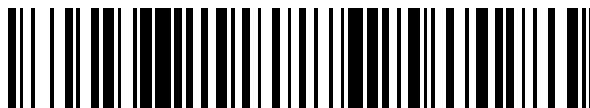


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 104**

21 Número de solicitud: 201131002

51 Int. Cl.:

C07D 303/14 (2006.01)

C07D 203/26 (2006.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 31/39 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.06.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.06.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**LLEBARIA SOLDEVILA, Amadeo y
HARRAK SERIFI, Youssef**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **EPÓXIDOS Y AZIRIDINAS DE CICLOHEXANO RELACIONADOS ESTRUCTURALMENTE CON LA GALACTOSA COMO INHIBIDORES SELECTIVOS DE GALACTOSIDASAS.**

57 Resumen:

Epóxidos y aziridinas de ciclohexano relacionados estructuralmente con la galactosa como inhibidores selectivos de galactosidasas.

La presente invención se refiere a una familia de epóxidos y aziridinas derivadas de ciclohexano que poseen una similitud estructural con la galactosa y presentan propiedades como inhibidores de galactosidasas. Además la presente invención también se refiere al uso de estos compuestos como herramienta biotecnológica, como reactivo de biología molecular, así como, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades asociadas a la glicosilación de lípidos y proteínas.

ES 2 408 104 A1

DESCRIPCIÓN

Epóxidos y aziridinas de ciclohexano relacionados estructuralmente con la galactosa como inhibidores selectivos de galactosidasas

SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se encuadra dentro de los campos de la química y la farmacia. En particular, se refiere a una familia de compuestos estructuralmente relacionados con la molécula de galactosa y su uso como inhibidores de galactosidasas con actividad terapéutica.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Las galactosidasas son una clase de las glicosil hidrolasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de sacáridos, que están especializadas en la degradación de galactósidos y que desarrollan su función en todos los seres vivos. Estas enzimas tienen funciones biológicas muy diversas asociadas a la degradación de mono o polisacáridos, liberando galactosa y un lípido, péptido, proteína u otro sacárido.

En función de la estereoquímica alfa o beta del galactósido que actúa como sustrato de las enzimas, se pueden distinguir dos clases de galactosa hidrolasas, las α -galactosidasas y las β -galactosidasas, respectivamente.

15 En los seres vivos las α -galactosidasas y las β -galactosidasas son enzimas esenciales, cuyas deficiencias están asociadas a diversas enfermedades que tienen su origen en la acumulación del sustrato de la enzima. Una actividad exacerbada de estas enzimas puede también conducir a diversas disfunciones o incluso estados patógenicos, debido a una insuficiente o aberrante glicosilación de lípidos o proteínas. Aparte de sus funciones generales en el mantenimiento de la homeostasis de los carbohidratos celulares y de las funciones en la digestión de los mismos, existen algunas funciones específicas de dichas enzimas en otros importantes procesos celulares tales como el papel de una β -galactosidasa en el operon Lac de bacterias que metabolizan lactosa y que se usa ampliamente en biología molecular, biotecnología, genética y otras ciencias de la vida (Nolan, G.P. et al. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**, *85*, 2603-2607; Joung J, Ramm E, Pabo C *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**, *97*, 7382-7).

25 Además de sus actividades biológicas en células y en organismos vivos, las galactosidasas son útiles industrialmente, por ejemplo en la degradación de materiales naturales que contienen galactosa, en la industria alimentaria y cómo catalizadores en la preparación de productos químicos.

30 En estas circunstancias, se puede comprender el interés en la reducción total o parcial de la actividad de dichos enzimas, ya sea en un organismo vivo o en una célula para regular la hidrólisis de galactósidos y obtener así mejoras biológicas o terapéuticas. En los usos de galactosidasas como catalizadores industriales, la regulación de la actividad enzimática puede mejorar la eficiencia de los procesos y las propiedades o naturaleza de los productos resultantes del mismo. Finalmente, la reducción de actividad en el enzima es de interés en aplicaciones de los enzimas en biología, microbiología y otras ciencias de la vida como reactivos o catalizadores para lograr un mejor control de su actividad.

35 El desarrollo de inhibidores irreversibles selectivos de α -galactosidasas y β -galactosidasas puede resultar de gran utilidad para el control de la actividad de dichos enzimas, ya que son capaces de formar una unión química estable (normalmente un enlace covalente) con los aminoácidos que componen el enzima, de manera que el inhibidor queda unido de manera permanente al interaccionar con la proteína, que pierde de manera definitiva la capacidad de actuar como catalizador en la reacción enzimática y por tanto queda inactivada.

40 Se han descrito diversos inhibidores irreversibles de glicosidasas (B.P. Rempel, S.G. Withers *Glycobiology* **2008**, *8*, 570-586). Entre estos destacan los fluoroglicósidos, que se basan en explotar el mecanismo de reacción enzimático para conseguir la inactivación del enzima mediante el suministro de análogos fluorados del carbohidrato sustrato del enzima (Mosi, R. M.; Withers, S. G. *Methods Enzymol* **2002**, *354*, 64-84; Wicki, J.; Rose, D. R.; Withers, S. G. *Methods Enzymol* **2002**, *354*, 84-105). Sin embargo, el uso general de estos compuestos se restringe casi exclusivamente a β -glicosidasas, si bien se conoce alguna aplicación en la inhibición de algunas α -glicosidasas (McCarter, J. D.; Withers, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 241-242; Zhang, R.; McCarter, J. D.; Braun, C.; Yeung, W.; Brayer, G. D.; Withers, S. G. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3070-3077). Sin embargo, el desarrollo de fluorogalactósidos como inhibidores de galactosidasas es relativamente escaso (Gebler, J. C.; Aebersold, R.; Withers, S.G. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 11126-11130; Voadlo, D.J.; Bertozzi, C.R. *Angew. Chem. Int Ed.* **2004**, *43*, 5338-5342; Hart D.O., et al **2000**, *Biochemistry* *39*, 9826-9836, Kurogochi, M.; Nishimura S.I.; Lee Y.C., *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44704-44712) y se limita a β -galactosidasas.

55 Otra familia de inhibidores irreversibles de glicosidasas son los ciclohexano epóxidos, que mimetizan los carbohidratos sustratos de las enzimas y son capaces de formar un enlace con alguno de los residuos del centro activo del enzima. (Marco-Contelles, J.; Molina, M. T.; Anjum, S. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2857-2899.; Marco-Contelles, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1607-1618; Serrano, P.; Egido-Gabas, M.; Llebaria, A.; Delgado, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1971-1974). Estos compuestos suelen ser inhibidores complementarios de los fluoroglicósidos, ya que pueden actuar

tanto sobre α -glicosidasas como sobre β -glicosidasas. Sin embargo, la gran mayoría de compuestos conocidos se dirigen a glucosidasas. No se conocen compuestos potentes y selectivos en la familia de los epoxiciclohexanos con actividad sobre galactosidasas, siendo el único compuesto descrito como inhibidor de estas enzimas el conduritól C epóxido (Legler, G., Herrchen, M. *FEBS Lett.* **1981**, *135*, 139-144) que es un inhibidor dual de β -glucosidasas y β -galactosidasas.

Relacionadas estructuralmente con los epoxiciclohexanos, se han descrito que las ciclohexanoaziridinas tienen actividad inhibitoria irreversible sobre glicosidasas, si bien su uso es escaso y limitado a glucosidasas (Kapferer P., Birault V., Poisson J.F., Vasella A. *Helv Chim Acta* **2003**, *86*, 2210-2227; Tong M.K., Ganem B. *J Am Chem Soc* **1988**, *110*, 312-313; Caron G., Withers S.G. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, *163*, 495-499).

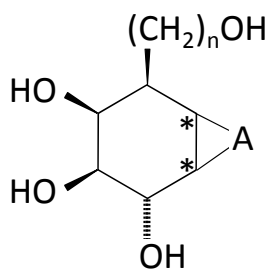
Sería por tanto deseable obtener nuevos compuestos inhibidores irreversibles específicos para α -galactosidasas o β -galactosidasas, que fueran potentes y selectivos frente a otras glicosidasas, y que mantuvieran su actividad en enzima aislado, células o incluso organismos vivos.

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a una familia de compuestos de fórmula general (I), mediante los cuales se consigue la inhibición de galactosidasas.

Con estos compuestos se consigue la inactivación de manera irreversible y selectiva de los enzimas β -galactosidasa y α -galactosidasa, de forma más eficaz que los compuestos descritos en el Estado de la Técnica, llegándose a obtener resultados muy prometedores a concentraciones muy bajas (nM) en ensayos celulares, lo cual indica una mayor actividad y selectividad de estos nuevos compuestos respecto a los descritos anteriormente.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I)



Fórmula general (I)

y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

donde:

- A es seleccionado dentro del grupo compuesto por: O, NR¹, NSOR¹, NSO₂R¹, NCONR¹R² y NCOOR¹, donde R¹ y R² se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo;
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2, y más preferiblemente n es igual a 1;
- el signo * representa un centro estereogénico de configuración (R) o (S), indistintamente;
- donde los grupos alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo de R¹ y R², están opcionalmente sustituidos por al menos un sustituyente seleccionado independientemente entre halógeno, OR³, OCF₃, SR³, NO₂, NR³R⁴, CONR³R⁴, COOR³, OCOR³, CN, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo, donde R³ y R⁴ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo.

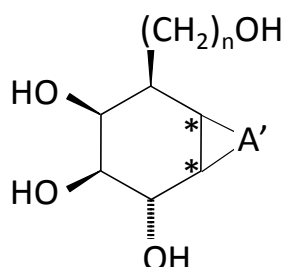
El término "alquilo(C₁-C₁₀)" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

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 sólo 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.

5 El término "arilo" se refiere en la presente invención a anillos aromáticos sencillos o múltiples, que tienen de entre 5 a 18 eslabones. Los grupos arilo son por ejemplo, pero sin limitarse a 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 alcoxycarbonilo.

10 El término "heterociclo" se refiere, en la presente invención, a un radical estable monocíclico o bicíclico conteniendo de 3 a 10 miembros que puede estar saturado o parcialmente insaturado (referido como "heterociclo no aromático" en el ámbito de esta memoria) o puede ser aromático (referido como "heteroarilo" en el ámbito de esta memoria), y que consiste en átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno o azufre. Preferiblemente tiene de 4 a 8 miembros con uno o más heteroátomos y más preferiblemente de 5 a 6 miembros con uno o más heteroátomos. Para el propósito de esta invención el heterociclo puede ser un sistema monocíclico o, bicíclico, que puede incluir anillos fusionados. Los átomos de nitrógeno, carbono y azufre del radical heterocíclico opcionalmente pueden estar oxidados. Ejemplos de heterociclos pueden ser, no limitativamente: morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo, pirrolidilo, azepinilo, indolilo, imidazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, furanilo, tetrahidrofuranilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, quinolilo y similares.

15 De manera preferida el compuesto ciclohexánico de fórmula general (I) es un compuesto de fórmula general (II):



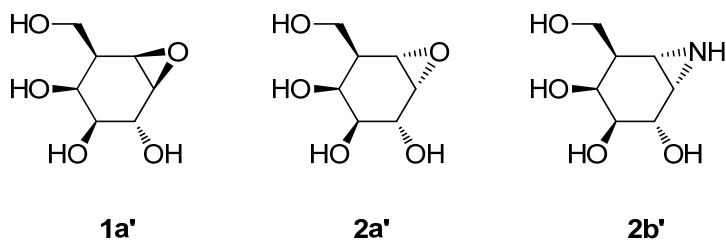
Fórmula general (II)

20 donde:

- A' es seleccionado entre O y NH,
- el signo * representa un centro estereogénico de configuración (R) o (S), indistintamente,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2, y más preferiblemente n es igual a 1;

y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización más preferida el compuesto ciclohexánico de fórmula general (II) presenta una de las siguientes fórmulas:



1a'

2a'

2b'

y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

30 El término "sales farmacéuticamente aceptables" significa aquellas sales que conservan la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres o de los ácidos libres y que no son molestas en sentido biológico ni en ningún otro.

35 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.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una cantidad terapéuticamente aceptable de un compuesto de fórmula general (I) o sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables. Es asimismo objeto de la presente invención, el uso de un compuesto de fórmula general (I) para la preparación de una composición farmacéutica.

5 Según otra realización preferida, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) o de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, para la inhibición de galactosidasas, seleccionadas preferiblemente entre α -galactosidasa y β -galactosidasa.

10 La inhibición de galactosidasas por medio de compuestos de fórmula general (I) puede modular la glicosilación de proteínas y lípidos, así como controlar procesos biológicos y enfermedades asociadas a dicha glicosilación.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I), o una composición farmacéutica que comprenda al menos un compuesto de fórmula general (I), para su uso en medicina. En una realización preferida el compuesto de fórmula general (I), o la composición farmacéutica se utiliza en el tratamiento o prevención de una enfermedad. De manera preferida, la enfermedad puede ser seleccionada entre cáncer, malaria, artritis reumatoide, infección vírica e infección bacteriana, como por ejemplo shock séptico. Más preferiblemente la enfermedad es seleccionada entre cáncer, artritis reumatoide e infección vírica.

20 Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o de la composición farmacéutica para su uso en la elaboración de un medicamento. De manera preferida, el medicamento está dirigido para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad relacionada con cáncer, malaria, artritis reumatoide o infección vírica o bacteriana como por ejemplo shock séptico. Más preferiblemente, la enfermedad es seleccionada entre cáncer, artritis reumatoide e infección vírica.

25 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) como una herramienta biotecnológica para modificar la composición de los polisacáridos de moléculas biológicas glicosiladas conteniendo galactosa, tales como glicolípidos o glicoproteínas. En atención al importante papel que desempeña la glicosilación de lípidos y proteínas en su distribución, reconocimiento y funciones celulares, el uso de estos compuestos puede modificar las propiedades de dichas moléculas biológicas. Esto incluye su uso para glicoingeniería de proteínas, como por ejemplo en la mejora de propiedades de proteínas terapéuticas, incluyendo anticuerpos e inmunoglobulinas.

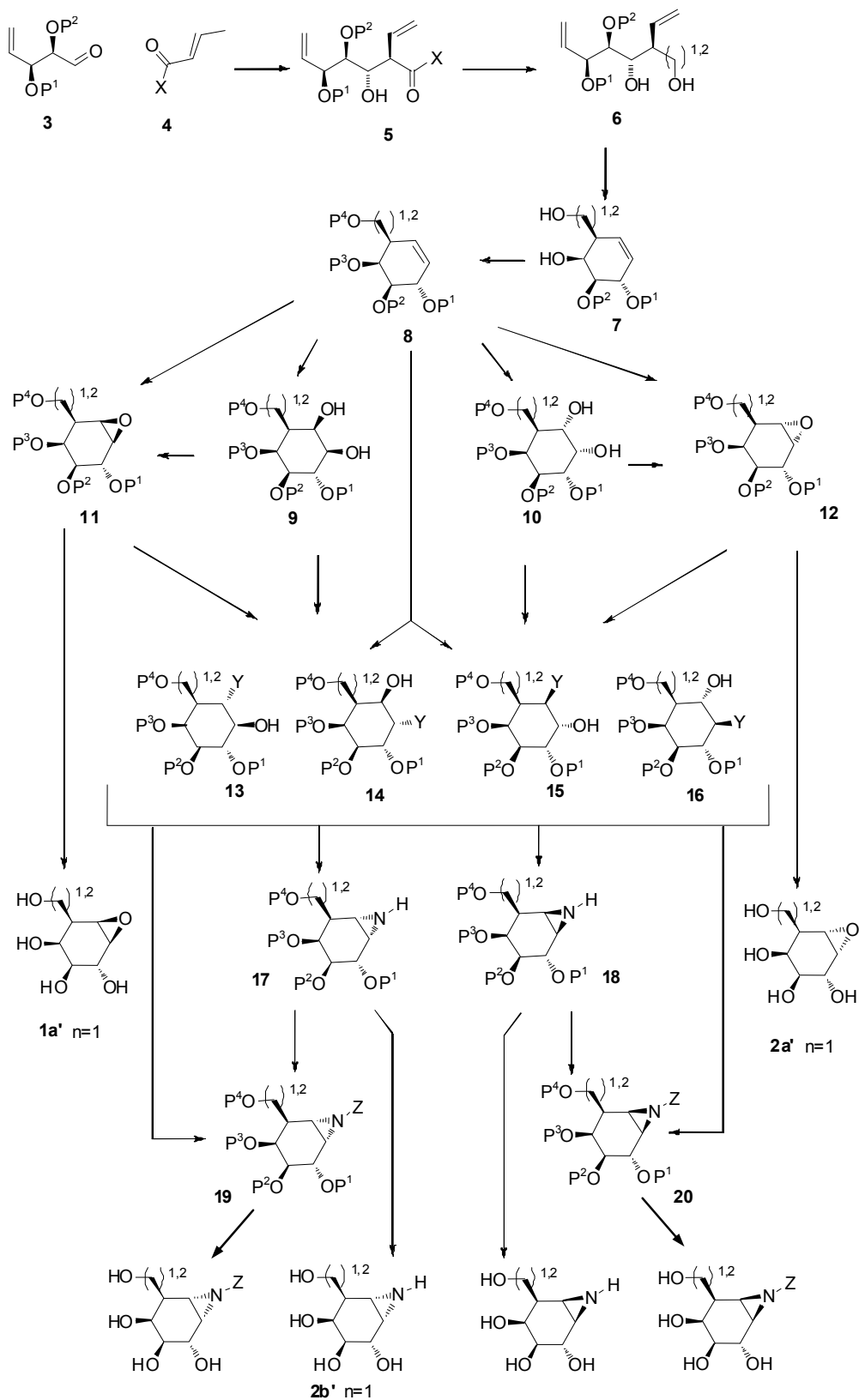
30 Los compuestos de la presente invención pueden ser utilizados para reducir el grado de hidrólisis de los galactosácaridos por parte de galactosidasas, aumentando su estabilidad y modificando su composición. Finalmente, un compuesto que se une covalentemente al centro activo de una galactosidasa de manera selectiva puede utilizarse como marcador de galactosidasas y para la caracterización de la actividad enzimática por ejemplo en proteómica, y puede ser utilizado como sonda de proteínas con actividad galactosidasa en células, tejidos o en seres vivos.

35 Un séptimo aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) como reactivo en biología molecular. Uno de los sistemas de gen reportero más utilizados es el operón lac que se utiliza en la regulación de la expresión génica y que permite controlar y determinar la transcripción de genes en biotecnología y por tanto la producción de proteínas. Este operón lac contiene tres genes, uno de los cuales, el operón lacZ, codifica una proteína con actividad β -galactosidasa, esencial para su funcionamiento, y que puede ser inhibida por los compuestos de la presente invención, y que por tanto pueden ser usados en la modulación del operón lac y en consecuencia en la regulación y optimización de la transcripción en biología molecular y en diversas aplicaciones biotecnológicas.

40 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí usados tienen el mismo significado a los comúnmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, pasos o estereoisómeros de los compuestos involucrados. 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.

45 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 presentan en los esquemas siguientes. Los materiales de partida para los métodos preparativos están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos de la literatura.

50 De manera general, la síntesis de los compuestos de fórmula general (I) se puede llevar a término mediante alguna de las secuencias de reacciones que se describen en el siguiente esquema:



donde:

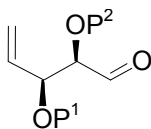
- P¹, P², P³ y P⁴ son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de una función alcohol, que a modo de ejemplo puede ser un éter (por ejemplo, bencilico, p-metoxibencilico, alílico, t-butílico, metoximetílico, etoximetílico, 2-trifenilmetílico, trimetilsililettoximetílico, 2-tetrahidropiranílico, benciloximetílico, 2-

metoxietoximetílico, metiltiomético, 2,2,2-tricloroetoximetílico entre otros), un éster carboxílico (tal como acetato, pivalato, benzoato, tricloroacetato, trifluoroacetato), un éster del ácido carbónico (tal como metilcarbonato, 9-(fluorenilmétil)carbonato, alilcarbonato, tricloroetilcarbonato, tert-butilcarbonato 2-trimetilsilicarbonato, fenilcarbonato, entre otros), un éter silícico (tal como trimetilsilílico, t-butildimetilsilílico, trietilsilílico, difenilmétilsilílico, t-butildifenilsilílico, triisopropilsilílico), un carbamato (por ejemplo N,N-dimetilaminocarbamato, N-bencil-N-metilaminocarbamato, N,N-dibencilcarbamato), etc;

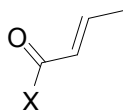
- X es un grupo auxiliar quiral activador y director de reacciones aldólicas en posición alfa a un grupo carbonilo al que se encuentra unido, que se puede introducir formando un éster con un alcohol quiral, tal como mentol, fenilmentol, borneol, metilbencílico, N,N-dimetilvalinol, isopropilidenglicerol, o un alcohol derivados de carbohidratos (isopropilidénfuranosos o piranosas), X también puede ser introducido mediante formación de una amida con un amina quiral (alfametilbencilamina, efedrina, O-methylprolinol, etc) o mediante formación de una imida con oxazolidinonas, tiazolidinonas, camforsultamas, oxazinanonas, etc.;
- Y es un grupo nitrogenado, como por ejemplo N₃, NH₂ y SO₂NH₂;
- Z es un sustituyente distinto de hidrógeno seleccionado dentro del grupo compuesto por: R¹, SO₂R¹, CONR¹R² y COOR¹, donde R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H, alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, heteroarilo y arilo.

O dicho de otro modo, el procedimiento de obtención de estos compuestos de fórmula general (I) comprende:

- a. llevar a cabo una reacción aldólica entre un aldehído de fórmula 3 con un derivado del ácido crotonico de fórmula 4,



Fórmula 3

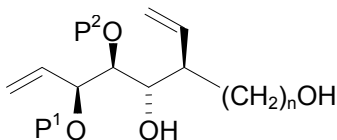


Fórmula 4

donde:

- P¹ y P² son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- X es un grupo auxiliar quiral activador y director.

- b. elongar y/o reducir un grupo carbonilo del producto obtenido en la etapa anterior, para obtener un derivado de fórmula 6,

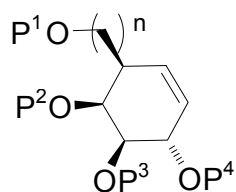


Fórmula 6

donde:

- P¹ y P² son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

- c. formar un producto intermedio de fórmula general 8,



Fórmula general 8

donde:

- P^1 , P^2 , P^3 y P^4 son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

por reacción de metátesis de olefinas intramolecular, opcionalmente combinado con protección de al menos un grupo OH libre;

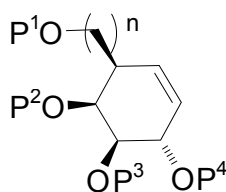
- d. obtener un derivado bicíclico de ciclohexano fusionado a un anillo cíclico de tres eslabones seleccionado entre un anillo de oxirano o un anillo de aziridina opcionalmente *N*-sustituido, por transformación de un doble enlace ciclohexénico del producto intermedio de fórmula 8, que conduce al producto de fórmula general (I) directamente si P^1 , P^2 , P^3 y P^4 son hidrógenos, o a un precursor O-protégido, si al menos uno de los grupos P^1 , P^2 , P^3 y P^4 es un grupo protector de funciones OH, que es posteriormente desprotegido por métodos habituales.

En una realización preferida, el aldehído **3**, que posee dos grupos hidroxilo convenientemente protegidos (OP), como por ejemplo el grupo bencilo, puede ser obtenido a partir de D-xilosa (Hansen, F. G.; Bundgaard, E.; Madsen, R. *J.Org.Chem.* **2005**, *70*, 10139-10142). Este aldehído se puede hacer reaccionar en una reacción aldólica con un derivado del ácido crotonico **4**, donde X representa un grupo auxiliar quiral según se definió en el esquema anterior, por ejemplo una oxazolidinona de Evans, en las condiciones de la reacción descritas en la literatura (Evans, D.A.; Sjogren, E. B.; Bartoli, J.; Dow, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4957-4960) para dar el aducto **5**. Por reducción y/o elongación del grupo carbonílico se generan los derivados **6**, que se tratan en una reacción de metátesis de olefinas, por ejemplo con el catalizador descrito por Grubbs y colaboradores (Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953-956) para dar **7**. A continuación, se realiza una reacción de protección de los grupos alcohol para dar los derivados O-P protegidos ciclohexénicos **8**. Un ejemplo de grupo protector puede ser el grupo bencilo.

Dichos compuestos se pueden transformar mediante epoxidación en los derivados **11** y **12**. De manera alternativa, mediante la dihidroxilación del enlace olefínico en **8** se pueden obtener tetra-O-bencil-*cis*-1,2-dioles diastereoméricos **9** y **10**. El diol **9** se convierte en el epóxido **11**, por ejemplo mediante una secuencia de dos pasos que consiste en la reacción con exceso de bromuro de 2-acetoxi-isobutirilo para producir una mezcla de bromoacetatos ciclohexánicos (Mattocks, A. R. *J. Chem. Soc.* **1964**, 1918-1930) que generalmente no se aíslan sino que se convierten directamente en el epóxido **11** por tratamiento básico, por ejemplo con K_2CO_3 en MeOH. De manera análoga el diol *cis* **10** se puede convertir en el epóxido **12**. Los epóxidos finales **1a** y **2a** se pueden obtener por desprotección, por ejemplo O-desbencilación mediante hidrogenación catalítica con catalizador de Pd/C a partir de los derivados **11** y **12**, respectivamente.

Para la síntesis de las aziridinas se pueden hacer reaccionar los epóxidos protegidos **11** con nucleófilos de nitrógeno (azida sódica, aminas, sulfonamidas, etc) lo que puede conducir a los derivados **13** y **14**. En las mismas condiciones, el epóxido **12** conduciría a los compuestos **15** y **16**. Los compuestos **13-16** pueden obtenerse directamente por aminohidroxilación del enlace olefínico en **8**. Los alcoholes intermedios **13-16** pueden ciclarse a las correspondientes aziridinas **17** y **18**, por ejemplo mediante la reacción con trifenilfosfina en THF seguida de un tratamiento acuoso posterior. Alternativamente, la formación de la aziridina puede también ser llevada a cabo por activación del grupo hidroxilo libre en los intermedios **13-16**, por ejemplo mediante su conversión en mesilato, seguida por la posterior reacción intramolecular con el grupo nitrogenado Y, bien para dar **17-18** o directamente los derivados **19** ó **20** dependiendo de la naturaleza del grupo Y. Los compuestos **19** y **20** se pueden también obtener a partir de las aziridinas **17** ó **18** respectivamente, por reacción de funcionalización de la amina cíclica con el reactivo adecuado (por ejemplo cloruros de ácido o anhídridos para la *N*-acilación o sulfonación; haluros de alquilo para la *N*-alquilación, etc) para dar los compuestos *N*-sustituidos con los grupos Z **19** ó **20**. La desprotección de los grupos protectores P sobre estos conduce a las aziridinas polihidroxiladas finales.

Un último aspecto de la presente invención se refiere a un producto intermedio de fórmula general 8,



Fórmula general 8

donde:

- P¹, P², P³ y P⁴ son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables,

a partir del cual, por transformación del doble enlace ciclohexénico, ya sea por epoxidación y/o aziridinación, o bien por dihidroxilación y sus transformaciones posteriores, se pueden preparar los compuestos de fórmula general (I).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Inhibición de glicosidasas por el epóxido **2a'** a diferentes tiempos de preincubación a una concentración de 0.1 mM. ■, α -D-glucosidasa de levadura; ▲, α -D-glucosidasa de arroz; ◆, β -glucosidasa de almendra; ●, β -D-galactosidasa de hígado bovino; □, α -D-galactosidasa de café verde. Se representa la evolución en función del tiempo (t) del porcentaje de la actividad enzimática residual (Act. Enz. %) respecto a la actividad enzimática inicial a t=0.

Figura 2. Inhibición de β -Galactosidasa lisosomal por el epóxido **1a'** a concentración 10nM y diferentes tiempos de preincubación en homogenados de fibroblastos humanos. Se representa la evolución en función del tiempo (t) de las lecturas de fluorescencia en unidades arbitrarias (Fluoresc) que resulta de la cuantificación de la 4-metilumbeliferona formada por la hidrólisis enzimática de 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido.

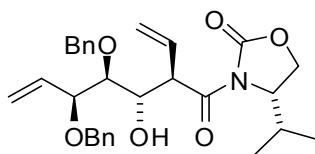
EJEMPLOS.

Los siguientes ejemplos sirven para una mejor ilustración de la invención, pero no deben ser considerados como limitantes de ella.

A. SÍNTESIS QUÍMICA

EJEMPLO 1. Síntesis de los compuestos **1a'**, **2a'** y **2b'**.

(S)-3-((2R,3S,4S,5S)-4,5-bis(benciloxi)-3-hidroxi-2-vinilhept-6-enoil)-4-isopropiloxazolidin-2-ona (**5'**).



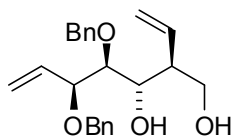
5'

En un matraz de tres bocas de 500 mL de capacidad se introdujeron 12.65 mL (12.65 mmol) de una disolución de dibutilboriltrifluorometanosulfonato (1M en CH₂Cl₂) y se enfrió a -78 °C. A continuación, se añadió una disolución de la oxazolidinona **4'** (2.5 g, 12.65 mmol) en 20 mL CH₂Cl₂ y 2.07 mL (14.5 mmol) de trietilamina. La mezcla de reacción obtenida se mantuvo a -78 °C durante 50 min y a 0 °C durante 15 min. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a -78 °C y se añadió poco a poco una disolución del aldehído **3'** (3.35 g, 11.4 mmol) en CH₂Cl₂ (20 mL). A continuación, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética 1h a -20 °C, 1h a -15 °C y finalmente 1h a -5 °C.

Posteriormente, se añadieron 25 mL de una disolución de tampón fosfato (pH 7.0) y una disolución de H₂O₂ en agua al 30 % (25 mL). La mezcla resultante se mantuvo en agitación magnética durante 45 min. Pasado este tiempo se añadieron 100 mL de una disolución saturada de NaHCO₃. La mezcla obtenida se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos y a continuación, se extrajo con CH₂Cl₂ (3X50mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄ se filtraron y se evaporaron a presión reducida, obteniéndose un aceite que se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice, eluyendo la misma con hexano inicialmente y a continuación con mezclas de hexano/acetato de etilo en orden creciente de polaridad. Con una mezcla de hexano/acetato de etilo 8/2 se obtuvieron 4.65 g (83%) de un aceite amarillo correspondiente al compuesto **5'**. [α]_D = -65 (CHCl₃, c, 1) IR (film, cm⁻¹): 3421, 3015, 1777,

1691, 1374, 1214, 1063, 749. ¹HRMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.32 (m, 10 H); 6.06 (ddd, *J* = 17, 11, *J'* = 7, 1H), 5.91 (ddd, *J* = 17, *J'* = 9, *J''* = 1, 1H), 5.41 (m, 3H); 5.30 (dd, *J* = 10, *J'* = 1, 1H); 5.00 (t, *J* = *J'* = 8, 1H); 4.70 (d, *J* = 11.5, 2H); 4.48 (m, 3H); 4.30 (dd, *J* = 7, *J'* = 4, 1H); 4.05 (m, 1H); 3.85 (dd, *J* = 9, *J'* = 3.5, 1H); 3.59 (dd, *J* = 8.5, *J'* = 4, 1H); 3.35 (d, *J* = 1.5, 1H); 3.27 (t, *J* = *J'* = 9, 1H), 2.23 (m, 1H), 0.80 (d, *J* = 6.5, 3H), 0.74 (d, *J* = 7, 3H). ¹³CRMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 172.4, 153.4, 137.9, 137.6, 134.3, 133.4, 130.0, 128.3-127.2 (9C), 120.4, 119.1, 81.6, 79.7, 72.9, 71.0, 70.5, 62.3, 57.8, 50.0, 27.8, 17.6, 14.3; HRMS. Calculada para C₂₉H₃₅NO₆ (M+H⁺): 494.2543. Obtenida: 494.2575.

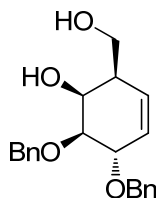
(2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-4,5-bis(benciloxi)-2-vinilhept-6-eno-1,3-diol (**6'**)



6'

En un matraz de 250 mL de capacidad se introdujeron 4 g (8.1 mmol) de la oxazolidinona **5'** disueltos en 60 mL de THF. La disolución obtenida se enfrió a 0 °C y a continuación se añadieron 3 mL de H₂O y 20 mL (20 mmol) de LiBH₄ (disolución 2M en Et₂O). La mezcla de reacción resultante se agitó 1h a 0 °C y posteriormente a temperatura ambiente durante 1h más. Pasado este tiempo, se añadieron 50 mL de NaOH (2N) y 50 mL de Et₂O. La fase orgánica separada se lavó con disoluciones de NaHCO₃ (sat) (20 mL) y NaCl (sat) (20 mL), se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice (Hexano/ Acetato de etilo 7/3), obteniéndose 2.8 g (7.7 mmol, 95%) de un sólido blanco cuyos datos espectroscópicos corresponden al producto esperado **6'**. Pf = 95-97 °C, [α]_D = +13 (CHCl₃, c, 1). IR (cm⁻¹): 3276, 2945, 1402, 1052, 695. ¹HRMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.32 (m, 10 H); 6.05 (m, 2H); 5.43 (m, 2H); 5.28 (dd, *J* = 10.5, *J'* = 2.5, 1H); 5.16 (dd, *J* = 17.5, *J'* = 2, 1H); 4.70 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.59 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.51 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.41 (d, *J* = 11.5, 1H); 4.23 (dd, *J* = 7, *J'* = 3.5, 1H); 4.07 (dd, *J* = 9, *J'* = 2.5, 1H); 3.80 (dd, *J* = 10.5, *J'* = 6, 1H); 3.75 (dd, *J* = 10.5, *J'* = 5.5, 1H); 3.54 (dd, *J* = 9, *J'* = 3.5, 1H); 2.60 (m, 1H). ¹³CRMN (CDCl₃, 100 MHz); δ 137.8, 137.3, 135.3, 133.9, 128.6, 128.4, 127.9 (8C), 119.5, 119.1, 79.6, 79.0, 73.1, 72.6, 71.0, 65.6, 47.3. HRMS. Calculada para C₂₃H₂₈O₄ (M+H⁺): 369.2066. Obtenida: 369.1989.

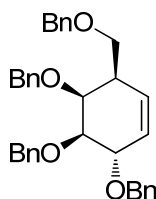
(1*S*,2*R*,5*S*,6*S*)-5,6-bis(benciloxi)-2-(hidroximetil)ciclohex-3-enol (**7'**)



7'

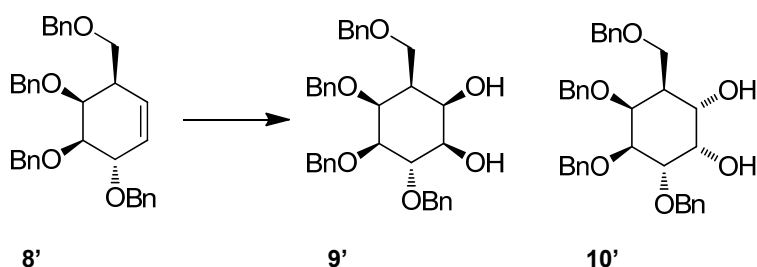
En un matraz de 500 mL de capacidad se introdujeron 2.5 g (6.78 mmol) del compuesto **6'** en 260 mL de CH₂Cl₂ y 300 mg (0.35 mmol) del catalizador de Grubbs de segunda generación. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a 40 °C durante 24h. Pasado este tiempo, se añadieron 0.5 mL de DMSO y la agitación se mantuvo a temperatura ambiente durante 6h. A continuación los disolventes se evaporaron a presión reducida. El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice (Hexano/Acetato de etilo) (1/1) obteniéndose 2.1 g (91%) de un sólido blanco cuyos datos espectroscópicos corresponden al compuesto **7'**. Pf = 101-103 °C; [α]_D = +136 (CHCl₃, c, 0.5). IR (cm⁻¹): 3421, 2914, 2055, 1370, 1045. ¹HRMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.33 (m, 10 H); 5.83 (dt, *J* = 10, *J'* = 2.5, 1H); 5.53 (dd, *J* = 10, *J'* = 1, 1H); 4.72 (m, 4H); 4.38 (br, 1H); 4.31 (m, 1H); 3.87 (dd, *J* = 10.5, *J'* = 3.5, 1H), 3.81 (dd, *J* = 11, *J'* = 6, 1H); 3.66 (dd, *J* = 7.5, *J'* = 2.5, 1H); 2.45 (m, 1H). ¹³CRMN (CDCl₃, 100 MHz); δ 138.5, 138.0, 128.5-126.8 (12C), 81.6, 76.5, 72.2 (2C), 70.2, 63.7, 41.8. HRMS. Calculada para C₂₁H₂₄O₄ (M+H⁺): 341.1753. Obtenida: 341.1817.

(3*S*,4*R*,5*S*,6*R*)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-benciloximetilciclohexeno (**8'**)



8'

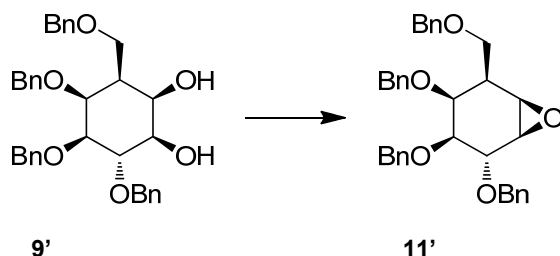
- En un matraz de 100 mL de capacidad se introdujeron 528 mg (13.2 mmol) de NaH (dispersión del 60% en aceite mineral) en 2 mL de DMF anhidro. La suspensión resultante se enfrió a 5 °C y a continuación se añadió poco a poco una disolución del diol de partida **7a'** (1.5 g, 4.4 mmol) en 20 mL de DMF anhidro. La mezcla obtenida se mantuvo en agitación magnética bajo argón durante 15 min. Pasado este tiempo se añadieron 0,65 mL (13.2 mmol) de bromuro de bencilo y posteriormente se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente. Transcurridas 6h de reacción, se adicionaron 10 ml H₂O y se realizaron 3 extracciones con 30 mL de Et₂O. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron a presión reducida. Se obtuvo un aceite que se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice (Hexano/ Acetato de etilo 4/1) obteniéndose 2.17 g, (95%) de un aceite incoloro cuyos datos espectroscópicos corresponden al producto esperado **8'**. [α]_D = +150 (CHCl₃, c, 0.5). IR (cm⁻¹): 3025, 2925, 1459, 1352, 1063. ¹HRMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.30 (m, 20H); 5.75 (dt, $J = 10$, $J' = 3$, 1H); 5.45 (d, $J = 10$, 1H); 4.92 (d, $J = 11.5$, 1H), 4.72-4.60 (m, 5H); 4.44 (m, 3H), 4.17 (t, $J = J' = 1.5$, 1H); 3.72 (dd, $J = 8$, $J' = 2$, 1H); 3.57 (t, $J = J' = 8.5$, 1H), 3.46 (dd, $J = 8.5$, $J' = 6.5$, 1H); 2.67 (m, 1H). ¹³CRMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 139.0, 138.8, 138.7, 138.1, 128.4-127.3 (21C), 126.6, 83.2, 77.6, 75.1, 74.0, 73.3, 72.3, 72.1, 70.2, 41.9. HRMS. Calculada para C₃₅H₃₆O₄ (M+H⁺): 521.2620. Obtenida: 521.2611.
- (1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*S*,6*S*)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)ciclohexan-1,2-diol (**9'**) y (1*S*,2*S*,3*S*,4*S*,5*S*,6*S*)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)ciclohexan-1,2-diol (**10'**)



- En matraz de 250 mL de capacidad se prepara una disolución de **8'** (2 g, 3.84 mmol) y NMO (óxido de *N*-metilmorfolina) (900 mg, 7.68 mmol) en 50 mL de acetona/agua (6/1). A continuación se añadió una cantidad catalítica (5mL) de OsO₄ (disolución en *t*-butanol). Transcurridas 22 horas de reacción a temperatura ambiente se adicionaron 5 g (39.5 mmol) de Na₂SO₃ y la agitación magnética se mantuvo durante 30 min adicionales. Pasados los cuales, la mezcla resultante se sometió a una extracción AcOEt/H₂O (100 mL / 50 mL). La fase orgánica se separó, se secó sobre sulfato sódico y se secó a presión reducida. Se obtuvo un aceite que se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice (hexano/EtOAc 6:4) obteniéndose una mezcla (4:1) de **9'** y **10'** (1.9 g, 90 %) y 300 mg de un aceite transparente cuyos datos espectroscópicos corresponden al compuesto **9'**. [α]_D = +6 (CHCl₃, 1). IR (cm⁻¹): 3426, 2932, 1272, 1085, 751. ¹HRMN (CDCl₃, 500 MHz); δ 7.37 (m, 20H), 5.02-4.44 (m, 8H); 4.29 (br d, $J = 1$, 1H); 3.98 (t, $J = J' = 10$, 1H); 3.94 (br d, $J = 7$, 1H); 3.80 (t, $J = J' = 9.5$, 1H), 3.86 (dd, $J = 9$, $J' = 5$, 1H), 3.85 (br d, $J = 10$, 1H, OH), 3.53 (dd, $J = 9.5$, $J' = 3.5$, 1H); 3.47 (dd, $J = 9.5$, $J' = 2.5$, 1H); 2.79 (br, 1H, OH), 1.81 (m, 1H), 1.64 (br, 1H, OH). ¹³CRMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 138.6, 138.2, 137.7, 137.6, 128.3-127.3 (20C), 83.6, 80.5, 77.2, 75.6, 75.5, 75.3, 73.2, 72.9, 71.8, 67.8, 40.5. HRMS. Calculada para C₃₅H₃₈O₆ (M+H⁺): 555.2675. Obtenida: 555.2681.

(1*R*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-2,3,4-tris(benciloxi)-5-(benciloximetil)-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptano (**11'**).

1- A partir del diol **9'** puro

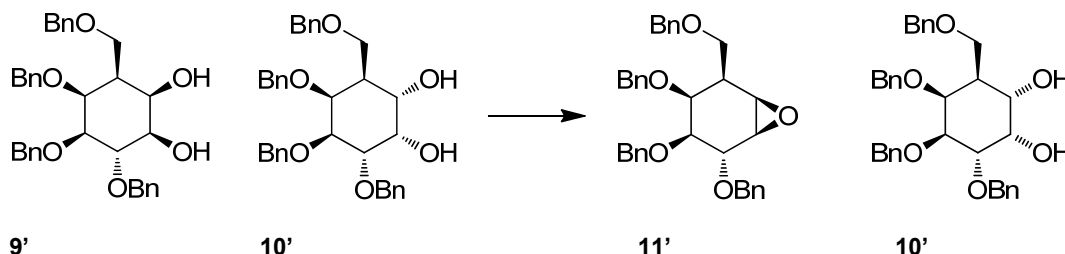


- En un matraz de 50 mL de capacidad, se introdujeron 100 mg (0.18 mmol, 1 equiv) de del compuesto **9'** disuelto en 5 mL de CH₃CN. Se obtuvo una disolución transparente que se enfria a 0 °C mediante un baño externo de hielo. A continuación se añadieron 26.7 μ L (0.18 mmol, 1 equiv.) del bromuro α -acetoxi-isobutirilo. Posteriormente se quita el baño de hielo y la mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación magnética durante 2h. Pasado este tiempo, se evaporaron los disolventes a presión reducida obteniéndose un aceite marrón que se utiliza en la siguiente reacción sin previa purificación.

El crudo de reacción obtenido anteriormente se disuelve en 10 mL de MeOH y a continuación se añadieron 248 mg (1.8 mmol, 10 equiv.) de K₂CO₃. La suspensión resultante se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 6 h. Pasado este tiempo, se evaporó a presión reducida el metanol presente en la mezcla de reacción,

obteniéndose un aceite sobre el que se añadieron 30 mL de agua destilada. La mezcla resultante se extrae con CH₂Cl₂ (3X20 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporó el disolvente a presión reducida. Finalmente el crudo de reacción obtenido se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice. Se utilizó como eluyente una mezcla de hexano/EtOAc (9:1) se obtuvieron 83 mg, de un aceite transparente cuyo datos espectroscópicos corresponden al del epóxido **11'**.

2- A partir de la Mezcla de los dioles **9'/10'**.

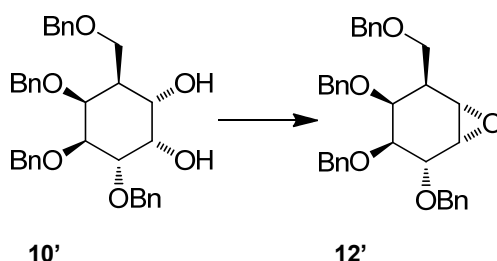


En un matraz de 500 mL de capacidad, se introdujeron 3 g (5.4 mmol, 1 equiv) de la mezcla 4/1 de los dioles **9'/10'** disueltos en 150 mL de CH₃CN. Se obtuvo una disolución transparente que se enfría a 0 °C mediante un baño externo de hielo. A continuación se añadieron 0.731 mL (4.86 mmol, 0.9 equiv.) del bromuro α -acetoxiisobutirilo. Posteriormente se quitó el baño de hielo y la mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación magnética durante 2h. Pasado este tiempo, se evaporaron los disolventes a presión reducida obteniéndose un aceite marrón que se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación.

El crudo de reacción obtenido anteriormente se disuelve en 100 mL de MeOH y a continuación se añadieron 7.45 g (54 mmol) de K₂CO₃. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 5 h. Pasado este tiempo, se evaporó a presión reducida la mezcla de reacción, obteniéndose un aceite sobre el que se añadieron 50 mL de agua destilada y se extrajo con CH₂Cl₂ (3X50 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporó el disolvente a presión reducida. Finalmente el crudo de reacción obtenido se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice. Se utilizó como eluyente una mezcla de hexano/EtOAc (9:1) se obtuvieron 2.3 g (80%) de un aceite transparente cuyo datos espectroscópicos corresponden al epóxido **11'**. $[\alpha]_D^{+20}$ (CHCl₃, 1): IR (cm⁻¹): 2843, 2050, 1321, 987..¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.35 (m, 20H), 4.91-4.48 (m, 8H); 4.17 (d, J = 8.5, 1H); 3.97 (m, 1H); 3.75 (dd, J = 9, J' = 7, 1H); 3.67 (t, J = J' = 8, 1H); 3.49 (dd, J = 9, J' = 3, 1H); 3.27 (d, J = J' = 3.5, 1H); .3.14 (br s, 1H); 2.34 (m, 1H). ¹³CRMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 138.8, 138.4, 137.9(2C), 128.3-127.1 (20 C), 82.4, 76.0, 74.2, 73.3, 73.0, 72.8, 72.5, 68.7, 54.3, 52.3, 40.1. HRMS. Calculada para C₃₅H₃₆O₅ (M+H⁺): 537.2641. Encontrada: 537.2639.

Eluyendo con una mezcla de hexano/EtOAc (6:4) se obtuvieron 389 mg (13%) de un aceite transparente cuyos datos espectroscópicos corresponden al del compuesto **10'** sin reaccionar. $[\alpha]_D^{+20}$ (CHCl₃, 1); IR (cm⁻¹) 3431, 2929, 12682, 1070, 789; ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.36 (m, 20H), 4.95-4.44 (m, 8H), 4.16 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 4.08 (br s, 1H), 3.95 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.86 (dd, J = 9.6 Hz, 2.8 Hz, 1H), 3.80 (m, 2H), 3.64 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 2.99 (br ,1H, OH), 3.80 (br, 1H, OH), 2.21 (m, 1H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ 138.9, 138.7, 138.2,137.8, 128.2-127.2 (20C), 80.5, 78.0, 74.7, 74.6, 73.1, 72.8, 72.7, 70.6, 69.3, 68.8, 41.4; HRMS. Calculado para C₃₅H₃₆O₆ (M+H⁺): 555.2675. Obtenido: 555.2679.

(1R,2R,3S,4S,5R,6R)-2,3,4-tris(benciloxi)-5-(benciloximetil)-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptano (**12'**).



En un matraz de 100 mL de capacidad, se introdujeron 300 mg (0.54 mmol, 1 equiv) de del compuesto **10'** disuelto en 15 mL de CH₃CN. Se obtuvo una disolución transparente que se enfría a 0 °C mediante un baño externo de hielo. A continuación, se añadieron 80 μ L (0.54 mmol, 1 equiv.) del bromuro α -acetoxiisobutirilo. Posteriormente se quitó el baño de hielo y la mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación magnética durante 2h. Pasado este tiempo, se evaporaron los disolventes a presión reducida obteniéndose un aceite marrón que se utilizó en la siguiente reacción sin previa purificación.

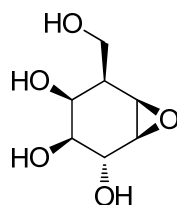
El crudo de reacción obtenido anteriormente se disolvió en 10 mL de MeOH y a continuación se añadieron 744 mg (5.4 mmol, 10 equiv.) de K₂CO₃. La suspensión resultante se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 6 h. Pasado este tiempo, se evaporó a presión reducida el metanol presente en la mezcla de reacción, obteniéndose un aceite sobre el que se añadieron 50 mL de agua destilada. La mezcla resultante se extrae con CH₂Cl₂ (3X30 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporó el disolvente a presión reducida. Finalmente el crudo de reacción obtenido se purificó por cromatografía de columna sobre gel de sílice.

Cuando se utiliza como eluyente una mezcla de hexano/EtOAc (9:1) se obtuvieron 234 mg (81%) de un aceite transparente cuyos datos espectroscópicos corresponden al del epóxido **12'**. [α]_D = +26 (CHCl₃, 1). IR (film, cm⁻¹): 2839, 2038, 1367, 959. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.34 (m, 20H), 4.91-4.49 (m, 8H); 4.27 (dd, *J* = 8.4, 2.4 1H); 3.93 (t, *J* = 1.6, 1H); 3.63 (dd, *J* = 8.4, 0.8, 1H); 3.60 (d, *J* = 8, 2H); 3.39 (dd, *J* = 3.6, 2.4, 1H); 2.97 (dd, *J* = 4, 1.2, 1H); 2.31 (dt, *J* = 7.6, 3.2, 1H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 138.6, 138.5 (2C), 137.8, 128.3-127.4 (20 C), 81.0, 76.7, 75.6, 73.1, 73.2, 73.0, 72.7, 68.5, 55.1, 54.3, 40.8. HRMS. Calculada para C₃₅H₃₆O₅ (M+H⁺): 537.2641. Obtenida: 537.2643.

Procedimiento general para la obtención de los epóxidos **1a'** y **2a'**

En un sistema de hidrogenación, se introdujeron 8 mg de Pd/C al 5 % y una disolución del correspondiente epóxido de partida *O*-bencilado **11'** ó **12'** (200 mg, 0,37 mmol) en 18 mL de MeOH. La suspensión resultante se sometió a agitación magnética y a presión de hidrógeno (1 atm) a temperatura ambiente durante 48h. Pasado este tiempo se filtró el catalizador presente en la reacción sobre Celite y el filtrado se evaporó a presión reducida.

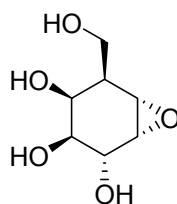
(1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-(hidroximetil)-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol (**1a'**):



1a'

Aceite (45mg, 77%) IR (cm⁻¹): 3456, 2912, 1213, 1056. ¹H-RMN (MeOD, 500 MHz): δ 3.91 (d, *J* = 8.5, 1H); 3.83 (m, 3H); 3.30 (m, 2H); 3.15 (d, *J* = 3.5, 1H); 2.18 (m, 1H). ¹³CRMN (MeOD, 100 MHz): δ 77.5, 71.5, 70.7, 62.6, 58.6, 56.2, 43.6. HRMS. Calculada para C₇H₁₂O₅ (M+Na⁺): 199.0561. Obtenida: 199.0561.

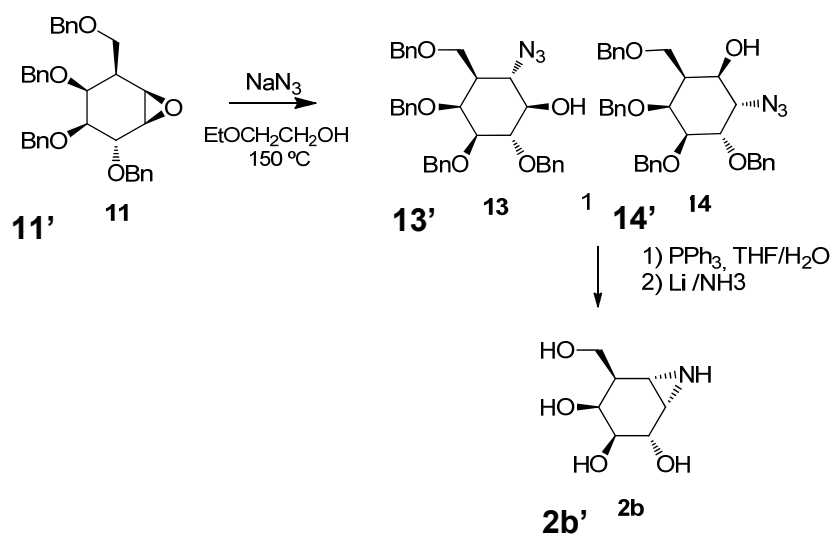
(1*R*, 2*R*, 3*S*, 4*S*, 5*R*, 6*S*)-5-hidroximetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol (**2a'**).



2a'

Sólido blanco (61 mg, 95 %): Pf = 125-127, [α]_D = +125 (MeOH, 1), IR (cm⁻¹): 3444, 2927, 1241, 914. ¹H-RMN (MeOD, 400 MHz): δ 4.08 (dd, *J* = 8.8, 2.4, 1H); 3.83 (m, 1H); 3.75 (m, 2H); 3.39 (dd, *J* = 8.4, 1.6, 1H); 3.30 (m, 1H), 3.08 (dd, *J* = 4, 1.8, 1H), 2.02 (dt, *J* = 7.6, 3.6, 1H). ¹³C-RMN (MeOD, 100 MHz): δ 73.7, 72.7, 70.8, 62.2, 58.1, 55.4, 44.3. HRMS. Calculada para C₇H₁₂O₅ (M+Na⁺): 199.0561. Obtenida: 199.0562.

(1*S*,2*R*,3*S*,4*S*,5*R*,6*R*)-5-(hidroximetil)-7-aza-biciclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol (**2b'**)



A una disolución de 26 mg de epóxido **11'** en 1.5 mL de 2-etoxietanol se añadieron 10 mg de azida sódica y se calentó a 150°C durante 6 horas. Se enfrió a temperatura ambiente y se evaporó el disolvente. Al residuo resultante se añadió diclorometano (10 mL), se filtró y se evaporaron los volátiles para dar un residuo como mezcla de azidoalcoholes **13'** y **14'** en proporción 1:1. Dicha mezcla se pudo purificar y separar por cromatografía en columna eluyendo con hexano/AcOEt (4:1)

13': Aceite incoloro. IR (film, cm^{-1}) 3347, 3026, 2995, 2134, 1483, 997; ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.35 (m, 18 H), 7.21 (m, 2H), 4.98 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.80 (m, 4H), 4.49 (m, 3H), 4.30 (m, 2H), 4.12 (br s, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.80 (m, 2H), 3.70 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.58 (m, 1H), 2.05 (m, 1H); HRMS. Calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 580.2811. Obtenida: 580.2795.

14': Aceite incoloro. IR (film, cm^{-1}) 3353, 3001, 2968, 2121, 1499, 1165, 988; ^1H -RMN (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.35 (m, 20 H), 5.03 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.01 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.80 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.71 (m, 2H), 4.50 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 4.44 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.25 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 3.91 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.63 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.55 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.48 (dd, $J = 11.5, 9.5$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 9.5, 2.5$ Hz, 1H), 1.69 (m, 1H); HRMS. Calculada para $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 580.2811. Obtenida: 580.2799.

Sin embargo, de manera preferida, la mezcla de los azidoepóxidos **13'** y **14'** se utilizaron en la siguiente reacción sin purificar. Para ello se disolvió el aceite obtenido en 4 mL THF a una temperatura entre -10 y 0°C . Se añadió trifenilfosfina (56 mg) y se dejó a esta temperatura durante 4 horas en agitación que se mantuvo durante 24 h más a temperatura ambiente. Se enfría a 0°C y se añaden 3 mL de agua. Se agita durante 2 horas a temperatura ambiente y se añade acetato de etilo (10 mL) y agua (5 mL). La fase orgánica se separa, se seca con K_2CO_3 anhidro y se evapora para dar un residuo que se filtra por sílica para separar la trifenilfosfina y su óxido, eluyendo con un gradiente de disolventes (hexano 100% a hexano/AcOEt 65:35). Se obtiene por evaporación de las fracciones convenientes un aceite ligeramente amarillo que se disuelve en 20 mL de NH_3 líquido. Se añade sodio metal (140 mg) en pequeñas porciones, hasta color azul persistente, seguido NH_4Cl sólido hasta decoloración de la mezcla de reacción. Se evapora el disolvente y el residuo se purifica por cromatografía en fase reversa (C18) eluyendo con agua/MeCN (100:0 a 90:10) para dar 6 mg (70 %) de la aziridina en forma de aceite incoloro. IR (cm^{-1}): 3444, 2937, 1244, 914. ^1H -RMN (MeOD, 400 MHz); δ 4.08-3.75 (m, 3H); 3.55 (m, 1H); 3.39 (dd, $J = 8.4, 2$ Hz, 1H); 3.0 (m, 1H), 2.6 (m, 1H), 2.2 (m, 1H). HRMS. Calculada para $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{NO}_4$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 176.09228. Obtenida: 176.09234

B. ENSAYOS BIOLÓGICOS

EJEMPLO 2. Procedimiento general para el ensayo de inhibición enzimática.

La potencia inhibidora de los compuestos se determinó midiendo la actividad hidrolítica residual de diferentes glicosidasas tras la incubación con los compuestos y utilizando como sustrato el correspondiente *p*-nitrofenil glicósido, en comparación con un control no tratado con los compuestos.

Se ensayaron las siguientes enzimas: α -D-glucosidasa de levadura, (Sigma, G5003), α -D-glucosidasa de arroz (Sigma, G9259), β -glucosidasa de almendra (Sigma, G0395), α -D-galactosidasa de café verde (Sigma, G8507) y β -D-galactosidasa de hígado bovino (Sigma, G1875). Cada ensayo se llevó a cabo con los siguientes sustratos y condiciones experimentales: α -D-glucosidasa de levadura, (1mM *p*-nitrofenil- α -D-glucósido, 100 mM tampón fosfato, pH = 7.2); α -D-glucosidasa de arroz (1mM *p*-nitrofenil- α -D-glucósido, 50 mM tampón acetato, pH = 5.0); β -glucosidasa de almendra (1mM *p*-nitrofenil- β -D-glucósido, 100 mM tampón acetato, pH = 5.0); α -D-galactosidasa de café verde

(2.7mM α - D-galactosidasa de café verde *p*-nitrofenil- α - D-galactósido, 100 mM tampón fosfato, pH = 6.8); β - D-galactosidasa de hígado bovino (1mM *p*-nitrofenil β - D-galactósido, 100 mM tampón fosfato, 0.1 mM MgCl₂, pH = 7.2). Cada una de las enzimas se preincubó con el epóxido (**1a'** o bien **2a'**) durante 5 min. La mezcla fue posteriormente incubada con el sustrato durante 3 min (α -D-glucosidasa de levadura, β -D-glucosidasa de almendra), 5 min (β -D-galactosidasa de hígado bovino), 10 min (α -D-glucosidasa de arroz) o 13 min (α -D-galactosidasa de café verde) y la reacción enzimática se paró mediante la adición de 50 μ L de TRIS 1 M o 180 μ L de Na₂CO₃ 1 M (α -D-galactosidasas). La absorbancia de la mezcla resultante se determinó mediante lectura a 405 nm en un espectrofotómetro (Figura 1)

EJEMPLO 3. Actividad en enzimas lisosomales

Se utilizaron fibroblastos humanos obtenidos de Eucellbank que se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ en medio DMEM suplementado con un 10% de suero fetal bovino.

a. Ensayos Fluorogénicos en células lisadas

Para los ensayos de actividad enzimática intracelular, se recogieron las células por tripsinización, se lavaron con tampón fosfato (PBS) y el residuo se sometió a sonicación. La actividad glicosidasa se detuvo por adición de tampón glicina (pH 10.6) 100 mM y se determinó la 4-metilumbeliferona formada en un lector SpectraMax Gemini (365 nm de excitación y 460 nm de emisión, Molecular Devices) en placas de 96-pocillos.

La actividad lisosomal α -glucosidasa se determinó con 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido 5 mM en tampón citrato 50mM (pH 4.0). El homogenado celular se incubó a 37 °C con o sin inhibidor (100 μ M en etanol) durante 15 min. Tras la adición del sustrato, se incubó a 37 °C durante 60 min.

La actividad lisosomal glucocerebrosidasa (β -glucosidasa) se determinó con 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido 5 mM en tampón McIlvaine (100 mM citrato sódico y 200 mM fosfato sódico, pH 5.2) con 0.1% Triton X-100 y 0.2% taurocolato sódico. El homogenado celular se incubó a 37 °C con o sin inhibidor (100 μ M en etanol) durante 15 min. Tras la adición del sustrato, se incubó a 37 °C durante 60 min.

La actividad lisosomal α -galactosidasa se determinó con 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido 1 mM en tampón acetato 100mM (pH 4.5). El homogenado celular se incubó a 37 °C con o sin inhibidor (100 μ M en etanol) y 1mM of N-acetil-galactosamina durante 15 min. Tras la adición del sustrato, se incubó a 37 °C durante 60 min.

La actividad lisosomal β -galactosidasa se determina con 4- metilumbeliferil - β -D-galactopiranosido 1mM en tampón citrato 100mM (pH 4.4). El homogenado celular se incubó a 37 °C con o sin inhibidor (100 μ M en etanol) durante 15 min. Tras la adición del sustrato, se incubó a 37 °C durante 60 min.

Tabla 1. Inhibición de galactosidasas lisosómicas en presencia de inhibidores (100 μ M) en homogenados de fibroblastos humanos. Los datos corresponden al porcentaje de actividad residual en un experimento con tres réplicas.

Compuesto	α -galactosidasa A	β -galactosidasa
1a'	1 %	99.9%
2a'	65 %	35 %

b. Ensayo de inactivación

La actividad lisosomal α -galactosidasa se determinó en tampón acetato 100mM (pH 4.5). El homogenado celular se incubó a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor y N-acetil-galactosamina 1mM. Se fueron retirando alícuotas de 22 μ L a intervalos de tiempo apropiados y se ensayaron para determinar la actividad residual del enzima por dilución en 18 μ L de tampón acetato y 60 μ L de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (1mM en tampón acetato, pH 4.5). Tras la adición del sustrato, se incubó a 37 °C durante 60 min. La actividad glicosidasa se detuvo por adición de 150 microL de tampón glicina (pH 10.6) 100 mM y se determinó la 4-metilumbeliferona formada en un lector SpectraMax Gemini (365 nm de excitación y 460 nm de emisión, Molecular Devices).

La actividad lisosomal β -galactosidasa se determinó en tampón citrato 100mM (pH 4.4). El homogenado celular se incubó a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de inhibidor. Se fueron retirando alícuotas de 21 μ L a intervalos de tiempo apropiados y se ensayaron para determinar la actividad residual del enzima por dilución en 19 μ L de tampón acetato y 60 μ L de 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (1mM en tampón citrato, pH 4.4). Tras la adición del sustrato, se incubó a 37 °C durante 60 min. La actividad glicosidasa se detuvo por adición de 150 μ L de tampón glicina (pH 10.6) 100 mM y se determinó la 4-metilumbeliferona formada en un lector SpectraMax Gemini (365 nm de excitación y 460 nm de emisión, Molecular Devices) (Figura 2).

Mediante estos ensayos se caracterizó la inhibición de las galactosidasas lisosomales por los epóxidos **1a'** y **2a'** determinándose las constantes K_i, que es la constante de inhibición que indica la afinidad del inhibidor por el enzima, y k_i es la constante de velocidad de la desactivación y que da cuenta de la rapidez de la reacción de unión

covalente del inhibidor al centro activo El cociente entre ambos parámetros (k_i/K_i) permite estimar la eficiencia que presenta un inhibidor irreversible. Cuanto mayor el cociente, más efectivo es el inhibidor.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la inactivación de α -galactosidasa y β -galactosidasa lisosomales por los epóxidos **1a'** y **2a'** en homogenados de fibroblastos humanos (N.D. no determinada).

compuesto	α -galactosidasa A	β -galactosidasa
1a'	N.D.	k_i 0.0325min ⁻¹ K _i 1.40e-5mM k_i/K_i 2326mM ⁻¹ min ⁻¹
2a'	k_i 2,52min ⁻¹ K _i 11,13mM k_i/K_i 0,227mM ⁻¹ min ⁻¹	k_i 0,05min ⁻¹ K _i 0,12mM k_i/K_i 0,408mM ⁻¹ min ⁻¹

5 c. Ensayos fluorogénicos en células intactas

Las células se distribuyeron en placas de 24 pocillos con medio de cultivo. A las 24 horas, el medio se reemplazó con medio fresco que contenía los inhibidores potenciales disueltos en etanol y se mantuvo durante 72 horas. El contenido total en etanol del medio se calculó de manera que no superara el 1% v:v. En estas condiciones, no tuvo efecto alguno sobre la viabilidad celular ni sobre la actividad de las glicosidasas de acuerdo con experimentos control. La actividad enzimática se ensayó tras retirar el medio de cultivo suplementado con los inhibidores y lavar las monocapas con tampón fosfato. Se añadieron 80 μ L de tampón acetato a pH 4.0 a cada pocillo. La reacción se inició por adición de 100 μ L de 4-metilumbeliferil- α -D-glucósido (5 mM en tampón acetato, pH 4.0), 4-metilumbeliferil- β -D-glucopiranosido (5mM en tampón acetato, pH 4.0), 4- metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (1mM en tampón acetato, pH 4.0) ó 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido (1mM en tampón acetato, pH 4.0) a cada pocillo, y se incubó a 37°C durante 2 h. La reacción se detuvo lisando las células con 1.8 ml de tampón glicina 200 mM (pH 10.6). La 4-metilumbeliferona formada en un lector SpectraMax Gemini (365 nm of excitación y 460 nm de emisión, Molecular Devices). La fluorescencia de las células control no tratadas con inhibidor se compararon con la obtenida con las células tratadas.

20 Se estudiaron otras glicosidasas lisosomales en fibroblastos intactos para determinar la selectividad de los epóxidos (tabla 3). Los epóxidos fueron incubados a concentración 10 μ M durante 72 h y se determinó la toxicidad inducida por los compuestos y su efecto en la actividad enzimática sobre las células respecto a controles no tratados

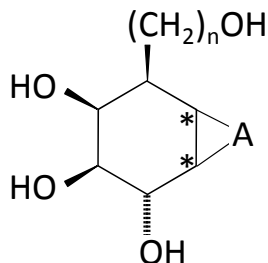
Tabla 3. Actividades de glicosidasas lisosomales en células intactas tras 72h de incubación con los epóxidos **1a'** y **2a'** a la concentración indicada entre paréntesis. Los datos corresponden al porcentaje de inhibición en un experimento con tres réplicas (N.T. No tóxico a las concentraciones indicadas).

Compuesto	toxicidad LD50	α -glucosidasa lisosomal	β -glucosidasa lisosomal	α -galactosidasa lisosomal	β -galactosidasa lisosomal
1a'	N.T. (300 μ M)	5% (10 μ M)	1% (10 μ M)	1% (10 μ M)	99.8% (10 μ M) 97% (1 μ M) 74% (0.1 μ M) 7% (0.01 μ M)
2a'	N.T. (26 μ M)	0% (10 μ M)	0% (10 μ M)	75.6% (10 μ M) 32% (1 μ M) 7% (0.1 μ M) 6% (0.01 μ M)	2% (10 μ M)

25

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I)



Fórmula general (I)

5 y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, donde:

- A es seleccionado dentro del grupo compuesto por: O, NR¹, NSOR¹, NSO₂R¹, NCONR¹R² y NCOOR¹, donde R¹ y R² se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo;

- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

10 - el signo * representa un centro estereogénico de configuración (R) o (S), indistintamente;

- donde los grupos alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo de R¹ y R², están opcionalmente sustituidos por al menos un sustituyente seleccionado independientemente entre halógeno, OR³, OCF₃, SR³, NO₂, NR³R⁴, CONR³R⁴, COOR³, OCOR³, CN, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo, donde R³ y R⁴ se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo(C₁-C₁₀), cicloalquilo, heterociclo no aromático, arilo y heteroarilo.

15

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde n es 1.

3. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde A es O.

4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde A es NH.

5. Compuesto según la reivindicación 1 caracterizado en que es seleccionado entre:

20 - (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-5-hidroximetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol,

- (1R,2R,3S,4S,5R,6S)-5-hidroximetil-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol,

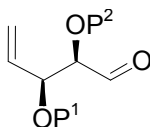
- (1S,2R,3S,4S,5R,6R)-5-hidroximetil-7-aza-bicyclo[4.1.0]heptan-2,3,4-triol

y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

25

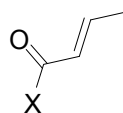
6. Procedimiento de obtención de un compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a. llevar a cabo una reacción aldólica entre un aldehído de fórmula 3 con un derivado del ácido crotonico de fórmula 4,



Fórmula 3

30



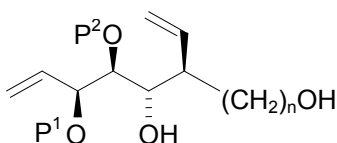
Fórmula 4

donde:

- P¹ y P² son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- X es un grupo auxiliar quiral activador y director.

5

- b. elongar y/o reducir un grupo carbonilo del producto obtenido en la etapa anterior, para obtener un derivado de fórmula 6,



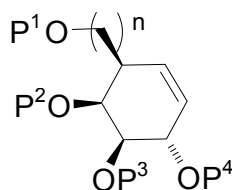
Fórmula 6

10

donde:

- P¹ y P² son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

- c. formar un producto intermedio de fórmula general 8,



Fórmula general 8

15

donde:

- P¹, P², P³ y P⁴ son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

20

por reacción de metátesis de olefinas intramolecular, opcionalmente combinado con protección de al menos un grupo OH libre;

- d. obtener un derivado bicíclico de ciclohexano fusionado a un anillo cíclico de tres eslabones seleccionado entre un anillo de oxirano o un anillo de aziridina opcionalmente N-sustituido, por transformación de un doble enlace ciclohexénico del producto intermedio de fórmula 8.

25

7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque posteriormente a la obtención del derivado bicíclico de la etapa d, comprende desproteger al menos una función OH protegida.

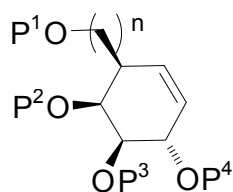
8. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el grupo auxiliar quiral X del compuesto de fórmula 4 es una oxazolidinona de Evans.

30

9. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la reacción de metátesis de olefinas de la etapa c comprende el uso de un catalizador de Grubbs.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque el producto intermedio de fórmula general 8 obtenido es un producto intermedio donde n es igual a 1, y P¹, P², P³ y P⁴ son grupos bencilo.

11. Producto intermedio de fórmula general 8



Fórmula general 8

donde:

- P¹, P², P³ y P⁴ son seleccionados independientemente entre hidrógeno y grupos protectores de funciones OH,
- n es un número entero seleccionado entre 1 y 2;

y cualquiera de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

12. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5 como inhibidor de galactosidasa.
13. Uso de un compuesto según la reivindicación 12 donde la galactosidasa está seleccionada entre α -galactosidasa y β -galactosidasa.
- 10 14. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5 para la preparación de una composición farmacéutica.
15. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende al menos un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5.
- 15 16. El compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 15, para uso en medicina.
17. El compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 15, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, malaria, artritis reumatoide, infección vírica e infección bacteriana.
- 20 18. El compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 15, para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, artritis reumatoide e infección vírica.
19. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 15, para la elaboración de un medicamento.
- 25 20. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 15, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, malaria, artritis reumatoide, infección vírica e infección bacteriana.
21. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica definida en la reivindicación 15, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre cáncer, artritis reumatoide e infección vírica.
- 30 22. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5 como una herramienta biotecnológica en glicoingeniería de proteínas o en proteómica.
23. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5 como una herramienta biotecnológica seleccionada entre marcador intracelular de galactosidasa y sonda de actividad galactosidasa.
- 35 24. Uso de un compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 a 5 como reactivo de biología molecular para el operon Lac.



- ②① N.º solicitud: 201131002
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.06.2011
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ATSUTA K et al. Total syntheses of glucosidase inhibitors, cyclophellitols. CARBOHYDRATE RESEARCH, 30.12.1991 VOL: 222 Págs: 189-203 ISSN 0008-6215 Doi: doi:10.1016/0008-6215(91)89017-A, página 189, compuestos 1 y 2.	1,2,3,5
X	ATSUMI S et al. Inhibition of glucocerebrosidase and induction of neural abnormality by cyclophellitol in mice. ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 01.09.1992 VOL: 297 No: 2 Págs: 362-367 ISSN 0003-9861 Doi: doi:10.1016/0003-9861(92)90685-P, figura 1.	1,2,3,5
X	W-F TAI V et al. Synthesis and glycosidase-inhibitory activity of cyclophellitol analogues. Tetrahedron Asymmetry, 01.07.1994 VOL: 5 No: 7 Págs: 1353-1362 ISSN 0957-4166, página 1353, figuras 1-4	1,2,3,5
X	KAPFERER P et al. Synthesis and evaluation as glycosidase inhibitors of carbasugar-derived spirodiaziridines, spirodiazirines, and spiroaziridines. Helvetica Chimica Acta 2003 VOL: 86 No: 6 Págs: 2210-2227 ISSN 0018-019X (print) Doi: doi:10.1002/hlca.200390178, página 2214, figura 25.	1,2,4,5
A	LEGLER G et al. Active site-directed inhibition of galactosidasas by conuritol Cepoxides (1,2-anhydro-EPI-and NEO-inositol. FEBS LETTERS, 30.11.1981 VOL: 135 No: 1 Págs: 139-144 ISSN 0014-5793 Doi: doi:10.1016/0014-5793(81)80962-3, todo el documento.	1-24
A	CARON G et al. Conuritol aziridine: A new mechanism-based glucosidase inactivator. Biochemical and Biophysical Research Communications, 30.08.1989 VOL: 163 No: 1 Págs: 495-499 ISSN 0006-291X Doi: doi:10.1016/0006-291X(89)92164-5, todo el documento.	1-24

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
26.04.2013

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D303/14 (2006.01)

C07D203/26 (2006.01)

A61K31/336 (2006.01)

A61K31/39 (2006.01)

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

C07D, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP, XPESP2, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.04.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6-24	SI
	Reivindicaciones 1-5	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 6-24	SI
	Reivindicaciones 1-5	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	TATSUTA K et al. Total syntheses of glucosidase inhibitors, cyclophellitols. CARBOHYDRATE RESEARCH, 30.12.1991 VOL: 222 Págs: 189-203 ISSN 0008-6215 Doi: doi:10.1016/0008-6215(91)89017-A, página 189, compuestos 1 y 2.	30.12.1991
D02	ATSUMI S et al. Inhibition of glucocerebrosidase and induction of neural abnormality by cyclophellitol in mice. ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, 01.09.1992 VOL: 297 No: 2 Págs: 362-367 ISSN 0003-9861 Doi: doi:10.1016/0003-9861(92)90685-P, figura 1.	01.09.1992
D03	W-F TAI V et al. Synthesis and glycosidase-inhibitory activity of cyclophellitol analogues. Tetrahedron Asymmetry, 01.07.1994 VOL: 5 No: 7 Págs: 1353-1362 ISSN 0957-4166, página 1353, figuras 1-4.	01.07.1994
D04	KAPFERER P et al. Synthesis and evaluation as glycosidase inhibitors of carbasugar-derived spirodiaziridines, spirodiazirines, and spiroaziridines. Helvetica Chimica Acta 2003 VOL: 86 No: 6 Págs: 2210-2227 ISSN 0018-019X (print) Doi: doi:10.1002/hlca.200390178, página 2214, figura 25.	30.11.2002
D05	LEGLER G et al. Active site-directed inhibition of galactosidasas by conduritol C epoxides (1,2-anhydro-EPI and NEO-inositol. FEBS LETTERS, 30.11.1981 VOL: 135 No: 1 Págs: 139-144 ISSN 0014-5793 Doi: doi:10.1016/0014-5793(81)80962-3, todo el documento.	30.11.1981
D06	CARON G et al. Conduritol aziridine: A new mechanism-based glucosidase inactivator. Biochemical and Biophysical Research Communications, 30.08.1989 VOL: 163 No: 1 Págs: 495-499 ISSN 0006-291X Doi: doi:10.1016/0006-291X(89)92164-5, todo el documento	30.08.1989

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 solicitud se refiere a una familia de compuesto de fórmula general I, estructuralmente relacionados con la molécula de galactosa, su procedimiento de obtención, composición farmacéutica y su uso como inhibidores de galactosidasas, específicamente de alfa y beta galactosidasas y por tanto en el tratamiento de enfermedades seleccionadas entre cáncer, malaria, artritis reumatoide, infección vírica e infección bacteriana.

Los documentos D1-D3 se refieren a un compuesto llamado cyclophellitol y sus análogos y a su uso como inhibidores de glucosidasas y glucocerebrosidasas. El documento D4 se refiere a compuestos derivados de espirodiaziridinas y espiroaziridinas como inhibidores de glucosidasas. Tanto el cyclophellitol que presenta el grupo epoxido como el compuesto 25 citado en el documento D4 que incluye un grupo de aziridina en su estructura entran dentro del ámbito al que se refieren las reivindicaciones 1-5 de la presente solicitud.

Por lo tanto, a la vista de dichos documentos las reivindicaciones 1-5 de la presente solicitud carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

Los documentos D5 y D6 se refieren a los compuestos llamados conduritol aziridina o conduritol epóxido que si que presentan actividad como inhibidores de galactosidasas, Sin embargo estos compuestos son estructuralmente diferentes a los compuestos reivindicados.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados, las reivindicaciones 6-24 presentan novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.