



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 170 030**

② Número de solicitud: 200003045

⑤ Int. Cl.⁷: C07C 233/23

C07C 215/26

A61K 31/133

A61P 3/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **19.12.2000**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2002**

Fecha de concesión: **02.10.2003**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.11.2003**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.11.2003

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano 117
28006 Madrid, ES**

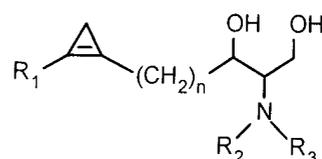
⑱ Inventor/es: **Fabriàs Domingo, Gemma;
Llebaría Soldevila, Amadeu y
Triola Guillem, Gemma**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Inhibidores de la dihidroceramida desaturasa.**

㉑ Resumen:

Inhibidores de la dihidroceramida desaturasa.
Derivados de ciclopropenilceramida como inhibidores de desaturasas caracterizados por la fórmula general I, en la que R₁ puede ser un grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo o cualquier heterociclo, n puede tener cualquier valor y estar ramificada o no y contener insaturaciones y R₂ y R₃ pueden tener el mismo o distinto valor, representan grupos arilo, heteroarilo, alquilo o acilo con una o varias insaturaciones en la cadena, que puede estar ramificada o no, y sustituida con grupos OH. Miembros de esta nueva clase de compuestos han mostrado una extraordinaria actividad como inhibidores de la dihidroceramida desaturasa y de la biosíntesis de ceramida y son de utilidad para el tratamiento de patologías asociadas a aumentos en los niveles de ceramida intracelular.



I

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Inhibidores de la dihidroceramida desaturasa.
Sector de la técnica

El presente invento es de interés para el sector farmacéutico. Se refiere a un método para disminuir los niveles intracelulares de ceramida consistente en la inhibición de la dihidroceramida desaturasa. Los compuestos que se describen pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades asociadas a un aumento de los niveles intracelulares de ceramida, tanto en humanos como en veterinaria.

Estado de la técnica

La ceramida es un importante efector lipídico (Hannun, *J. Biol. Chem.* 269:3125 (1994), Merrill, Jr., *Nutr. Rev.* 50:78 (1992), Kolesnick and Fuks, *J. Exp. Med.* 181:1949 (1995), Chao, *Mol. Cell. Neurosci.* 6:91 (1995), Liscovitch, *Trends Biochem. Sci.* 17:393 (1992)). Existen una serie de agentes extracelulares y de estrés, como son el factor de necrosis tumoral α , la interleuquina-1 β , la 1- α -25-dihidroxivitamina D₃, neurotrofinas, el ligando Fas, dexametasona, agentes quimioterápicos, radiaciones ionizantes etc. que provocan un aumento de los niveles endógenos de ceramida (Hannun, *J. Biol. Chem.* 269:3125 (1994), Hannun and Obeid, *Trends Biochem. Sci.* 20:73 (1995), Ballou et al. *J. Biol. Chem.* 267:20044 (1992), Quintans et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202:710 (1994), Dobrowsky et al, *Science* 265:1596 (1994), Yanaga and Watson, *FEBS Lett.* 314:297 (1992), Dresler and Kolesnick, *Science* 255:1715 (1992)). La ceramida intracelular interviene como mediador, en respuesta a estímulos externos, en importantes procesos tales como la diferenciación celular, apoptosis, supresión del crecimiento celular, etc. En este sentido, se ha demostrado que análogos exógenos de ceramida son capaces de provocar estos mismos efectos en distintos tipos de células (Hannun, *J. Biol. Chem.* 269:3125 (1994), Okazaki et al, *J. Biol. Chem.* 265:15823 (1990), Bielawska et al, *FEBS Lett.* 307:211 (1992), Obeid et al, *Science* 259:1769 (1993), Laulederkind et al, *J. Exp. Med.* 182:599 (1995), Goldkorn et al. *J. Biol. Chem.* 266:16092 (1991)).

La relevancia de la ceramida en fisiología celular se ha demostrado también mediante estudios en los que se examina la actividad específica de análogos de ceramida. Así, por ejemplo, se ha comprobado que la D-eritro-N-acetilesfingosina exhibe actividades semejantes a las de la ceramida natural (Bielawska et al, *J. Biol. Chem.* 268:26226 (1993), Fishbein et al, *J. Biol. Chem.* 268:9255 (1993)), mientras que su análogo saturado (D-eritro-N-acetildihidroesfingosina), sin el doble enlace en posiciones 4,5, carece de los efectos de la ceramida (Bielawska et al, *J. Biol. Chem.* 268:26226 (1993), Tepper et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:8443 (1995)), si bien ambos compuestos se incorporan y metabolizan de forma prácticamente idéntica (Bielawska et al, *J. Biol. Chem.* 268:26226 (1993)), lo cual sugiere que la falta de actividad del derivado saturado se debe a su incapacidad para interaccionar con dianas celulares relevantes. Efectivamente, la

D-eritro-N-acetilesfingosina, pero no la D-eritro-N-acetildihidroesfingosina, activa la proteína fosfatasa CAPP in vitro (Fishbein et al, *J. Biol. Chem.* 268:9255 (1993), Dobrowsky et al, *J. Biol. Chem.* 268:15523 (1993)).

Por otra parte, algunos de los efectos originados por la ceramida se han podido conseguir mediante manipulación del metabolismo de la misma. Por ejemplo, por adición de esfingomielinasa bacteriana, que cataliza la hidrólisis de esfingomielina a ceramida, se produce una acumulación de ceramida y se consiguen los mismos efectos que mediante adición de ceramidas permeables (Okazaki et al, *J. Biol. Chem.* 264:19076 (1989), Mathias et al, *Science* 259:519 (1993)). En otro ejemplo, el PDMP y compuestos relacionados, que inhiben la glicosilación de la ceramida (Abe et al, *J. Biochem.* (Tokyo), 111:191 (1992)) también conducen a un aumento de los niveles intracelulares de la misma, produciéndose una serie de efectos similares a los conseguidos con análogos de ceramida.

Todos estos, junto con otros precedentes, han llevado a establecer un papel crucial de la ceramida en la regulación de distintos aspectos de la biología celular.

La ceramida es la molécula central en la biosíntesis de esfingolípidos y glicoesfingolípidos. La ceramida se origina intracelularmente mediante dos rutas metabólicas: la anabólica y la catabólica. En esta última, la ceramida se genera mediante hidrólisis de glicoesfingolípidos catalizada por hidrolasas o hidrólisis de esfingomielina, siendo esta última conocida como el "ciclo de la esfingomielina". La hidrólisis de la esfingomielina está mediada por esfingomielinasas (ácida o neutra), las cuales se activan por una serie de ligandos naturales (TNF α , interleucinas etc.) y también por señales de stress celular, como radiaciones ionizantes, fármacos etc. Alternativamente, la hidrólisis de fosfato de 1-esfingosina mediante una fosfatasa, seguida de acilación del grupo amino, conduce también a ceramida.

La biosíntesis de *nov*o de la ceramida (ruta anabólica) se inicia por condensación de la serina con la palmitoil CoA para formar 3-cetodihidroesfingosina, que es después reducida a dihidroesfingosina. Mediante acilación de la dihidroesfingosina se genera la dihidroceramida, la cual, por acción de una desaturasa, es transformada en ceramida. Una vez biosintetizada, la ceramida sirve de precursora de lípidos más complejos, como son esfingomielina y glicoesfingolípidos (cerebrósidos, gangliósidos etc.) (Hannun, *J. Biol. Chem.* 269:3125 (1994), Wiegandt in *Glycolipids* (Wiegandt, ed) pp. 199-259, Elsevier, New York (1985), Merrill, Jr. and Jones, *Biochim. Biophys. Acta* 1044:1 (1990), Van Echten and Sandhoff *J. Biol. Chem.* 268:53412 (1993), Hakomori, *Annu. Rev. Biochem.* 50:733 (1981)). La transformación de ceramida en esfingomielina implica la transferencia de fosfato de colina desde una molécula de fosfatidilcolina al C1-OH de la ceramida, generándose diacilglicerol, que es otro importantísimo mediador de señales celulares. Finalmente, la ceramida puede transformarse, mediante hidrólisis de la función amida por acción de ceramidases, en esfingosina, (Han-

nun, *J. Biol. Chem.* 269:3125 (1994), Spence et al, *Biochem. Cell Biol.* 64:400 (19867), Slife et al, *J. Biol. Chem.* 264:10371 (1989)), la cual, a su vez, es fosforilada en C1-OH por una kina-
 5 sa, dando lugar al fosfato de 1-esfingosina, que es también un mediador lipídico de gran relevancia. Mediante la esfingosina -1-fosfato liasa, el fosfato de 1-esfingosina puede ser transformado en fosfato de etanolamina y 2-hexadecenal.

Existen varias enfermedades que derivan o están asociadas a un acúmulo de ceramida y consi-
 10 guiente inducción de apoptosis. Por lo tanto, el desarrollo de moléculas capaces de bloquear las enzimas productoras de la misma constituye una aproximación al descubrimiento de nuevos fármacos. En este contexto, existen varios inhibidores descritos, tanto en publicaciones científicas como en patentes, para varias de las enzimas implicadas en la biosíntesis y metabolización de ceramida, que se encuentran recopilados en una revisión reciente [kolter. T.; Sandhoff, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 1532-1568]. Sin embargo, no se ha descrito nunca un inhibidor de dihidroceramida desaturasa.

Descripción detalla de la invención

Hasta el momento, no existe ningún inhibidor de la dihidroceramida desaturasa. Puesto que la dihidroceramida desaturasa es la última enzima en la biosíntesis de novo de ceramida, cabe esperar que los compuestos del tipo I sean de utilidad para el tratamiento de patologías derivadas de una acumulación de ceramida intracelular por aumento de la biosíntesis *de novo* de la ceramida. Una de estas enfermedades es, por ejemplo, la diabetes asociada a obesidad, donde un acúmulo de ácidos grasos saturados conlleva a un aumento en la biosíntesis de novo de ceramida en las células beta pancreáticas, con consiguiente inducción de apoptosis y destrucción de dichas células beta. La patente mundial WO 9944598 describe la utilización de fumonisina, un inhibidor de la N-aciltransferasa de la dihidroesfingosina y, por tanto, inhibidor de la biosíntesis de novo de la ceramida, como método para la prevención de la destrucción de las células beta pancreáticas y tratamiento de la diabetes asociada a obesidad. Otras patologías derivadas de apoptosis exacerbada inducida por acúmulo de ceramida pueden también tratarse con los compuestos del tipo I. La presente invención resulta del conocimiento de que determinados ácidos grasos ciclopropénicos de estructura concreta inhiben de forma potente y selectiva las desaturasas de ácidos grasos (Salaun, J.; Baird, M. S. *Curr. Med. Chem.* 1995, 2, 511-452. Johnson, A.R.; Pearson. J. A.; Shenstone, F.S.; Fogerty, A. C. *Nature* 1967, 214, 1244-1245, Johnson, A. R., Fogerty, A C.; Pearson, J. A.; Shenstone, F. S.; Bersten, A.M. *Lipids* 1968, 4, 265-269, Fogerty, A.C., Johnson, A.R.; Pearson, J.A. *Lipids* 1972, 7, 335-338, Clark, J.R.; Kircher. H.W. *Lipids* 1972, 7, 769-772, Raju, P.K.; Reiser, R. *J. Biol. Chem.* 1967, 242, 379-384, Allen, E.; Johnson, A.R., Fogerty A.C.; Pearson, J.A.; Shenstone. F.S. *Lipids* 1967, 2, 419-423, Jeffcoat, R.; Pollard, M.R. *Lipids* 1977, 12, 480-485, Ory., R.L.; Altschul, A.M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1964, 17, 12-16, Pande, S.V.; Mead, J.F. *J.*

Biol. Chem. 1970, 245, 1856-1861, Arsequell, G.; Fabrias. G.; Camps, F. *Insect Biochem.* 1989, 19, 623-627, Gosalbo, L.; Fabrias, G.; Arsequell, G.; Camps, F. *Insect Biochem. and Molec. Biol.* 1992, 22, 687-690, Gosalbo. L.; Fabrias, G.; Camps, F. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1994, 26, 279-286, Fabrias, G.; Gosalbo. L. Quintana, J.; Camps, F. *J. Lipid Res.* 1996, 37, 1503-1509. Fabrias, G.; Barrot, M.; Camps, F. *Insect Biochem Molec Biol* 1995, 25, 655-660, Ando, T.; Ikemoto, K.; Ohno, R.; Yamamoto, M. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1998, 37 8-16, Ando, T., Ohno R.; Ikemoto, K.; Yamamoto, M. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3350-3354). Por lo tanto, por analogía, se esperaba que los compuestos del tipo I resultaran inhibidores de la dihidroceramida desaturasa.

Sin que ello presuponga una limitación en la aplicación de la presente invención que se define en las reivindicaciones especificadas más adelante, algunos aspectos de la presente invención se describen con detalle en los ejemplos que siguen.

Explicación de los dibujos

Figura 1. Esquema de síntesis de los compuestos del tipo I. Las etapas de la síntesis son:
 a/ HBr gas, bromuro de tetraetilamonio.
 b/ tribromometano, bromuro de cetiltribencilamonio, disolución acuosa de hidróxido sódico al 50%;
 c/ 1,n-Butil-litio en tetrahidrofurano, 2, aldehído de Garner en tetrahidrofurano; 3, cromatografía en columna;
 d/ 1, triflato de trimetilsililo, 2,6-lutidina en tetrahidrofurano, 2, cloruro de octanilo/piridina en metanol/cloroformo

Figura 2. Efecto del compuesto Ia, donde R₁ es C₁₃H₂₇ y R₂ es C₈H₁₇, sobre la dihidroceramida desaturasa. Los ensayos se efectúan por incubación con microsomas del inhibidor Ia, a las dosis indicadas, el sustrato enzimático (N -octanoildihidroesfingosina) y NADH. Las cantidades de producto desaturado formado se calculan en base a un estándar interno (N-hexanoilesfingosina).

Ejemplos

Ejemplo 1

Síntesis de la Ia

El compuesto Ia se sintetiza mediante condensación del (S)-(-) -4-formil-2,2-dimetil-3-oxazolidincarboxilato de terc-butilo (aldehído de Garner) con el 2-tridecil-1-ciclopropenil-litio, obtenido a partir del 1-pentadecino siguiendo la secuencia de reacciones que se describen en Al Dula-
 50 yami. J.R.; Baird, M.S.; Simpson, M.J., Nyman, S. *Tetrahedron* 1996, 52, 12509-12520. Se añaden 2 equivalentes de n-butillitio (disolución 1.5 M en hexano) a 1 equivalente de tribromociclopropano (i) disuelto en tetrahidrofurano anhidro manteniendo la temperatura por debajo de -50 °C y se deja subir lentamente la temperatura hasta 0°C. A la disolución resultante se añade 1 equivalente del aldehído de Garner, manteniendo la temperatura por debajo de -65°C. Tras dos horas de agitación se añade disolución saturada de cloruro amónico y se extrae con éter dietílico. La evaporación del éter conduce a una mezcla de alcoholes diastereoméricos *eritro*- y

treo-ii (7:3), que se separan por cromatografía cuidadosa en columna sobre gel de sílice eluyendo con una mezcla de acetato de etilo/hexano 10:1. Cada uno de los diastereómeros se desprotege con trifiato de trimetilsililo de acuerdo con el procedimiento descrito por **Sakaitani, M.**; **Ohfuné, Y.** *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 870-876, obteniéndose así los aminodiolos iii. Por acilación de la amina con cloruro de octanoilo se obtiene el producto final Ia (figura 2).

Datos espectroscópicos de Ia

IR (NaCl): 1550, 1644, 3010, 3287 cm^{-1} .

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): 8.37 (CH_2), 14.04 (CH_3), 14.10 (CH_3), 22.59 (CH_2), 22.67 (CH_2), 25.71 (CH_2), 25.84 (CH_2), 27.29 (CH_2), 29.99 (CH_2), 29.20 (CH_2), 29.34 (CH_2), 29.44 (CH_2), 29.57 (CH_2), 29.64 (CH_2), 31.66 (CH_2), 31.90 (CH_2), 36.7 (CH_2), 53.70 (CHNH), 63.21 (CH_2OH), 70.66 (CHOH), 107.53 (CH), 115.50 (CH), 173.98 (NHCOR).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 0.87 (t, 6H, $J=6.2$), 1.01 (s, 1H), 1.25 (s, 28H), 1.60 (m, 4H), 2.24 (t, 2H, $J=7.2$), 2.45 (dt, 2H, $J=7.6$, $J'=1.2$), 3.71 (dd, 1H, $J=11.4$, $J'=3.4$), 3.87 (dd, 1H, $J=11.2$, $J'=4$), 4.18 (m, 1H), 4.85 (s, 1H), 6.37 (d, 1H NH).

Ejemplo 2

Evaluación de la actividad inhibidora de la dihidroceramida desaturasa de I

La actividad inhibidora de los compuestos del tipo I que se reivindican en esta patente se ensayo sobre microsomas de hígado de rata, preparados según se describe en [**Michael, C. van Echten-Deckert, G.**; **Rother, J.**; **Sandhoff, K.**; **Wang, E.**; **Merrill, A. H.** *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22432-22437]. La actividad dihidroceramida desaturasa se determinó siguiendo el procedimiento

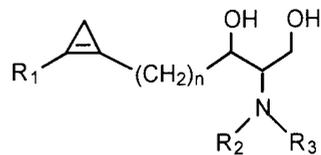
descrito en **Michel, C. van Echten -Deckert, G.**; **Rother, J.**; **Sandhoff, K.**; **Wang, E.**, **Merrill, A. H.** *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22432-22437, con las modificaciones que se especifican a continuación: el compuesto Ia, a dosis crecientes de 0, 0,6, 1,25, 2,5, 5 y 10 nmoles, se solubilizó en BSA-etanol 9:1 (100 μl) y sobre la disolución resultante se añadieron 10 nmoles de sustrato disueltos en 10 μL de etanol. Sobre esta disolución se añadieron 0,3 mg de la suspensión microsomal conteniendo la desaturasa, 30 μL de una disolución 1 μM de NADH en tampón de fosfatos 0,1 M, p H 7,5. La suspensión se incubó a 37°C durante 30 minutos y las reacciones se terminaron mediante adición de 0.5 mL de cloroformo conteniendo 1 nmol de *N*-hexanoilesfingosina como estándar interno para cuantificar. Los lípidos se extrajeron repetidamente con cloroformo (2 x 250 μL) y los extractos orgánicos reunidos se evaporaron a sequedad con una corriente de nitrógeno. El residuo resultante se trató con 50 μL de *bis*-trimetilsililtrifluoroacetamida a 25°C durante 60 minutos. Después de este tiempo, se añadieron 50 μL de cloroformo y las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis. Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en impacto electrónico (70 eV), empleando un cromatógrafo Fisons serie 8000 acoplado a un detector selectivo de masas Fisons MD-800. El sistema estaba equipado con una columna capilar Hewlett Packard HP-1 (30 m x 0.20 mm).

Los análisis de los extractos lipídicos revelaron que el efecto de Ia sobre la dihidroceramida desaturasa es dependiente de la dosis, con una IC_{50} , sin preincubación, de 0,052 μM (Figura 2).

REIVINDICACIONES

1. Derivados de ciclopropenilceramida como inhibidores de desaturasas **caracterizados** por la fórmula general I en la que R_1 puede ser un grupo alquilo, alqueno, alquino o arilo o cualquier heterociclo, n puede tener cualquier valor y estar ramificada o no, sustituida o no y contener insaturaciones y R_2 y R_3 pueden tener el mismo o distinto valor, representan grupos arilo, heteroarilo, alquilo o acilo con una o varias insaturaciones en la cadena, que pueden estar ramificadas o no, y sustituidas o no.

5



10

2. Utilización de derivados de ciclopropenilceramida según reivindicación 1 como inhibidores de la dihidroceramida desaturasa.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

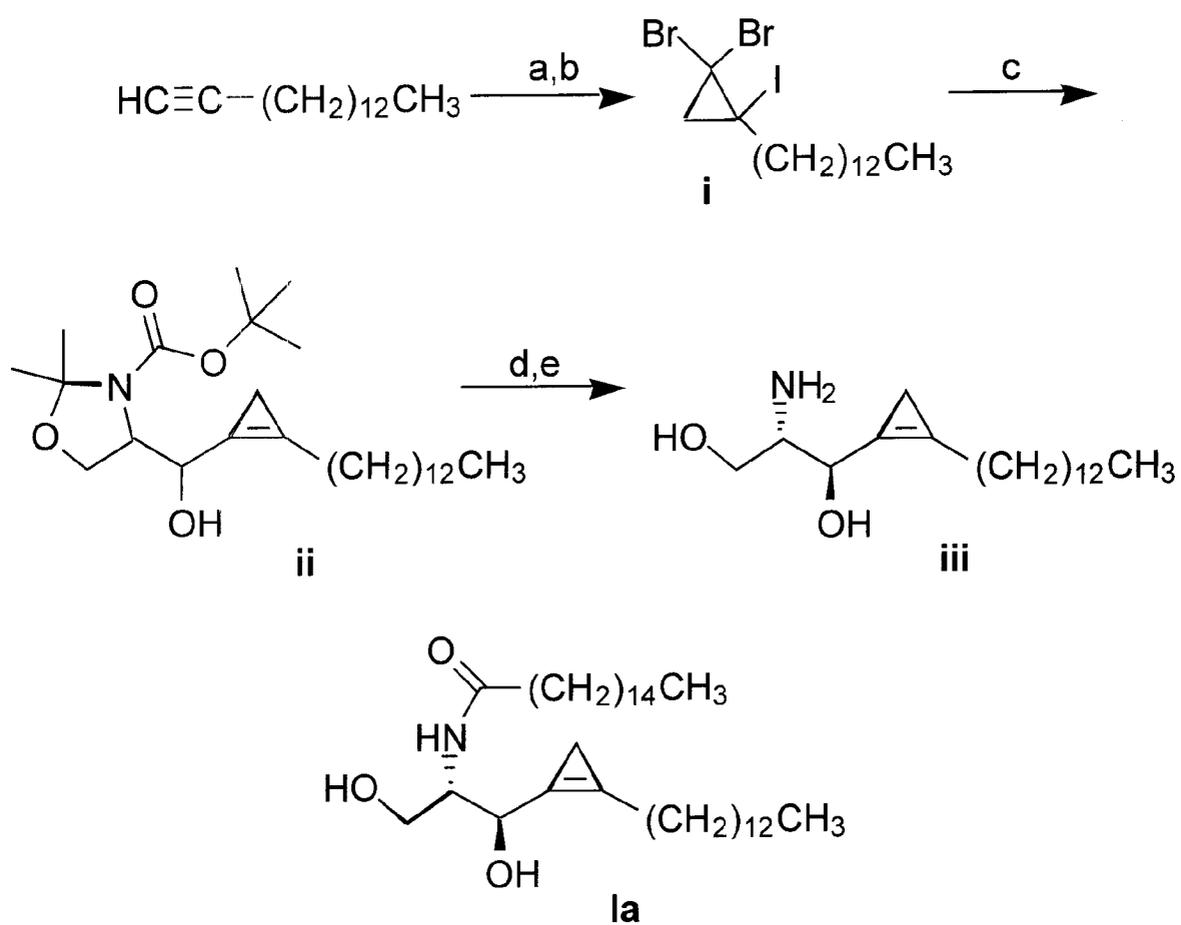


Figura 1

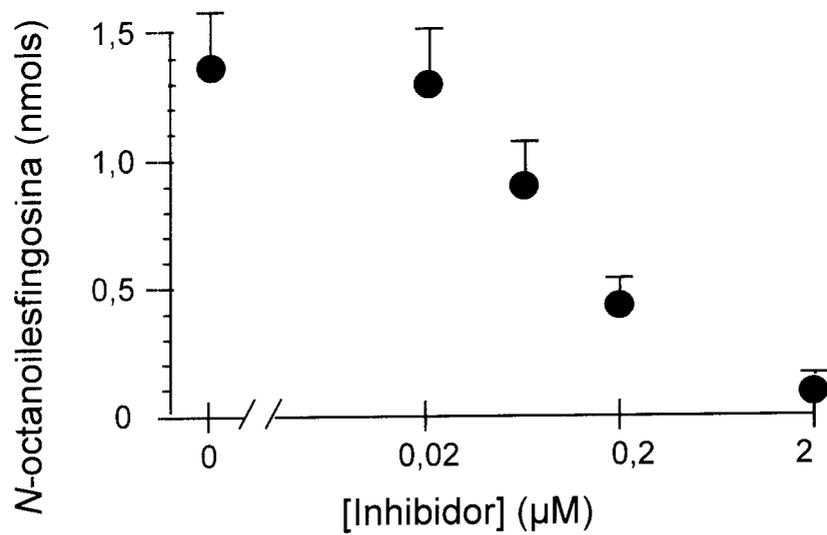


Figura 2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C07C 233/23, 215/26, A61K 31/133, A61P 3/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FOGERTY, A.C. y col. Ring Position in Cyclopropene Fatty Acids and Stearic Acid Desaturation in Hen Liver. Lipids, 1972, Vol. 7, páginas 335-338.	1,2
A	KOLTER, T. y col. Sphingolipids-Their Metabolic Pathway and the Pathobiochemistry of Neurodegenerative Diseases. Angew. Chem. Int. Ed., 1999, Vol. 38, páginas 1532-1568. Páginas 1540-1543.	1,2
A	EP 590650 A (MITSUBISHI KASEI CORPORATION) 06.04.1994, fórmula I; resumen.	1

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 n.º:

Fecha de realización del informe

15.02.2002

Examinador

E. Albarrán Gómez

Página

1/1