetil-etil]-amida

[0045]



[0046] A la Sustancia Intermedia 4 (22.36 g, 80.33 mmol) disuelta en cloruro de metileno anhidro (300 mL) se añadió una solución de éster de N-hydroxysuccinimida de ácido octanoico (19.4 g, 80.39 mmol) disuelto en cloruro de metileno anhidro (150 mL) durante 15-30 minutos bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 18-20 horas. A la reacción se añadió solución acuosa de NaOH 1M (200 mL). El sistema de dos fases fue agitado a temperatura ambiente durante 45 minutos. Las capas fueron separadas y las capas orgánicas combinadas se lavaron dos veces con NaOH 1M (2 x 200 mL) y dos veces con agua (2 x 100 mL). La capa orgánica fue secada con sulfato de sodio, filtrada y rotoevaporada a un aceite amarillo. La mayor parte de la sustancia cruda fue disuelta en 5% de acetato de etilo en heptano (1 L) a reflujo. Tras enfriarse a 40° C, la solución opacificada fue separada del aceite amarillo decantando la solución en un nuevo matraz. El primer matraz fue aclarado dos veces con 5% de acetato de etilo en heptano (2 x 250 mL) por el mismo proceso (reflujo y enfriamiento a 40° C y decantando la solución del aceite). La solución combinada fue calentada a reflujo y dejada enfriar a temperatura ambiente durante 4 horas. El sólido blanco resultante fue filtrado y lavado con 5% de acetato de etilo en heptano (100 mL) y heptano (100 mL). El sólido blanco (13.9 g) fue secado al vacío durante 16-24 horas. Este sólido fue en su mayor parte disuelto en 5% de acetato de etilo en heptano (800 mL) a reflujo. Tras enfriarse a 50°C, la solución opacificada fue separada del aceite amarillo decantando la solución en un nuevo matraz. El primer matraz fue aclarado con 5% de acetato de etilo en heptano (100 mL) por el mismo proceso (reflujo y enfriamiento 50° C y decantando la solución del aceite). La solución combinada fue calentada a reflujo y dejada enfriar a temperatura ambiente durante 4 horas. El sólido blanco resultante fue filtrado y lavado con acetato de etilo 5% /heptano (50 mL) y heptano (50 mL). Tras secarse a temperatura ambiente al vacío durante 2-3 días, fue obtenido el Compuesto 6 con 39% de rendimiento (12,57 g). La HPLC analítica quiral (columna: Chirex (S)-VAL y (R)-NE, 4.6 x 250 mm) mostró que esta sustancia era 99,9% del isómero R,R deseado. La HPLC analítica mostró que esta sustancia era 99.6% pura. mp 87-88 °C. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.86-6.73 (m, 3H), 5.84 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 4.91 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.25 (s, 4H), 4.24-4.18 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 2H), 2.69-2.62 (m, 4H), 2.10 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.55-1.45 (m, 2 H), 1.70-1.85 (m, 4H), 1.30-1.15 (m, 8H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H) ppm.

Compuesto Comparativo 7

Ácido (1R,2R)- nonanoico [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxina-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidina-1-ilmetil-etil]- amida

[0047]

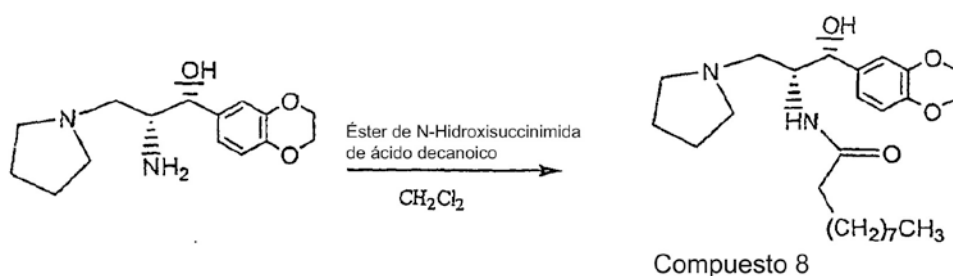


5 **[0048]** Este compuesto fue preparado por el método descrito para el Compuesto 6 usando N- Éster de Hidroxisuccinimida de ácido nonanoico. La HPLC analítica mostró que esta sustancia era 98.4 % pura. mp 74-75° C. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 6.86-6.76 (m, 3H), 5.83 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 4.24 (s, 4H), 4.24-4.18 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 2H), 2.69-2.62 (m, 4H), 2.10 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.55-1.45 (m, 2 H), 1.70-1.85 (m, 4H), 1.30-1.15 (m, 10H), 0.87 (t, J = 6.9 Hz, 3H) ppm.

Compuesto Comparativo 8

(1R,2R)-Decanoico [2-(2',3'-dihidro-benzo[1,4]dioxin-6'-il)-2-hidroxi-1-pirrolidin-1-ilmetil-etil]-amida

10 **[0049]**



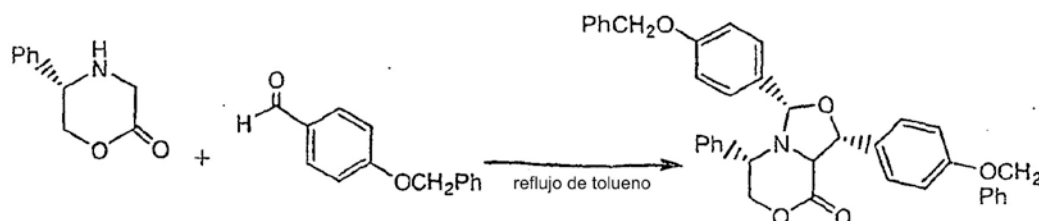
15 **[0050]** Este compuesto fue preparado por el método descrito para el Compuesto 6 usando éster de N-hidroxisuccinimida de ácido decanoico. La HPLC analítica mostró que esta sustancia era 99.3 % pura. mp 97.5-98.5° C. $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 6.86-6.76 (m, 3H), 5.83 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.90 (d, J = 3.4 Hz, 1H), 4.24 (s, 4H), 4.24-4.18 (m, 1H), 2.85-2.75 (m, 2H), 2.69-2.62 (m, 4H), 2.10 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.55-1.45 (m, 2 H), 1.70-1.85 (m, 4H), 1.30-1.15 (m, 12H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H) ppm.

Ejemplo Comparativo 5 – Preparación del Compuesto 13

Sustancia Intermedia 9

(1R,3S,5S,8aS)-1,3-Bis-(4-benziloxi-fenil)-5-fenil-tetrahidro-oxazolo[4,3-c][1,4]oxazin-8-ona

20 **[0051]**



[0052] La sal (5S)-5-fenilmorfolina-2-ona de HCl (57.45, 268.9 mmol) fue agitada con acetato de etilo (500 mL) y bicarbonato sódico acuoso saturado (250 mL) durante 30 minutos, hasta que la solución bifásica estuvo clara. Las

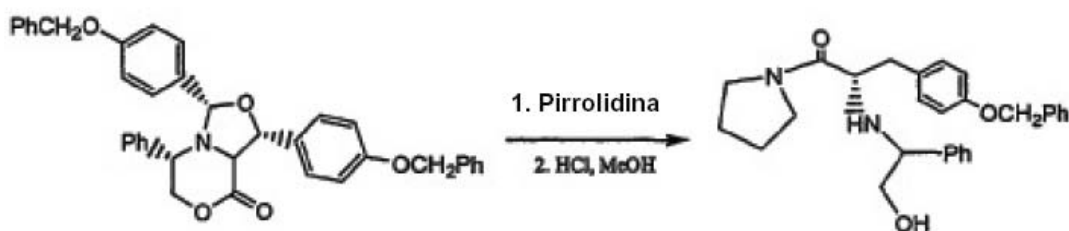
fases fueron separadas, y la capa acuosa extraída con acetato de etilo (2 x 250 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de cloruro sódico (250 mL). La capa orgánica fue secada con sulfato de sodio, filtrada, concentrada a un aceite, y secada al vacío durante 60 minutos. La 5-(S)-fenil morfolina-2-ona fue obtenida con 86% de rendimiento (40,98 g, 231,3 mmol).

- 5 **[0053]** La 5-(S)-fenil morfolina-2-ona (40,98 g, 231,3 mmol) y 4-benziloxibenzaldehído (Aldrich, 147,3 g, 694 mmol, 3,0 equivalentes) se disolvieron en tolueno (750 mL). La reacción fue ajustada con un Dean Stark Trap y un condensador de reflujo. La solución fue reflujaada bajo nitrógeno durante 2 días. Tras enfriar a temperatura ambiente, el disolvente fue eliminado por rotoevaporación y el aceite fue disuelto en acetato de etilo (500 mL). Se añadió una solución de bisulfito de sodio (Aldrich, 125 g) disuelta en agua (250 mL) y la mezcla de dos fases fue agitada a temperatura ambiente durante 3 horas. El sólido blanco resultante fue extraído por filtrado y lavado con acetato de etilo. El filtrado fue colocado en un embudo de decantación y las capas separadas. La capa orgánica fue lavada con agua (250 mL), solución saturada de cloruro de sodio (250 mL) y luego secada (sulfato de sodio) filtrada y rotoevaporada a un aceite espumoso (144 g). Tras secar al vacío durante 1 hora, se añadió terc-butil metil éter (1450 mL) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 5 horas. El sólido blanco-amarillo resultante fue filtrado. El sólido fue secado al vacío. La Sustancia Intermedia 9 fue obtenida con 27% de rendimiento (41,64 g, 71,46 mmol). $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7,5-6,8 (m, 23H), 5,0 y 5,1 (2 s, 4H), 4,5-4,3 (m, 2H), 4,2-4,1 (m, 2H) ppm.

Sustancia Intermedia 10

(2S,3R,1"S)-3-(4-Benziloxi-fenil)-3-hidroxi-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-1-pirrolidina-1-il-propan-1-ona

[0054]

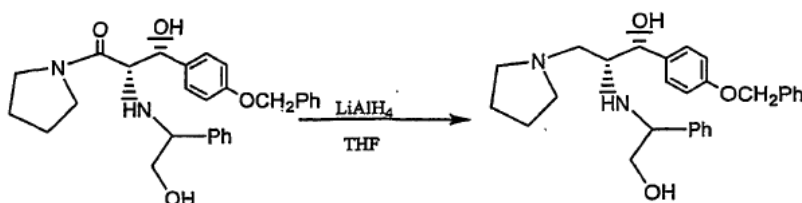


- 20 **[0055]** A la Sustancia Intermedia 9 (45,1 g, 77,4 mmol) disuelta en tetrahidrofurano (250 mL) se añadió pirrolidina (Aldrich 33 mL, 395 mmol, 5,1 equivalentes). La solución fue agitada tapada bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante 16-18 horas. El disolvente fue rotoevaporado para dar un aceite espumoso amarillo que fue secado al vacío durante 0,5 horas. El crudo fue disuelto en metanol (220 mL) y se añadió una acuosa solución de HCl 1M (220 mL). La solución fue reflujaada durante 4 horas. Tras enfriarse a temperatura ambiente, el metanol fue eliminado por rotoevaporación. Al aceite resultante se añadió lentamente NaOH acuoso 10M (22 mL para ajustar el pH a 14). El producto fue extraído tres veces con cloruro de metileno (300, 100, 100 mL) de la capa básica acuosa. Tras secarse con sulfato de sodio la capa orgánica combinada fue filtrada y rotoevaporada para dar un sólido espumoso amarillo-naranja. Se añadió terc-butil metil éter (300 mL) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 7 horas. El sólido blanco-amarillo resultante fue filtrado, lavado con terc-butil metil éter (50 mL) y secado al vacío. La Sustancia Intermedia 10 fue obtenida con 83% de rendimiento (29,77 g). $^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ 7,4-7,2 (m, 12H), 6,9-6,8 (m, 2H), 5,05 (AB quartet, 2H), 4,47 (d, J = 8,5, 1H), 3,9-3,3 (m, 3H), 3,05 (d, J = 8,5, 1H), 3,0-2,8 (m, 2H), 2,3-2,2 (m, 1H), 1,85-1,7 (m, 1H), 1,45-1,15 (m, 4H) ppm.

Sustancia Intermedia 11

- 35 **(1R,2R,1"S)-1-(4-Benziloxi-fenil)-2-(2"-hidroxi-1"-fenil-etilamino)-3-pirrolidin-1-il-propan-1-ol**

[0056]

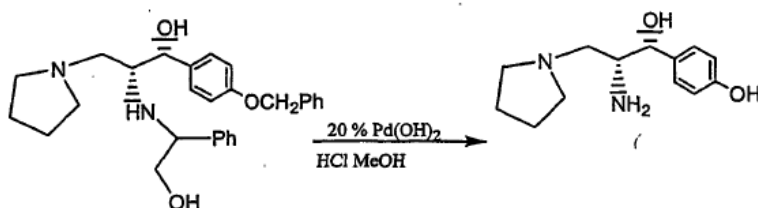


[0057] En un matraz de tres bocas con embudo de adición y condensador bajo nitrógeno se añadió LiAlH₄ (Aldrich, 6,3 g, 166 mmol, 2,57 equivalentes) y anhidro tetrahidrofurano (75 mL). Se añadió una solución de la Sustancia Intermedia **10** (29.7 g, 64.48 mmol) en tetrahidrofurano anhidro (300mL) gota a gota a la reacción durante 15-30 minutos. La reacción fue reflujaada bajo nitrógeno durante 9 horas. La reacción fue enfriada en un baño de hielo y se añadió agua (7.0 mL) muy cuidadosamente gota a gota (vigorosa reacción exotérmica con hidrógeno emitido). Una solución acuosa 15% de NaOH (7.0 mL) se añadió gota a gota seguida de agua (21 mL). A mitad de camino de la adición final de agua se formó una gran cantidad de un sólido blanco. Fue separado por adición de cloruro de metileno (250 mL). Tras agitar a temperatura ambiente durante 15 minutos, la mezcla fue filtrada por medio de un tapón de Celite (17 cm de diametro por 1 cm de altura). El precipitado fue lavado con cloruro de metileno (2 x 250 mL). El filtrado fue rotoevaporado a un aceite. El aceite fue disuelto en HCl acuoso 1M (300 mL). Esta capa acuosa fue lavada con terc-butil metil éter (2 x 200 mL). Tras enfriarse en un baño de hielo, fue cuidadosamente añadido NaOH acuoso 10M (35 mL) a la capa acuosa (pH final =14). El producto fue extraído tres veces con cloruro de metileno (300 mL, 200 mL y 100 mL). Tras secarse con sulfato de sodio, la solución fue filtrada y rotoevaporada para dar un sólido blanco. Tras secarse, la Sustancia Intermedia **11** fue obtenida con 94% de rendimiento (26,9 g). ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.46-7.115 (m, 12H), 6.98-6.96 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.49 (d, J = 4.7, 1H), 3.70-3.65 (m, 1H), 3.60-3.55 (m, 1H), 3.54-3.45 (m, 1H), 3.00-2.90 (m, 1H), 2.7-2.6 (m, 1H), 2.36 (br s, 4H), 2.15-2.05 (m, 1H), 1.70 (br s, 4H) ppm.

Sustancia Intermedia 12

Sal de cloruro de hidrógeno (1R,2R)-2-Amino-1-(4-benziloxi-fenil)-3-pirrolidina-1-il-propan-1-ol

[0058]

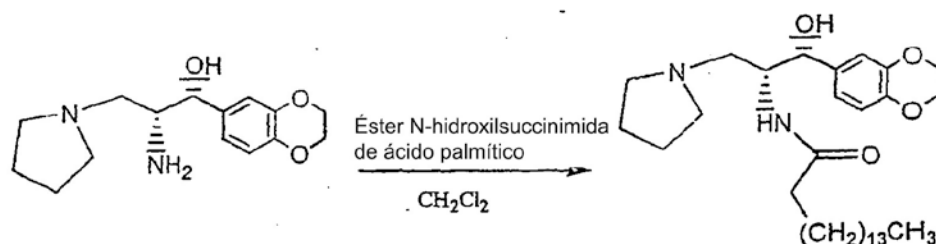


[0059] La Sustancia Intermedia **11** (26,9 g, 60,24 mmol) fue disuelta en metanol (400 mL) y se añadió HCl acuoso 1M (130 mL). Tras ser colocada bajo nitrógeno, se añadió 20% de hidróxido de paladio sobre carbono (Catálisis de Pearlman, Aldrich, 10,8 g). La reacción se colocó bajo nitrógeno y luego bajo hidrógeno por evacuación y llenado a un globo. La mezcla fue agitada durante 48 horas a temperatura ambiente bajo un globo de hidrógeno. La reacción fue colocada bajo nitrógeno y filtrada por medio de una compresa de celite. La compresa de Celite fue lavada con 10% de agua en metanol (250 mL) y agua (50 mL). El disolvente fue eliminado por rotoevaporación y coevaporación con tolueno (3x 100 mL). El sólido espumoso fue disuelto en isopropanol (300 mL) a reflujo. La solución fue enfriada a temperatura ambiente y se añadió terc-butil metil éter (550 mL). Tras agitarse a temperatura ambiente durante 2 horas, el sólido blanco fue filtrado y lavado con terc-butil metil éter. Tras secado, fue obtenida la Sustancia Intermedia **12** con cerca de 99% de rendimiento (18 g). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 9.68 (br s, 1H), 8.53 (br s, 2H) 7.24 (d, J = 8.55 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 8.55 Hz, 2H), 4.72 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 3.8-3.6 (m, 2H), 3.4-3.6 (m, 3H), 3.0-3.2 (m, 2H), 2.7-2.5 (br s, 1H), 2.0-1.7 (br s, 4H) ppm.

Compuesto 13

(1R,2R)-ácido hexadonoico [2-(4-benziloxi-fenil)-2-hidroxi-1-pirrolidina-1-ilmetil-etil]-amida

[0060]

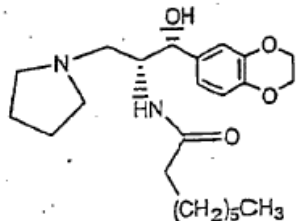


5 [0061] A la Sustancia Intermedia **12** (16,17 g 49,36 mmol) suspendida en tetrahidrofurano (500 mL) se añadió trietilamina (28 mL, 4 equivalentes). Se añadió una solución de éster de N-hidroxisuccinimida de ácido palmítico (Sigma, 19.2 g, 54.29 mmol) disuelta en tetrahidrofurano (125 mL) durante 30 minutos bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 18-20 horas. El precipitado blanco fue extraído por filtración y el filtrado fue rotoevaporado a un sólido blanquecino espumoso (35,5 g). La sustancia cruda fue disuelta en cloruro de metileno (500 mL) y lavada con agua (100 mL) y solución acuosa saturada de carbonato sódico (100 mL). Tras secarse con sulfato de sodio, la solución fue filtrada y rotoevaporada para dar un sólido espumoso blanquecino (24,75 g). Esta sustancia fue recristalizada de 40% de acetato de etilo en heptano (500 mL, filtración en caliente). El Compuesto 13 fue obtenido con 61% de rendimiento (14.45 g) La HPLC quiral analítica 10 mostró que esta sustancia era 99,7% del isómero R, R deseado. La HPLC analítica mostró que esta sustancia era 99,6% pura. mp 95-97°C. ¹H NMR(CDCl₃) δ 7.15 (d, J= 8.5Hz, 2H), 6.70 (d, J= 8.5 Hz, 2H), 6.0 (d, J= 7.3, 1H), 4.96 (d, J = 3.8, 1H), 4.3-4.2 (m, 1H), 2.9-2.7 (m, 2H), 2.65-2.55 (m, 4H), 2.10 (t, J = 7.5, 2H), 1.75 (br s, 4H), 1.58-1.46 (m, 2H), 1.32-1.16 (m, 24H), 0.9 (t, J = 6.7, 3H) ppm.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



- 5 o un sal fisiológicamente aceptabl de la misma.
2. Compuesto según la Reivindicación 1 en la forma de la sal tartrato.
3. El compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 para uso en terapia.
4. Uso del compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento para inhibir la GlcCer Sintasa o reducir concentraciones de GSL en un sujeto con necesidad de tal tratamiento.
- 10 5. Uso del compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la Enfermedad de Gaucher.
6. Uso del compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la Enfermedad de Fabry.
- 15 7. Compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 para uso en inhibir la GlcCer Sintasa o reducir concentraciones de GSL en un sujeto con necesidad de tal tratamiento.
8. Compuesto de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 para uso en el tratamiento de la Enfermedad de Gaucher.
9. Compuesto de la Reivindicación 1 o de la Reivindicación 2 para la utilización en el tratamiento de la Enfermedad de Fabry.

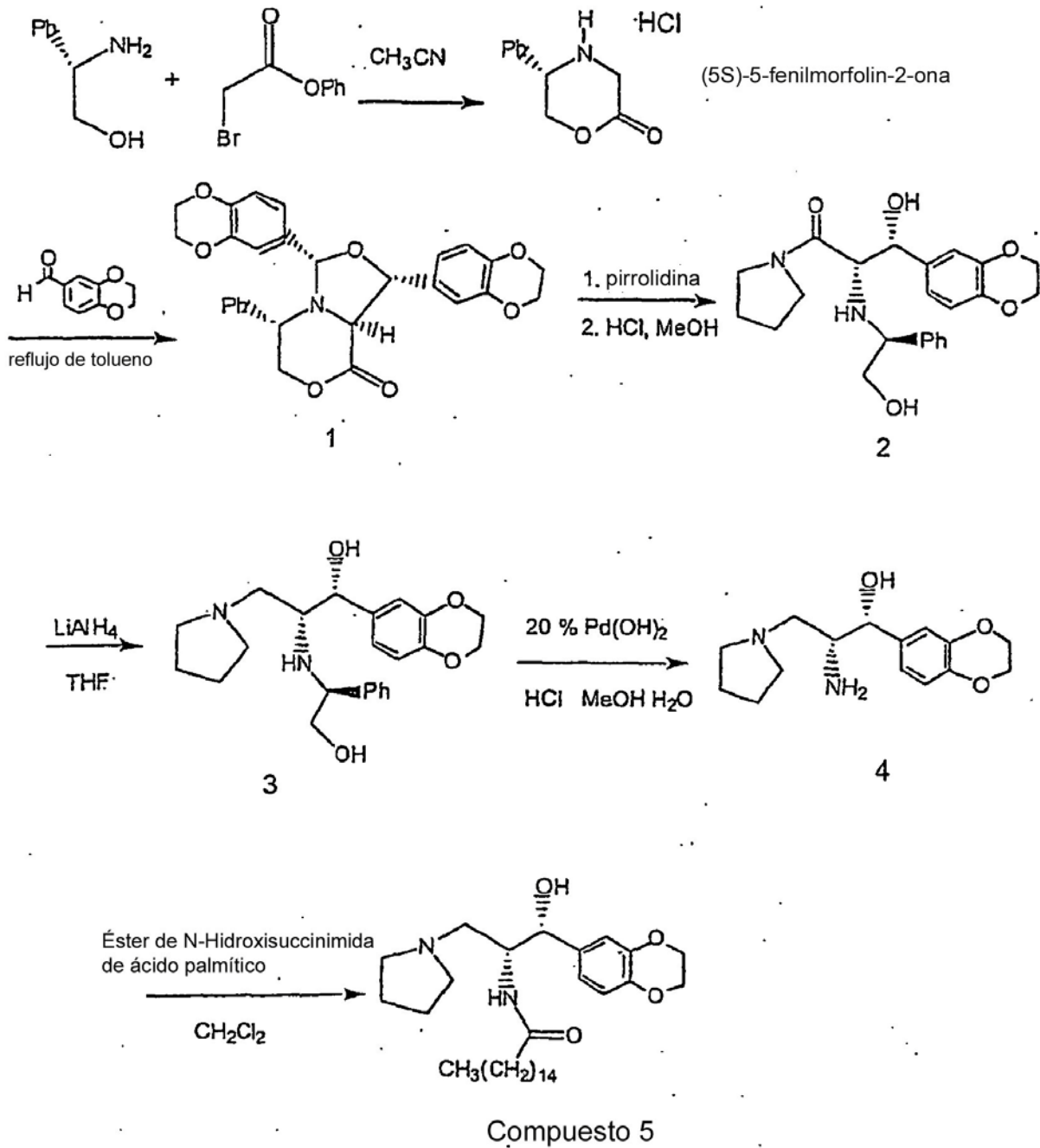


Figura 1

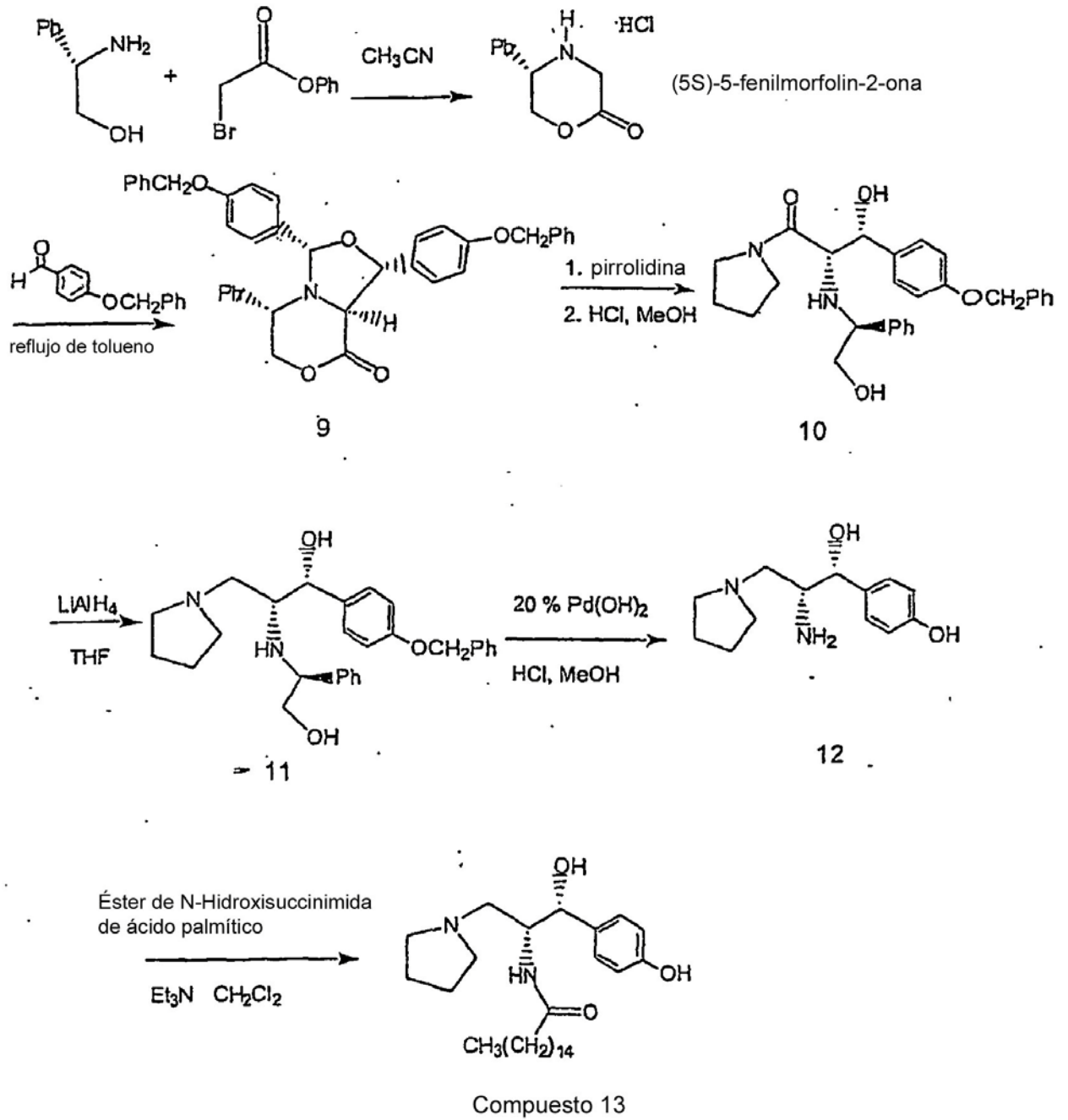
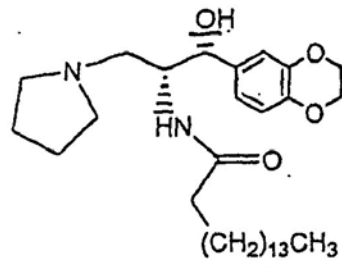
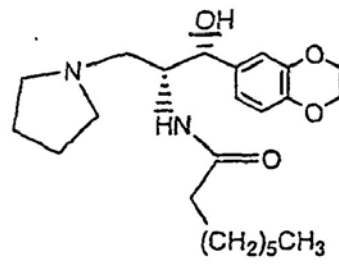


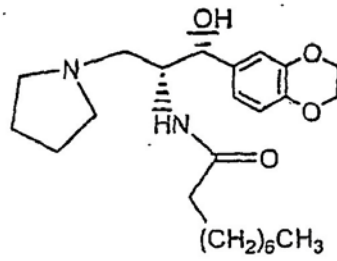
Figura 2



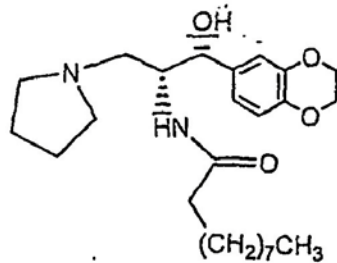
Compuesto 5



Compuesto 6



Compuesto 7



Compuesto 8

Figura 3