

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 396 092**

21 Número de solicitud: 201131119

51 Int. Cl.:

C07C 233/18 (2006.01)**C07C 311/04** (2006.01)**A61K 31/164** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.07.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2013

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (84.0%)
SERRANO, 117
28006 MADRID ES y
UNIVERSIDAD DE BARCELONA (16.0%)**

72 Inventor/es:

**ABAD SAIZ, José Luis;
CAMACHO CASTILLO, Luz Del Carmen;
CASAS BRUGULAT, Josefina;
FABRIAS DOMINGO, Gemma;
GARRIDO MARTÍNEZ, María;
THOMSON OKATSU, Timothy;
MECA CORTÉS, Óscar y
DELGADO CIRILO, Antonio**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier54 Título: **AMIDAS DE 2-AMINO-1,3-PROPANODIOLES Y SU USO COMO INHIBIDORES DE
CERAMIDASAS.**

ES 2 396 092 A1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

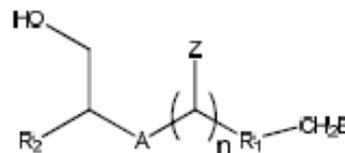


11 Número de publicación: **2 396 092**

21 Número de solicitud: 201131119

57 Resúmen:

Un compuesto de fórmula (I) o un estereoisomero, una sal o un solvato, donde: A es $-\text{CH}(\text{OH})-$ o $-\text{C}(=\text{O})-$, Z es H o OH, n es 0 o 1, R₁ es alquilo(C₁-C₃₀), alqueno(C₂-C₃₀) o alquinilo(C₂-C₃₀), B es -H, -N₃ o $-\text{C}\equiv\text{CH}$, R₂ es $-\text{NHR}_3$ o maleimida, R₃ es $-\text{COR}_4$, $-\text{COCOR}_4$ o $-\text{SO}_2\text{R}_4$, R₄ es alquilo(C₁-C₁₆), alqueno(C₂-C₁₆), alquinilo(C₂-C₁₆), epoxido o aziridina; con la condición de que: a) cuando A es $-\text{CH}(\text{OH})$ y B es H, R₃ es diferente de $-\text{COR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆); b) cuando A es $-\text{CH}(\text{OH})$, B es H, y R₃ es $-\text{COCOR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₆), R₁ es diferente de $-\text{CH}=\text{CH}_2$ -alquilo(C₁₂), $-\text{C}\equiv\text{CH}$ -alquilo(C₁₂) o alquilo(C₁₃-C₁₅); o c) cuando A es $-\text{C}(=\text{O})$, R₁ es alqueno(C₂-C₃₀), B es H y n es 0, R₃ es diferente de $-\text{COR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆). Uso del compuesto de fórmula (I), 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida o 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida en el tratamiento o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular, solo o en combinación.



Fórmula (I)

DESCRIPCIÓN

Amidas de 2-amino-1,3-propanodiol y su uso como inhibidores de ceramidasas

5 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

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

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

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

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

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

55 Se ha descrito una nueva generación de inhibidores lisosomotrópicos de la ceramidasa ácida desprovistos de la capacidad desestabilizadora del lisosoma del LCL204. Este tipo de inhibidores muestran un grupo ω-aminoácido junto con la combinación de elementos estructurales del B13 y del LCL204 (AD2646). Dentro de este grupo destacan el LCL464, capaz de inhibir la ceramidasa ácida tanto *in vivo* como *in vitro*, pero sin capacidad para inducir su degradación proteolítica. Además, el compuesto LCL464 provoca un aumento de la apoptosis dependiente de caspasas en diversos tipos de cáncer.

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

Se han publicado estructuras de análogos de ceramidas diferentes a los compuestos de la presente invención como moduladores de la apoptosis (Chang et al., J Am Chem Soc. 2002 124, 1856-1857), inhibidores de la producción de interleuquina 4 (Park et al. Bioorg Med Chem. 2005, 13, 2589-2595.) e inhibidores de la activación de la proteína quinasa C para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso (US5519007). La solicitud de patente WO200650264 describe conjugados de ceramidas con sales de piridinio y su uso en el tratamiento del cáncer. Esta solicitud de patente también describe el compuesto I-B2 (2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiheptadecan-2-yl)acetamida) como un intermedio para la obtención de los compuestos para el tratamiento de cáncer. Sin embargo, este documento del estado de la técnica no divulga que el compuesto I-B2 pueda utilizarse como anticancerígeno. Otras patentes describen otros análogos de ceramidas diferentes a los de la presente invención como inhibidores de ceramidasa (WO2003005965 y WO2005051891), para el tratamiento del cáncer (EP1580187) y para uso en el tratamiento de la inflamación (WO2004064823).

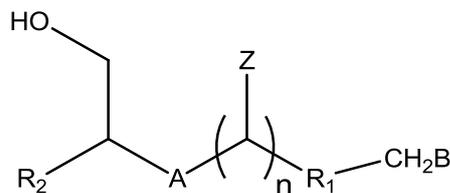
Se han descrito 3-cetoamidas de cadena de N-acilo de corta longitud con capacidad de inducir apoptosis en células de leucemia (Azuma et al. Bioorg Med Chem. 2007, 15, 2860-2867).

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

Descripción de la invención

La presente invención proporciona nuevos derivados de ceramida ácida. Así mismo, la presente invención también proporciona una familia de compuestos con actividad antiproliferativa y citotóxica mediante la inhibición de la actividad ceramidasa ácida. En particular, la presente invención proporciona una familia de compuestos para el tratamiento del cáncer.

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



(I)

o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste;

donde:

A se selecciona entre $-\text{CH}(\text{OH})-$ y $-\text{C}(=\text{O})-$,

Z se selecciona entre H y OH,

n es un número entero seleccionado entre 0 y 1,

R₁ se selecciona entre alquilo(C₁-C₃₀), alquenilo(C₂-C₃₀), y alquinilo(C₂-C₃₀),

B se selecciona entre -H, -N₃ y $-\text{C}\equiv\text{CH}$,

R₂ se selecciona entre $-\text{NHR}_3$ y maleimida, donde

R₃ se selecciona entre $-\text{CO}-\text{R}_4$, $-\text{CO}-\text{CO}-\text{R}_4$ y $-\text{SO}_2-\text{R}_4$, donde

R₄ se selecciona entre alquilo(C₁-C₁₆), alquenilo(C₂-C₁₆), alquinilo(C₂-C₁₆), epóxido y aziridina,

donde los grupos alquilo, alquenilo o alquinilo de R₁ y R₄ pueden estar, independientemente, opcionalmente sustituidos por uno o varios sustituyentes elegidos independientemente entre halógeno, OH, OR, OCF₃, NH₂, NO₂, NRR', NHCOR; CONRR, COOH, COOR, OCOR y CN, donde R y R' son alquilo o alquenilo;

con la condición de que

a) cuando A es $-\text{CH}(\text{OH})$ y B es H, R₃ es diferente de $-\text{COR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆) sin sustituir o sustituido por halógeno o hidroxilo;

b) cuando A es $-\text{CH}(\text{OH})$, B es H y R₃ es $-\text{COCOR}_4$ siendo R₄ alquilo-C₆, R₁ es diferente de $-\text{CH}=\text{CH}_2$ -alquilo(C₁₂), $-\text{C}\equiv\text{CH}$ -alquilo(C₁₂) o alquilo(C₁₃-C₁₅); o

c) cuando A es $-\text{C}(=\text{O})$, R₁ es alquenilo(C₂-C₃₀), B es H y n es 0, R₃ es diferente de $-\text{COR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆).

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas no cíclicas, lineales o ramificadas, que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, decilo o dodecilo. Los grupos alquilo pueden estar

opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, carbaldehído, alcóxicarbonilo, amino o nitro.

El término "alqueniilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas no cíclicas, lineales o ramificadas, que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, preferentemente contiene un único doble enlace carbono-carbono, y que están unidos al resto de la molécula por un enlace simple, por ejemplo, vinilo, 1-propeniilo, alilo, isopreniilo, 2-buteniilo o 1,3-butadieniilo. Los radicales alqueniilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, carbaldehído, alcóxicarbonilo, amino o nitro.

El término "alquiniilo" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas no cíclicas, lineales o ramificadas, que tienen uno o más triples enlaces carbono-carbono, preferentemente contiene un único triple enlace carbono-carbono, y que están unidos al resto de la molécula por un enlace simple por ejemplo, etiniilo o 1-propiniilo. El grupo alquiniilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, carbaldehído, alcóxicarbonilo, amino o nitro.

Algunos de los compuestos de fórmula (I) de la presente invención pueden tener uno o más centros estereogénicos. La presente invención abarca todos los posibles estereoisómeros no sólo sus mezclas racémicas sino también sus isómeros ópticamente activos. La obtención de un único enantiómero puede conseguirse mediante alguno de los procedimientos comúnmente empleados, por ejemplo, por resolución de la mezcla racémica mediante técnicas de recristalización, síntesis quirál, resolución enzimática, biotransformación o resolución cromatográfica.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal que conserva una eficacia y propiedades biológicas similares a la base libre o del ácido libre y que no es molesta en sentido biológico ni en ningún otro.

Las sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir las sales de adición de ácidos, tales como mesilatos, fumaratos, clorhidratos, citratos, maleatos o tartratos. También pueden formarse sales fisiológicamente aceptables con ácidos inorgánicos como son los ácidos sulfúrico o 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.

El término "solvato" en la presente solicitud de patente significa un agregado resultante de la asociación iónica o molecular entre moléculas de uno o más solventes y moléculas de uno de los compuestos objeto esta invención. El solvato puede comprender, por ejemplo, moléculas de agua, alcoholes, cetonas, acetatos o mezclas. En particular, el solvato puede comprender moléculas de agua, etanol, isopropanol, acetona o mezclas. Los solvatos objeto de la presente invención se pueden obtener por métodos conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, por cristalización en condiciones controladas.

De acuerdo con una realización preferente, el compuesto de fórmula (I) de la presente invención se caracteriza porque R_1 se selecciona entre alquilo(C_1-C_{30}) y alqueniilo(C_2-C_{30}), preferentemente R_1 se selecciona entre alquilo(C_1-C_{30}) y alqueniilo(C_2-C_{30}) sin sustituir, más preferentemente R_1 se selecciona entre alquilo(C_8-C_{16}) y alqueniilo(C_8-C_{16}) sin sustituir.

De acuerdo con una realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque n puede ser igual a cero.

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_3 es $-CO-R_4$, donde R_4 puede ser alquilo(C_1-C_{16}), y B se puede seleccionar entre $-N_3$ y $-C\equiv CH$.

Preferentemente, R_4 puede ser un alquilo(C_1-C_{16}) sustituido con al menos un átomo de halógeno, más preferentemente el halógeno puede ser un átomo de flúor o bromo, aún más preferentemente el halógeno es bromo.

De forma aún más preferente, R_4 puede ser un alquilo(C_1-C_5) sustituido con al menos un átomo bromo.

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente caracterizado porque R_3 es $-CO-R_4$, donde R_4 puede ser alquilo(C_1-C_{16}), y donde B se puede seleccionar entre $-N_3$ y $-C\equiv CH$ tal como se ha indicado anteriormente, también se caracteriza porque A es $-C(=O)$.

Preferentemente, R_4 puede ser un alquilo(C_1-C_{16}) sustituido con al menos un átomo de halógeno, más preferentemente el halógeno puede ser un átomo de flúor o bromo, aún más preferentemente el halógeno es bromo.

De forma aún más preferente, R_4 puede ser un alquilo(C_1-C_5) sustituido con al menos un átomo bromo.

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud

de patente se caracteriza porque R_3 es $-\text{CO}-R_4$, donde R_4 puede ser epóxido.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente donde R_3 es $-\text{CO}-R_4$, donde R_4 puede ser epóxido, también se caracteriza porque n puede ser 1 y Z puede ser OH.

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_3 es $-\text{CO}-R_4$, donde R_4 puede ser alquenoilo(C_2-C_{16}) o alquinoilo(C_2-C_{16}).

Preferentemente, R_4 puede ser un alquenoilo(C_2-C_{16}) sustituido con al menos un átomo de halógeno, más preferentemente, R_4 puede ser un alquenoilo(C_2-C_{16}) sustituido con al menos un átomo de flúor o bromo, de forma aún más preferente R_4 puede ser un alquenoilo(C_2-C_{16}) sustituido con al menos un átomo de bromo.

De acuerdo con otro modo de realización especialmente preferente, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_3 es $-\text{CO}-R_4$, donde R_4 es alquenoilo(C_2-C_{16}) o alquinoilo(C_2-C_{16}), y puede estar sustituido por al menos un grupo $-\text{CHO}$ o $-\text{COOH}$.

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_3 es $-\text{CO}-\text{CO}-R_4$, donde R_4 puede ser alquilo(C_1-C_{16}) y B se puede seleccionar entre $-\text{N}_3$ y $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_3 puede ser $-\text{SO}_2-R_4$, donde R_4 se puede seleccionar entre alquilo(C_1-C_{16}), alquenoilo(C_2-C_{16}), alquinoilo(C_2-C_{16}), epóxido y aziridina. Preferentemente R_4 puede ser alquilo(C_1-C_{16}), más preferentemente alquilo(C_1-C_8).

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_3 puede ser $-\text{SO}_2-R_4$, donde R_4 se puede seleccionar entre alquilo(C_1-C_{16}), alquenoilo(C_2-C_{16}), alquinoilo(C_2-C_{16}), epóxido y aziridina, n puede ser 1 y Z puede ser OH. Preferentemente R_4 puede ser alquilo(C_1-C_{16}), más preferentemente alquilo(C_1-C_8).

De acuerdo con otra realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) objeto de la presente solicitud de patente se caracteriza porque R_2 puede ser maleimida.

De acuerdo con otro modo de realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente se selecciona de la lista que consiste en:

1-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-1H-pirrol-2,5-diona,
N-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il]etanosulfonamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]etanosulfonamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]etanosulfonamida,
N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]etanosulfonamida,
 2-bromo-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]acetamida,
N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]bromoacetamida,
N-[(2S,3R,*E*)-14-azido-1,3-dihidroxitetradec-4-en-2-il]bromoacetamida,
 2-bromo-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]acetamida,
 (*S*)-*N*-(14-azido-1-hidroxi-3-oxotetradecan-2-il)-2-bromoacetamida,
 (*RS*)-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il]oxirano-2-carboxamida,
 (*RS*)-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]oxirano-2-carboxamida,
 (*RS*)-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]oxirano-2-carboxamida,
 (*RS*)-*N*-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]oxirano-2-carboxamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]propiolamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]but-2-inamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]acrilamida,
 (*E*)-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-2-butenamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]metacrilamida,
N-[(2S,3R)-*N*-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-3-metil-2-butenamida,
 (2*E*,4*E*)-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]hexa-2,4-dienamida,
 Ácido (*E*)-4-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-ilamino]-4-oxo-2-butenico,
 (*Z*)-2,3-dibromo-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-4-oxo-2-butenamida,
 (2S,3R)-2-(bromometil)-*N*-(1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acrilamida,
 (*E*,2S,3R)-*N*-(1,3-dihidroxi-2-octadecil)-2-metil-2-butenamida,
 (2S,3R)-*N*-(1,3-dihidroxi-17-octadecin-2-il)-2-oxooctanamida y
 (2S,3R)-*N*-(14-azido-1,3-dihidroxi-2-tetradecil)-2-oxooctanamida,
 o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.

Preferentemente, el compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente en esta solicitud de

patente se selecciona de la lista que consiste en:

2-bromo-*N*-[(2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]acetamida,
N-[(2*S*,3*R*)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]bromoacetamida,
N-[(2*S*,3*R*,*E*)-14-azido-1,3-dihidroxitetradec-4-en-2-il]bromoacetamida,
 2-bromo-*N*-[(2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]acetamida y
 (S)-*N*-(14-azido-1-hidroxi-3-oxotetradecan-2-il)-2-bromoacetamida,
 o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.

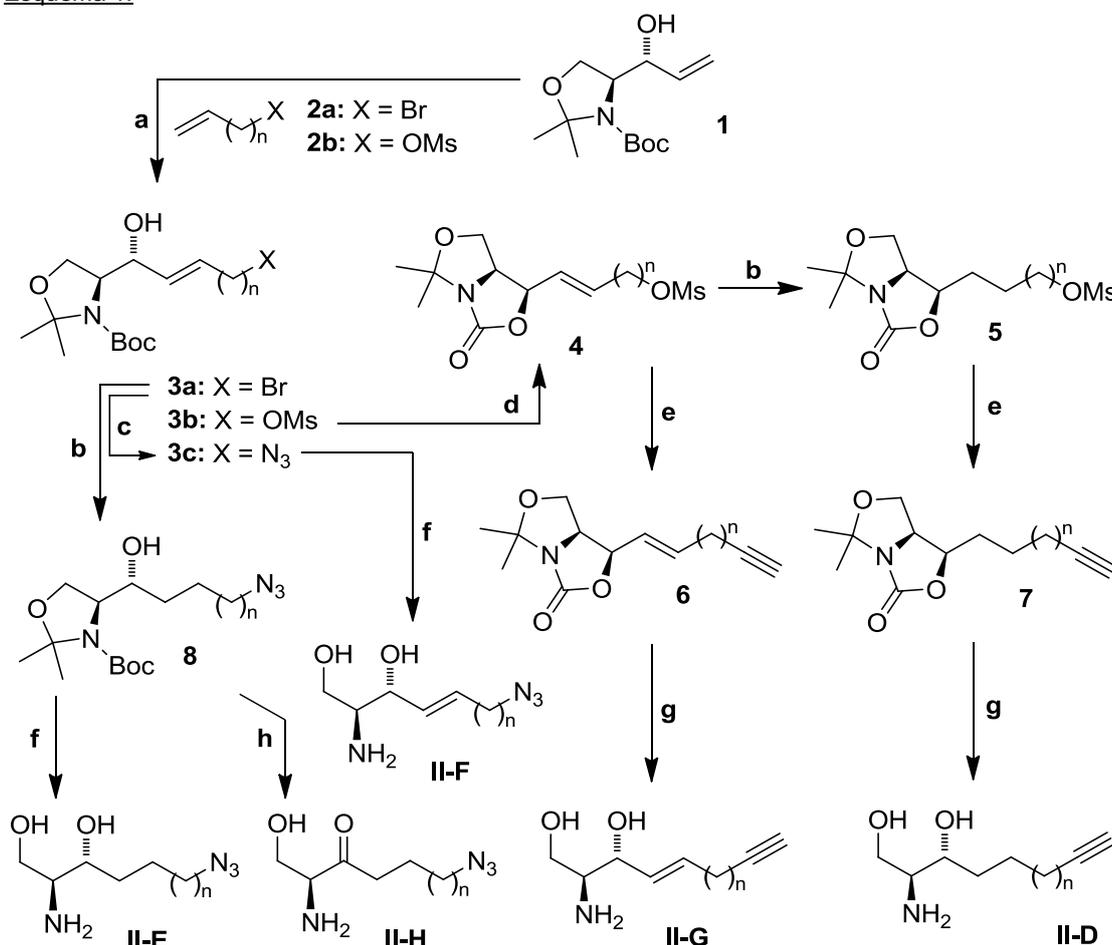
De acuerdo con otro modo de realización preferente adicional, el compuesto de fórmula (I) cuando n es 1 tal como se ha definido anteriormente se selecciona de la lista que consiste en:

N-[(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihidroxiocetadecan-2-il]jetanosulfonamida y
 (RS)-*N*-[(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihidroxiocetadecan-2-il]oxirano-2-carboxamida,
 o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.

Los compuestos de fórmula (I) pueden prepararse siguiendo distintos métodos conocidos para cualquier persona experta en el campo de la síntesis orgánica, en particular por los procedimientos generales que se describen a continuación. Los materiales de partida están disponibles comercialmente o bien se pueden preparar mediante métodos de la literatura.

Los compuestos de fórmula (I) pueden obtenerse a partir de los métodos y esquemas descritos a continuación:

Esquema 1.



a: Cat. Grubbs (segunda generación); **b:** 1) H₂, Pd/C; 2) NaN₃/DMF; **c:** NaN₃/DMF; **d:** NaH/THF; **e:** 1) Li-C≡C-TMS; 2) Bu₄NF; **f:** HCl/MeOH; **g:** 1) cat. TsOH/MeOH; 2) NaOH/EtOH; **h:** 1) PCC/CH₂Cl₂; 2) cat. TsOH/MeOH.

En primer lugar, se hace reaccionar el compuesto 1 (Herold, *Helv. Chim. Acta.* **1988**, 71, 354-62) con una olefina terminal (como, por ejemplo, 2a o 2b) en una reacción de metátesis cruzada en presencia del catalizador de Grubbs de segunda generación, (Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4996-9) obteniéndose los compuestos 3. Por hidrogenación del intermedio 3a seguida de sustitución nucleófila del átomo de bromo por azida sódica se llega a los intermedios 8, que por hidrólisis de los grupos protectores conducen a los aminodiolos II-E. Por otra parte, por oxidación

de **8** y posterior hidrólisis de los grupos protectores se obtienen las aminas **II-H**. Para obtener las aminas **II-F**, el bromoderivado **3a** se hace reaccionar con azida sódica en dimetilformamida, obteniéndose **3c**, seguido de hidrólisis ácida del anillo de oxazolidina y del grupo Boc. Mediante reacción de los intermedios **3b** con hidruro de sodio en dimetilformamida se obtienen los mesilatos **4**, que pueden hidrogenarse a **5**. Mediante reacción de **4** ó **5** con trimetilsililacetiluro de litio seguida de desprotección del acetiluro con fluoruro de tetrabutilamonio se obtienen los alquinos terminales **6** y **7**, respectivamente. Su transformación en las correspondientes aminas **IIG** y **IID** se consigue mediante hidrólisis secuencial de los grupos isopropilideno y carbamato.

Los anteriores amino alcoholes, así como la esfingosina o la dihidroesfingosina, pueden acilarse por reacción con un cloruro de ácido en presencia de una base. Alternativamente, también puede emplearse un anhídrido de ácido, como el anhídrido maleico, o un ácido carboxílico en presencia de un agente de acoplamiento adecuado como, por ejemplo, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), el hexafluoro fosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N'*-tetrametiluronio (HATU) o el benzotriazol-1-iloxi-tris pirrolidinofosfonio (PyBOP) y un activador como el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), en presencia de una base como trietilamina, en un disolvente como diclorometano y bajo atmosfera inerte (E. Valeur, *et al.*, *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 606-31) Las sulfonamidas pueden prepararse por acoplamiento de las aminas correspondientes con cloruro de etanosulfonilo en disolución de tetrahidrofurano.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) o uno de sus estereoisómeros, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables tal como se define en esta solicitud de patente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición farmacéutica se puede presentar en una forma adaptada a la administración parenteral, oral, sublingual, nasal, intratecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, tanto el compuesto de fórmula general (I) o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste tal como se ha definido en la presente solicitud de patente, como un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos son útiles para el tratamiento de una enfermedad asociada con la inhibición de la ceramidasasa ácida, y por lo tanto son útiles en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, tanto las composiciones de un compuesto de fórmula general (I) o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste tal como se ha definido en la presente solicitud de patente, como las composiciones que comprenden un compuesto que se puede elegir entre 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, son útiles para el tratamiento y prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular.

Preferentemente, el compuesto o composición para utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular tal como se han definido anteriormente en la presente solicitud de patente, se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad elegida entre cáncer, metástasis, inflamación, asma y arteriosclerosis.

De forma más preferente, el compuesto o composición para utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular tal como se han definido en la presente solicitud de patente, se puede utilizar en el tratamiento del cáncer de próstata, páncreas, cerebro, colon, pulmón, mama, cabeza y cuello, ovario, laringe, vejiga urinaria, útero, piel, sarcomas, linfomas o leucemia. Preferentemente, cáncer de próstata o pulmón.

La presente invención también se refiere a un método para la prevención o el tratamiento de un individuo que padece o es susceptible de padecer enfermedad que cursa con hiperproliferación celular, en particular el tratamiento del cáncer y más preferentemente el tratamiento del cáncer de próstata o pulmón, que comprende la administración a dicho individuo de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo junto con cantidades suficientes de excipientes farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también se refiere al uso tanto de un compuesto de fórmula general (I) o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste tal como se ha definido en la presente solicitud de patente, como al uso de un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos, para fabricar una composición farmacéutica útil en el tratamiento de una enfermedad asociada con la inhibición de la ceramidasasa ácida, y por lo tanto útil en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular.

Preferentemente, dicha composición se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad elegida entre cáncer, metástasis, inflamación, asma y arteriosclerosis.

De forma más preferente, la composición tal como se ha descrito anteriormente se puede utilizar en el tratamiento del cáncer de próstata, páncreas, cerebro, colon, pulmón, mama, cabeza y cuello, ovario, laringe, vejiga urinaria, útero, piel, sarcomas, linfomas o leucemia. Preferentemente, cáncer de próstata o pulmón.

Los compuestos usados en la presente invención pueden usarse solos o con otros fármacos para proporcionar una terapia de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o se pueden suministrar en forma de composición separada para la administración al mismo tiempo o en un momento diferente. Así, de acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido en la presente solicitud de patente o un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos, se puede utilizar en combinación con otra terapia para el tratamiento de una enfermedad tal como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, la composición de un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido anteriormente en la presente solicitud de patente o la composición que comprende un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos y al menos un excipiente, se puede utilizar en combinación con otra terapia para el tratamiento de una enfermedad tal como se ha definido anteriormente.

Otros tipos de terapia pueden ser quimioterapia o radioterapia. A título de ejemplo, los agentes terapéuticos pueden ser tamoxifen, daunorubicina, etoposido, paclitaxel, dacarbacida, temozolomida, temsirolimus, fenretinida, resveratrol, borinostat, sorafenib, imatinib, bortezomib, gemcitabina o cisplatín.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de los compuestos sobre la actividad ceramidasa ácida. Los ensayos se efectuaron sobre células de Farber transducidas para que sobreexpresen la ceramidasa ácida, ya sea intactas (barras blancas) o en lisados (barras grises). La incubación se llevó a cabo añadiendo conjuntamente el inhibidor (16 μ M) con el sustrato fluorogénico (16 μ M) durante 3 h. A continuación se procedió tal como se detalla en el ejemplo 1 del apartado de ejemplos de ensayos biológicos (Bedia et al. Chembiochem 2007, 8, 642). El eje y indica el porcentaje de actividad enzimática respecto al control.

Figura 2. Efecto de los compuestos sobre la actividad ceramidasa ácida. Los ensayos se efectuaron sobre células de adenocarcinoma de pulmón humano A549. Las células intactas se incubaron con el inhibidor (16 μ M) durante 24 h y luego se añadió el sustrato fluorogénico (16 μ M), que se incubó durante 3 h. La hidrólisis se determinó midiendo la fluorescencia generada después de proceder tal como se indica en el ejemplo 1 del apartado de ejemplos de ensayos biológicos (Bedia et al. Chembiochem 2007, 8, 642). El eje y indica el porcentaje de actividad enzimática respecto al control.

Figura 3. Efecto de los compuestos I-B2, I-B17 e I-B9 sobre la actividad ceramidasa ácida de las células de cáncer de próstata PC-3Mc. Los ensayos se efectuaron por incubación de las células con el inhibidor. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/ml y los compuestos se añadieron 24 h después de la siembra. Se usaron tres dosis de cada inhibidor, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M, en incubaciones durante 48 h y los ensayos se realizaron por triplicado. Tras este período de incubación, se eliminó el medio y se añadió medio fresco conteniendo el el sustrato fluorogénico (16 μ M) y se incubó durante 3 h. La hidrólisis se determina midiendo la fluorescencia generada después de proceder tal como se indica en el ejemplo 1 del apartado de ejemplos de ensayos biológicos (Bedia et al. Chembiochem 2007, 8, 642). El eje y indica el porcentaje de actividad enzimática respecto al control.

Figura 4. Efecto de los compuestos sobre el ceramidoma. Los ensayos se efectúan sobre células de adenocarcinoma de pulmón humano A549. Las células intactas se incubaron con el inhibidor (16 μ M) durante 24 h y luego se recolectaron las células y se procesaron tal como se detalla en el ejemplo 2 de ejemplos de ensayos biológicos.

Figura 5. Efecto de los compuestos I-B2, I-B17 e I-B9 sobre el esfingolipidoma de las células de cáncer de próstata PC-3Mc. Los ensayos se efectuaron por incubación de las células con los compuestos. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000 células/ml y los compuestos se añadieron 24 h después de la siembra. Se

usaron tres dosis de cada inhibidor, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M, en incubaciones durante 48 h y los ensayos se realizaron por triplicado. Se usaron tres dosis de cada compuesto, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M, en incubaciones durante 48 h. Tras este período de incubación, se elimina el medio se recolectan las células y se procesan tal como se detalla en el ejemplo 2 de ejemplos de ensayos biológicos. A, ceramidas; B, dihidroceramidas; C, esfingomielinas; D dihidroesfingomielinas; E, glucosilceramidas.

Figura 6. Efecto de los compuestos sobre la viabilidad de las células de A, adenocarcinoma de pulmón A549 (negro) y de leucemia Jurkat A3 (gris) y B, cáncer de próstata PC3/Mc. Las células se sembraron a una densidad de 200.000 células por mililitro y, 24 h después de la siembra, se incubaron con los compuestos durante 24 h (A) o 72 h (B), tras las cuales se determinó el número de células viables mediante el ensayo de reducción del MTT, tal como se especifica en el ejemplo 3 de ejemplos de ensayos biológicos. El eje y indica el porcentaje del número de células respecto al control.

Figura 7. Efecto de los compuestos sobre el crecimiento de las células PC-3Mc sobre sustrato plástico. Se sembraron 500 células en cada pocillo de placas de 96 pocillos, dejándose adherir al plástico durante 24 h, seguido de tratamiento con los compuestos a una concentración final de 5 μ M. El efecto de las incubaciones con estos compuestos sobre el crecimiento celular de determinó cuantificado el número de células presentes a las 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 144 h y 168 h después del tratamiento con los compuestos. El eje y indica la proporción relativa del número de células respecto al día 1 y el eje x se refiere al tiempo (t) en días.

Figura 8. Efecto de los inhibidores sobre la formación de colonias celulares en medio semisólido. Las células PC-3Mc, sembradas en medio de cultivo completo que contiene agar al 3%, se trataron con los compuestos problema a concentraciones finales de 1 μ M o 5 μ M, reañadiéndolos con una periodicidad de 3 días, coincidiendo con la adición de medio de cultivo nuevo. El número de colonias se contó 3 semanas después del tratamiento. El eje y indica el número de colonias (N° Col.)

Figura 9. Efecto de los inhibidores sobre la invasividad celular. Las células PC-3Mc fueron tratadas con los compuestos problema a una concentración final de 5 μ M durante las 48 h previas al ensayo de invasividad. Tras ese tiempo de tratamiento, las células fueron recolectadas, resuspendidas en medio completo, y sembradas sobre las cámaras superiores de los insertos Transwell recubiertos con Matrigel (10 mg/mL). Los compuestos problema se añadieron tanto a la cámara superior como a la inferior, a una concentración de 5 μ M, manteniéndose este tratamiento a lo largo de todo el período de duración del ensayo. Cada condición se realizó por triplicado. El eje y indica el número de células (N°)

Figura 10. Fórmulas de los compuestos sintetizados en los ejemplos.

EJEMPLOS

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

Ejemplos de síntesis química

Síntesis de los precursores de las bases esfingoides II(D-H)

Reacción de metátesis entre el alcohol **1** y las olefinas terminales **2a** y **2b**: síntesis de **3a** y de **3b**

A una disolución desgasada del alcohol **1** (5 mmol) y de la olefina terminal **2a** o **2b** (20 mmol) en diclorometano (80 mL) se añadieron 400 mg (aproximadamente 0.5 mmol) de catalizador de Grubbs de segunda generación. La mezcla se agitó a la temperatura de reflujo bajo atmósfera de Ar durante 5 h. Tras la evaporación del disolvente, el residuo se purificó por cromatografía flash (hexano / EtOAc 1:3).

(S)-4-[(R,E)-12-bromo-1-hidroxidodec-2-enil]-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de *tert*-butilo (**3a**)

Rendimiento: 85%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.58 (m, 1H); 5.45 (m, 1H); 4.20-3.70 (m, 4H); 3.35 (t, 2H); 1.95 (m, 2H); 1.78 (m, 2H); 1.65-1.35 (m, 12H); 1.45 (s, 9H); 1.18 (s, 6H),

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 154.32, 133.94, 133.40, 129.26, 128.25, 94.51, 81.13, 74.16, 65.03, 62.36, 34.17, 32.90, 32.48, 29.46, 29.36, 29.26, 29.19, 28.96, 28.84, 28.79, 28.47, 28.42, 28.24, 26.35, 24.71.

(S)-4-[(R,E)-1-hidroxi-14-(metilsulfonilo)tetradec-2-enil]-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de *tert*-butilo (**3b**)

Rendimiento: 89%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.82-5.75 (m, 1H); 5.45-5.30 (m, 1H); 4.22 (t, 2H); 4.30-3.80 (m, 4H); 3.05 (s, 3H); 2.10-2.05 (m, 2H); 1.75-1.70 (m, 2H); 1.55-1.45 (s ancho, 15H); 1.70-1.15 (m, 12H)

(S)-4-[(R,E)-12-azido-1-hidroxidodec-2-enil]-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de *tert*-butilo (3c)

Una disolución de 122 mg (1.87 mmol) de azida sódica en DMF anhidro (10 mL) se añadió, gota a gota, sobre una disolución del bromuro **3a** en 5 mL de DMF, bajo atmósfera de Ar a temperatura ambiente. Finalizada la adición, la mezcla de reacción se calentó a 65° C y se mantuvo en agitación durante 12h. A continuación, la mezcla se diluyó con 40 mL de agua y se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera (2 x 10 mL), se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron para dar un residuo que se purificó por cromatografía flash (Hexano / EtOAc 7:3).

Rendimiento: 91%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.82 – 5.66 (m, 1H), 5.48 – 5.36 (m, 1H), 4.22 – 3.75 (m, 4H), 3.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.11 – 1.96 (m, 2H), 1.45 (s, 9H); 1.32 (s, 6H); 1.55-1.35 (m, 18H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 133.51, 128.29, 94.58, 81.20, 74.25, 65.08, 62.44, 51.61, 32.53, 29.55, 29.51, 29.45, 29.31, 29.28, 29.24, 28.97, 28.51, 26.84, 26.38, 24.74.

15 Metanosulfonato de (E)-13-[(1R,7aS)-5,5-dimetil-3-oxo-tetrahydro-1H-oxazol[3,4-c]oxazol-1-il]tridec-12-enilo (4)

Sobre una disolución de 505 mg (1 mmol) de **3b** en THF anhidro (10 mL), enfriada en un baño de hielo, se añadieron 80 mg (2 mmol) de NaH. Tras agitación a temperatura ambiente durante 18h, la mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo, se trató con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con Et₂O (3 x 5 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con salmuera y se secaron sobre MgSO₄ anhidro. Tras la evaporación del disolvente se obtuvo el compuesto **4**, que se sometió a la etapa posterior sin purificación.

Rendimiento: 85%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.90-5.85 (m, 1H); 5.80-5.75 (m, 1H); 5.05-4.95 (m, 1H); 4.55 (ancho, 1H); 4.20 (t, 2H); 3.90-3.75 (m, 2H); 3.15 (s, 3H); 2.05 (m, 2H); 1.55 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 1.50-1.35 (ancho, 18H).

25 Metanosulfonato de 13-[(1R,7aS)-5,5-dimetil-3-oxo-tetrahydro-1H-oxazol[3,4-c]oxazol-1-il]tridecilo (5)

Una disolución de 430 mg (1 mmol) del compuesto **4** en etanol (10 mL) se sometió a hidrogenación, a presión atmosférica, en presencia de 10 mg de Pd/C al 10 %. Tras 12 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite y el filtrado obtenido se evaporó a sequedad proporcionando el compuesto **5**.

Rendimiento: 98%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.62 (m, 1H); 4.30 (m, 1H); 4.20 (t, 2H); 3.75-3.55 (m, 2H); 2.85 (s, 3H); 1.75-1.65 (m, 2H); 1.55-1.50 (m, 2H); 1.61 (s, 3H); 1.48 (s, 3H); 1.55-1.25 (ancho, 20H).

35 Síntesis de los acetilenos 6 y 7 a partir de los mesilatos 4 y 5

Etapa 1: Sobre una disolución de los mesilatos **4** ó **5** (2 mmol) en 8 mL de una mezcla 1:1 THF/HMPA (hexametilfosfotriamida) enfriada a -30 °C, se añadieron, gota a gota, 4.5 mL de una disolución 0.5 M de trimetilsililacetiluro de litio en THF (equivalentes a 2.25 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación mientras se calentó lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Tras el consumo del producto de partida (alrededor de 1h, por análisis por TLC), la reacción se detuvo por adición de 5 mL de disolución saturada de NH₄Cl y la mezcla se extrajo con hexano (3 x 10 mL). Los extractos orgánicos reunidos se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se evaporaron a presión reducida para obtener los correspondientes acetiluros de trimetilsililo intermedios, que se usaron en la etapa siguiente sin purificación.

Etapa 2: Una disolución del acetiluro de trimetilsililo (1.5 mmol) en THF anhidro (5 mL) se trató con 2 mL de una disolución 1M de Bu₄NF en THF bajo atmósfera de Ar. Tras agitación durante 30 min a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trató con H₂O (0.5 mL), se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó a presión reducida, obteniéndose los acetilenos **6** y **7**.

50 (1R,7aS,E)-5,5-dimetil-1-(pentadec-1-en-14-inil)-dihidro-1H-oxazol[3,4-c]oxazol-3(5H)-ona (6)

Rendimiento: 75%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.95-5.80 (m, 1H); 5.75-5.70 (m, 1H); 5.15-5.05 (m, 1H); 4.65 (ancho, 1H); 3.85-3.65 (m, 2H); 2.15-1.95 (m, 4H); 1.85 (t, 1H); 1.50 (s, 3H); 1.45 (s, 3H); 1.50-1.25 (ancho, 18H).

55 (1R,7aS)-5,5-dimetil-1-(pentadec-14-inil)-dihidro-1H-oxazol[3,4-c]oxazol-3(5H)-ona (7)

Rendimiento: 79%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.15-5.05 (m, 1H); 4.65 (ancho, 1H); 3.85-3.65 (m, 2H); 2.05-1.95 (ancho, 2H); 1.85 (t, 1H); 1.50 (s, 3H); 1.45 (s, 3H); 1.50-1.45 (m, 4H); 1.35-1.25 (ancho, 20H)

60 (S)-4-[(R)-12-azido-1-hidroxidodec-2-enil]-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de *tert*-butilo (8)

Etapa 1: Una disolución de 460 mg (1 mmol) del compuesto **3a** en etanol (10 mL) se sometió a hidrogenación, a presión atmosférica, en presencia de 10 mg de Pd/C al 10 %. Tras 12 h de agitación a temperatura ambiente, la mezcla de

reacción se filtró sobre Celite y el filtrado obtenido se evaporó a sequedad proporcionando un crudo que se sometió a la reacción siguiente.

5 Etapa 2: Una disolución de 100 mg (1.54 mmol) de azida sódica en DMF anhidro (10 mL) se añadió, gota a gota, sobre una disolución del crudo de la reacción anterior en 5 mL de DMF, bajo atmósfera de Ar a temperatura ambiente. Finalizada la adición, la mezcla de reacción se calentó a 65° C y se mantuvo en agitación durante 12h. A continuación, la mezcla se diluyó con 40 mL de agua y se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se lavaron con salmuera (2 x 10 mL), se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron para dar un residuo que se purificó por cromatografía flash (Hexano / EtOAc 7:3).

10 Rendimiento global : 72 %

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.15-3.95 (m, 2H); 3.90-3.70 (m, 2H); 3.25 (t, 2H); 1.45 (s, 9H); 1.65-1.60 (m, 4H); 1.40-1.20 (m, 22H)

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 154.1, 94.3, 73.0, 64.8, 62.6, 51.5, 34.5, 33.9, (29.7-28.4), 26.8, 26.5, 26.1, 24.3.

15 Síntesis de bases esfingoides II(D-H)

(2S,3R)-2-amino-14-azidotetradecano-1,3-diol (II-E) y (2S,3R,E)-2-amino-14-azidotetradec-4-eno-1,3-diol (II-F)

20 Una disolución de (0.5 mmol) de **8** o de **3c** en MeOH (10 mL) se trató con cloruro de acetilo (0.6 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h, transcurridas las cuales se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se disuelve en agua, se alcalinizó con una disolución de NaOH 1N y se extrajo con EtOAc (3 x 5 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron (MgSO₄) y se evaporaron a sequedad y el residuo se purificó por cromatografía flash (hexano / EtOAc 7:3) para obtener el producto deseado.

(II-E): Rendimiento a partir de **8** : 82 %

25 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.70 (m, 2H); 3.60 (m, 1H); 3.25 (t, 2H); 2.85 (m, 1H); 1.65-1.55 (m, 2H); 1.53-1.45 (m, 3H); 1.40-1.20 (m, 15H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 74.61, 63.50, 55.80, 51.57, 33.95, 29.80, 29.71, 29.69, 29.63, 29.60, 29.58, 29.26, 28.93, 26.81, 26.23.

30 (II-F): Rendimiento a partir de **3c** : 85 %

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.80-5.65 (m, 1H); 5.50-5.35 (m, 1H); 4.05 (m, 1H); 3.70-3.55 (m, 2H); 3.25 (t, 2H); 2.85-2.75 (m, 1H); 2.05 (m, 2H); 1.55 (m, 2H); 1.40-1.20 (m, 13H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 134.63, 129.37, 75.20, 63.81, 56.25, 51.57, 32.45, 29.52, 29.46, 29.40, 29.30, 29.24, 28.93, 26.80.

35

(2S,3R)-2-aminooctadec-17-in-1,3-diol (II-D) y (2S,3R,E)-2-aminooctadec-4-en-17-in-1,3-diol (II-G) por hidrólisis de **6** y **7**

40 Etapa 1. Una disolución de 0.6 mmol de **6** ó **7** y TsOH (12 mg, 0.06 mmol) en MeOH (10 mL) se agitó a 25 °C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo resultante se disolvió en EtOAc. La disolución orgánica se lavó, sucesivamente, con una disolución saturada de NaHCO₃ y salmuera y se secó. La evaporación del disolvente proporciona un residuo que se usó directamente en la siguiente etapa de síntesis.

45 Etapa 2. Una disolución del crudo anterior en 2N NaOH (30 mL) y EtOH (30 mL) se calentó a 80 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a continuación, se concentra, a presión reducida, hasta una cuarta parte del volumen y se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas reunidas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron para dar el correspondiente producto final.

(II-D): Rendimiento global a partir de **7**: 70%

50 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.990-3.65 (m, 2H); 3.45 (m, 1H); 2.82 (m, 1H); 2.01 (m, 2H); 1.82 (t, 1H); 1.45 (m, 4H); 1.29-1.26 (m, 20H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 83.5, 75.1, 62.5, 61.1, 33.1, (29.9-28.2), 23.5, 21.4.

(II-G): Rendimiento global a partir de **6**: 73%

55 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.69-5.65 (m, 2H); 4.15 (m, 1H); 3.90-3.65 (m, 2H); 2.85 (m, 1H); 2.05-1.95 (m, 4H); 1.85 (t, 1H); 1.45-1.30 (m, 18H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 131.1, 129.7, 83.5, 75.5, 68.9, 62.3, 56.8, 35.1, (29.9-28.4), 21.2.

Hidrocloreto de (S)-2-amino-14-azido-1-hidroxitetradecan-3-ona (II-H)

60 Etapa 1. Una disolución de 550 mg (1.30 mmol) de **8** en 30 mL de CH₂Cl₂ se trató con clorocromato de piridinio (PCC) (420 mg, 1.90 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 h, transcurrida la cual se añadieron otros 420 mg de PCC y se mantuvo en agitación durante 12 h más. A continuación, la mezcla de reacción se filtró sobre Celite y el filtrado se evaporó a presión reducida para dar un crudo que se utilizó directamente en la siguiente etapa.

Etapa 2. Una disolución del crudo anterior en 20 mL de MeOH se trató con 1.2 mL de cloruro de acetilo a 25 °C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida para dar el producto final en forma del correspondiente hidrocloreto.

Rendimiento global a partir de **8**: 89 %

5 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 4.15 (t ancho, 1H); 4.10 (dd, 1H); 3.95 (dd, 1H), 3.3 (t, 2H); 2.65 (t, 2H); 1.60-1.55 (m, 2H); 1.45-1.25 (ancho, 16H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CD_3OD): δ 205.19, 62.19, 60.26, 52.44, 39.62, 30.62, 30.60, 30.57, 30.52, 30.27, 30.09, 29.92, 27.82, 24.18.

10 Obtención de los compuestos de fórmula (I).

Ejemplo I-B4. 1-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-1H-pirrol-2,5-diona

Una disolución de esfingarina (30 mg, 0,10 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) se adicionó, gota a gota, sobre 1 mL de una disolución de anhídrido maleico 0.1 M en CH_2Cl_2 , enfriada exteriormente con un baño de hielo. A continuación, se retiró el baño y la mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 16 h, transcurridas las cuales se adicionó cloruro de oxalilo (8.5 μL , 0,1 mmol) y una gota de DMF, manteniendo la agitación durante otras 8 h. Al final de este periodo, la mezcla de reacción se trató con 0,5 mL de una disolución 0,2 M de Et_3N en CH_2Cl_2 y se agitó a temperatura ambiente. Al cabo de 1 h, la mezcla de reacción se lavó con agua (3 x 2,5 mL) y la fase orgánica se secó sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash (hexano/ EtOAc 4:1), obteniéndose 32 mg (81 % rendimiento) del compuesto I-B4.

15 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 6.94 (s, 2H), 3.75 – 3.68 (m, 1H), 3.87 – 3.80 (m, 3H), 1.65 – 1.45 (m, 4H), 1.25 (ancho, 24H), 0.85 (t ancho, 3H).

20 $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): 170.25, 135.84, 69.06, 58.21, 51.53, 33.71, 32.13, (29.90 - 29.60), 26.04, 22.91, 14.35.

25 Método general para la preparación de sulfonamidas por acoplamiento con cloruro de etanosulfonilo

Sobre una disolución de la correspondiente base esfingoida **II** (0,10 mmol) y Na_2CO_3 (21 mg, 0,20 mmol) en THF (1 mL) y agua (2 mL) se adicionaron, gota a gota, 14 μL , (0,15 mmol) de cloruro de etanosulfonilo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 18h a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó con 5 mL de disolución saturada de NaCl, se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 5 mL), se secó sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía flash (hexano/ EtOAc 4:1) para proporcionar el compuesto deseado.

30 Ejemplo I-A1. N-[(2S,3R,E)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il]etanosulfonamida

Rendimiento: 75%

35 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 5.69 (m, 1H); 5.65 (m, 1H); 4.15 (m, 1H); 3.80-3.60 (m, 2H); 3.50 (q, 2H); 2.90 (m, 1H); 2.01 (m, 2H); 1.29 (s, 3H); 1.35-1.26 (m, 22H); 0.86 (t, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 131.5, 129.9, 72.1, 59.5, 54.3, 48.8, 34.1, 32.2, (30.0-29.5), 22.7, 14.1, 2.3.

40 Ejemplo I-B1. N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]etanosulfonamida

Rendimiento: 77%

40 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.45 (q ancho, 2H), 3.97 – 3.70 (m, 3H), 2.78 (m, 1H), 1.68 – 1.41 (m, 4H), 1.28 (t ancho, 3H), 1.23 (ancho, 24H), 0.85 (t ancho, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 75.06, 60.61, 54.83, 47.56, 33.91, 31.93, (29.95 - 26.04), 22.81, 14.25, 2.35.

45 Ejemplo I-C1. N-[(2S,3S,4R)-1,3,4-trihidroxiocetadecan-2-il]etanosulfonamida

Rendimiento: 79%

45 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.90-3.60 (m, 2H); 3.50 (m, 1H); 3.45 (q, 2H); 3.18 (m, 1H); 2.75 (m, 1H); 1.51 (m, 2H); 1.30 (s, 3H); 1.30-1.26 (s ancho, 24H); 0.86 (t, 3H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 76.5, 71.3, 59.6, 48.4, 47.2, 31.9, 31.2, (29.9-29.3), 23.7, 22.6, 14.2, 2.3.

50 Ejemplo I-D1. N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]etanosulfonamida

Rendimiento: 84%

50 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.90-3.70 (m, 3H); 3.45 (q, 2H); 2.80 (m, 1H); 2.03 (m, 2H); 1.85 (t, $J = 2.5$, 1H); 1.28 (s, 3H); 1.20-1.40 (s ancho, 24H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 83.5; 72.5; 47.6, 69.1; 60.2; 58.4; 32.9; (29.5-28.5); 23.4; 21.3, 2.3.

55 Ejemplo I-E1. N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]etanosulfonamida

Rendimiento: 71%

55 $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 3.80-3.60 (m, 2H); 3.45 (m, 1H); 3.40 (q, 2H); 2.80 (m, 1H); 1.45 (m, 2H); 1.30-1.25 (m, 20H).

60 $^{13}\text{C-RMN}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 71.5, 60.1, 55.3, 50.2, 48.7, 33.1, 30.2, (29.9-29.2); 27.1, 23.2, 2.3.

Método general para la preparación de amidas por acoplamiento con ácidos carboxílicos

65 Sobre una disolución de la correspondiente base esfingoida **II** (0,10 mmol) y Et_3N (30 μL , aproximadamente 0,20 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL) bajo atmósfera de argón, se añadió, gota a gota, una disolución del correspondiente ácido carboxílico (0,10 mmol), HOBt (18 mg, 0,13 mmol) y EDC (20 mg, 0,13 mmol) en CH_2Cl_2 (1 mL). La mezcla de reacción se agitó a

temperatura ambiente durante 1 h, se lavó con agua (3 x 0,5 mL) y se concentró a presión reducida. El crudo resultante se purificó por cromatografía flash, utilizando un gradiente CH₂Cl₂/MeOH (de 0 a 5%), obteniéndose las correspondientes amidas con los rendimientos que se indican en cada ejemplo

- 5 Acoplamiento con ácido bromoacético
Ejemplo I-D2. 2-bromo-N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxi-octadec-17-in-2-il]acetamida
 Rendimiento: 72%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (d ancho, 1H); 4.21 (s, 2H); 3.90-3.70 (m, 4H); 2.03 (m, 2H); 1.85 (t, J = 2.5, 1H); 1.20-1.40 (s ancho, 24H).
 10 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 177.5; 83.5; 72.5; 69.1; 60.2; 58.4; 33.1; (29.5-28.5); 23.4; 21.3
- Ejemplo I-E2.** N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxi-tetradecan-2-il]bromoacetamida
 Rendimiento: 77%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.7 (d ancho, 1H); 4.10 (s, 2H); 3.90-3.75 (m, 4H); 3.25 (t, 2H); 1.3-1.25 (ancho, 20H).
 15 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 166.3, 74.2, 62.2, 53.9, 51.6, 42.8, 34.6, 29.6, 29.3, 28.9, 26.8, 26.0.
- Ejemplo I-F2.** N-[(2S,3R,E)-14-azido-1,3-dihidroxi-tetradec-4-en-2-il]bromoacetamida
 Rendimiento: 73%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (d ancho, 1H), 5.81 (m, 1H); 5.53 (m, 1H); 4.35 (m, 1H); 4.10 (s, 2H); 4.01 (dd, 1H); 3.90 (m, 1H), 3.73 (dd, 1H); 3.25 (t, 2H); 2.10 (m, 2H); 1.65 (m, 2H); 1.40-1.25 (s ancho, 14H).
 20 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 166.6, 134.8, 128.6, 77.5, 77.2, 76.8, 74.2, 62.0, 54.8, 51.6, 42.8, 32.4, 29.5, 29.5, 29.2, 29.2, 28.9, 26.8.
- Ejemplo I-G2.** 2-bromo-N-[(2S,3R,E)-1,3-dihidroxi-octadec-4-en-17-in-2-il]acetamida
 Rendimiento: 84%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d ancho, 1H); 5.71-5.68 (m, 2H); 4.60 (m, 1H); 3.90-3.70 (m, 3H); 2.10-1.95 (m, 4H); 1.82 (t, J = 2.5, 1H); 1.45-1.30 (m, 18H).
 25 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 177.5; 131.1; 129.7; 83.7; 72.8; 69.1; 60.0; 53.7; 34.1; (30.0-28.5); 21.4
- 30 **Ejemplo I-H2.** (S)-N-(14-azido-1-hidroxi-3-oxo-tetradecan-2-il)-2-bromoacetamida
 Rendimiento: 81%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.20 (s, 2H), 4.16 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 4.10 (dd, J = 12.0, 4.3 Hz, 2H), 3.97 (dd, J = 12.0, 3.4 Hz, 2H), 2.64 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 1.60 (dd, J = 16.4, 8.9 Hz, 9H), 1.32 (s, 34H).
 35 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 205.2, 178.5, 62.19, 60.26, 52.44, 39.62, 30.62, 30.60, 30.57, 30.52, 30.27, 30.09, 28.7, 29.4, 29.92, 27.82, 24.18.
- Ejemplo I-B2.** 2-bromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxi-octadecan-2-il)acetamida.
 Según procedimiento de síntesis descrito en la solicitud de patente WO200650264. Ejemplo 1.
- 40 Acoplamiento con ácido dibromoacético
Ejemplo I-B17. 2,2-dibromo-N-((2S,3R)-1,3-dihidroxi-octadecan-2-il)acetamida.
 Rendimiento: 77%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.23 (s, 1H), 3.80-3.70 (m, 3H), 3.65 (t ancho, 1H), 1.55 (m, 2H), 1.40-1.20 (s ancho, 26H), 0.91 (t, 3H).
 45 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 166.9, 71.9, 61.7, 57.6, 37.9, 34.9, 33.1, 30.9-30.6, 30.5, 26.6, 23.7, 14.4.
- Acoplamiento con ácido glicídico
Ejemplo I-A3. (RS)-N-[(2S,3R,E)-1,3-dihidroxi-octadec-4-en-2-il]oxirano-2-carboxamida
 Rendimiento: 77%
 50 ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d ancho, 1H); 5.69-5.67 (m, 2H); 4.62 (m, 1H); 3.80-3.60 (m, 3H); 3.50 (m, 1H); 2.90-2.60 (m, 2H); 2.01 (m, 2H); 1.33-1.26 (m, 22H); 0.85 (t, 3H).
¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 173.5, 131.1, 129.7, 73.1, 60.2, 56.2, 55.4, 48.1, 35.1, 32.2, (29.9-29.3), 22.8, 14.2.
- Ejemplo I-B3.** (RS)-N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxi-octadecan-2-il]oxirano-2-carboxamida
 Rendimiento: 79%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.10 (d ancho, 1H); 3.80-3.60 (m, 4H); 3.52 (m, 1H); 2.90-2.60 (m, 2H); 1.50 (m, 2H); 1.30-1.25 (m, 26H); 0.85 (t, 3H).
 55 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 175.5, 72.4, (59.9-59.8), 56.2, 48.4, 32.8, 31.7, (29.6-29.3), 23.4, 22.8, 14.1.
- 60 **Ejemplo I-C3.** (RS)-N-[(2S,3S,4R)-1,3,4-trihidroxi-octadecan-2-il]oxirano-2-carboxamida
 Rendimiento: 72%
¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (d ancho, 1H); 3.95-3.60 (m, 4H); 3.51 (m, 1H); 3.20 (m, 1H); 2.90-2.65 (m, 2H); 1.45 (m, 2H); 1.30-1.25 (m, 24H); 0.86 (t, 3H).
 65 ¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 172.5, 77.5, 71.2, 60.3, 56.2, 53.2, 47.6, (31.8-31.6), (29.9-29.3), 23.8, 22.6, 14.2.

Ejemplo I-D3. (RS)-N-[(2S,3R,E)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]oxirano-2-carboxamida

Rendimiento: 73%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (d ancho, 1H); 3.90-3.70 (m, 4H); 3.51 (m, 1H); 2.90-2.65 (m, 2H); 2.05 (m, 2H); 1.85 (t, J = 2.5, 1H); 1.46-1.42 (m, 4H); 1.29-1.26 (s ancho, 20H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 172.5, 83.5, 72.3, 69.1, 59.9, 59.7, 56.2, 48.2, 32.6, 23.5, 21.4, (29.9-28.5).**Ejemplo I-E3.** (RS)-N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]oxirano-2-carboxamida

Rendimiento: 79%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.15 (d ancho, 1H); 3.90-3.75 (m, 4H); 3.51 (m, 1H); 2.90-2.65 (m, 2H); 1.45-1.30 (s ancho, 22H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 173.3, 72.4, (59.9-59.8), 55.4, 51.2, 47.6, 33.1, (30.0-29.3), 26.7, 23.3.Otras reacciones de acoplamiento**Ejemplo I-B5.** N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]propiolamida

Rendimiento: 90%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.77 (d ancho, 1H), 4.23 – 4.03 (m, 1H), 3.97 – 3.70 (m, 3H), 2.72 – 2.49 (m, 2H), 1.68 – 1.41 (m, 4H), 1.23 (ancho, 24H), 0.85 (t ancho, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 145.9, 84.5, 77.8, 73.06, 59.98, 57.53, 33.91, 32.75, (29.90 - 29.58), 26.04, 22.98, 14.42.**Ejemplo I-B6.** N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]but-2-inamida

Rendimiento: 91%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.01 (d ancho, 1H), 4.23 – 4.03 (m, 1H), 3.97 – 3.70 (m, 3H), 2.72 – 2.49 (m, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.68 – 1.41 (m, 4H), 1.23 (ancho, 24H), 0.85 (t ancho, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 145.2, 91.2, 78.8, 72.0, 59.6, 58.53, 35.1, 32.9, (29.9-29.5), 26.0, 22.9, 14.3, 2.7.**Ejemplo I-B7.** N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]acrilamida

Rendimiento: 89%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.33 (d, J = 17.0, 1H), 6.17 (dd, J = 10.2, 16.9, 1H), 5.69 (d, J = 11.1, 1H), 4.16 – 3.99 (m, 1H), 3.96 – 3.71 (m, 3H), 1.68 – 1.46 (m, 4H), 1.25 (s ancho, 24H), 0.88 (t, J = 6.8, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 165.7, 131.0, 127.3, 74.5, 62.4, 54.0, 34.7, 32.1, 30.0, 29.7, 29.5, 26.3, 22.8, 14.2.**Ejemplo I-B8.** (E)-N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]but-2-enamida

Rendimiento: 86%

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.88 (dq, J = 6.7, 13.3, 1H), 6.40 (d, J = 7.6, 1H), 5.87 (d, J = 14.3, 1H), 4.04 (d ancho, 1H), 3.92 – 3.74 (m, 3H), 1.87 (d, J = 6.6, 3H), 1.70-1.46 (m, 4H), 1.25 (ancho, 24 H), 0.88 (t, J = 6.5, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CD₃OD): δ 141.0, 126.3, 72.5, 62.3, 56.9, 35.0, 33.1, 30.9, 30.8, 30.5, 26.9, 23.8, 18.0, 14.6.**Ejemplo I-B9.** N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]metacrilamida¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (ancho, 1H), 5.89 (s ancho, 1H), 5.49 (s ancho, 1H), 3.88-3.63 (m, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 1.93 (s ancho, 1H), 1.75-1.50 (m, 4H), 1.27 (ancho, 24 H), 0.85 (t, J = 6.5, 3H)¹³C-RMN (101 MHz, CD₃OD): δ 168.6, 141.3, 124.0, 72.3, 59.9, 59.8, 32.7, 31.8, 29.9-29.3, 23.4, 22.7, 14.1**Ejemplo I-B10.** N-[(2S,3R)-N-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-3-metil-2-butenamida¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.26 (ancho, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.1 (m, 1H), 3.85 (m, 3H); 2.16 (s, 3H), 1.86 (s, 3H), 1.54 (m, 2H), 1.25 (ancho, 26H), 0.88 (t, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 167.4, 151.2, 118.5, 74.3, 62.7, 53.9, 34.7, 32.0, 29.8-29.5, 27.3, 26.1, 22.8, 19.9, 14.2.**Ejemplo I-B11.** (2E,4E)-N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]hexa-2,4-dienamida¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.11 (dd, J=14.8 Hz, J'=10 Hz, 1H), 6.90 (d ancho, 1H), 6.05 (m, 2H), 5.78 (d, J=15.2 Hz, 1H), 3.95 (m, 2H), 3.62 (m, 1H), 1.78 (d, J=6Hz, 3H), 1.45 (ancho, 2H), 1.19 (ancho, 26H), 0.82 (t, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃, CD₃OD): δ 167.3, 141.7, 138.2, 129.7, 121.3, 73.3, 61.9, 54.5, 34.3, 31.9, 29.7-29.3, 26.0, 22.7, 18.5, 14.1.**Ejemplo I-B12.** Ácido (E)-4-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-ilamino]-4-oxo-2-butenóico¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.8 (ancho, 1H), 6.38 (dd ancho, 2H), 4.12 (d ancho, 1H), 3.88 (ancho, 3H), 1.45 (ancho, 2H), 1.25 (ancho, 26H), 0.87 (t, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 166.4, 166.2, 135.5, 132.5, 73.6, 61.2, 54.7, 34.5, 32.1, 29.8-29.5, 26.1, 22.8, 14.2**Ejemplo I-B13.** (Z)-2,3-dibromo-N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-4-oxo-2-butenamida¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.70 (s, 1H), 8.22 (ancho, 1H), 3.85 (m, 2H), 3.75 (m, 1H), 3.63 (m, 1H), 1.45 (m, 2H), 1.28 (ancho, 26H), 0.85 (t, 3H).¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 192.3, 166.2, 143.2, 134.5, 72.5, 60.2, 58.9, 32.8, 31.8, 29.9-29.3, 23.5, 22.6, 14.1.

Ejemplo I-B14. (2S,3R)-2-(bromometil)-N-(1,3-dihidroxi-octadecan-2-il)acrilamida

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.22 (ancho, 1H), 6.02 (d, J=2.5 Hz, 1H), 5.81 (d, J=2.5 Hz, 1H), 4.12 (s, 2H), 3.85-3.53 (m, 4H), 1.45 (m, 2H), 1.29 (ancho, 26H), 0.85 (t, 3H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 169.1, 142.5, 127.2, 71.2, 59.9, 59.7, 36.5, 33.1, 31.5, 29.9-29.1, 23.5, 22.6, 14.1.

Ejemplo I-B15. (E,2S,3R)-N-(1,3-dihidroxi-2-octadecil)-2-metil-2-butenamida

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 6.62 (ancho, 1H), 6.50 (ancho, 1H), 4.01 (m, 1H), 3.85-3.75 (m, 3H), 1.87 (s ancho, 3H), 1.77 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.54 (m, 2H), 1.25 (ancho, 26H), 0.87 (t, 3H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 169.8, 131.7, 131.6, 74.2, 62.5, 54.1, 34.6, 32.1, 29.8-29.5, 26.1, 22.8, 14.3, 14.1, 12.5.

Ejemplo I-D16. (2S,3R)-N-(1,3-dihidroxi-17-octadecin-2-il)-2-oxooctanamida

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (ancho, 1H), 3.80-3.60 (m, 4H), 2.40 (t ancho, 2H), 2.03 (m, 2H), 1.85 (t, J=2.7 Hz, 1H), 1.65 (m, 2H), 1.45 (m, 4H), 1.35-1.25 (m, 26H), 0.97 (t, 3H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 197.6, 159.9, 83.5, 72.4, 68.1, 59.9, 59.7, 32.8-31.5, 30.1-28.5, 23.5-21.5, 14.2.

Ejemplo I-E16. (2S,3R)-N-(14-azido-1,3-dihidroxi-2-tetradecil)-2-oxooctanamida

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.25 (ancho, 1H), 3.85-3.62 (m, 4H), 2.45 (t ancho, 2H), 1.60-1.45 (m, 4H), 1.35-1.25 (ancho, 26H), 0.95 (t, 3H).

¹³C-RMN (101 MHz, CDCl₃): δ 197.5, 160.2, 73.1, 59.9, 59.7, 51.2, 32.6, 32.4, 31.8, 30.0-28.5, 26.8, 23.5, 23.1, 22.9, 14.2.

Ejemplos de ensayos biológicos**Ejemplo 1. Actividad inhibidora de las ceramidasa**

La actividad inhibidora de las ceramidasa por los compuestos de la presente invención se ensayó sobre fibroblastos de un enfermo de Farber transducidos para la sobreexpresión de la ceramidasa ácida y sobre las líneas de cáncer de pulmón A549 (American Type Culture Collection) y de cáncer de próstata PC-3/Mc. La línea A549 se mantuvo en medio de HAM F12 suplementado con glutamina 2 mM, la línea de Farber se cultivó en medio DMEM y la línea PC-3/Mc se mantuvo en medio RPMI1640. En todos los casos, el medio se suplementó con un 10% de suero de feto bovino, 100 unidades/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomocina y los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂/95% aire y una humedad del 90%.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por mililitro y después de 24-48 h, el medio se eliminó y se sustituyó por medio nuevo (100 microlitros por pocillo) conteniendo el sustrato fluorogénico (Bedia et al. Chembiochem 2007, 8, 642) y el inhibidor a una concentración de 16 µM. También se puede añadir el sustrato directamente sin reemplazar el medio de cultivo. En cualquier caso, se incubó a 37 °C durante 3 horas, se procedió a la lisis de las células y se determinó la actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito (Bedia et al. Chembiochem 2007, 8, 642). En algunos casos, el inhibidor y el sustrato se añadieron conjuntamente y se incubaron durante 3 h antes de proceder a la lisis de las células.

En un ejemplo concreto se determinó el efecto inhibidor de los compuestos sobre la actividad ceramidasa ácida de las células de Farber transducidas para la sobreexpresión de la ceramidasa ácida. En este caso, las células se incubaron conjuntamente con sustrato y compuesto problema durante 3 h y después de este tiempo, se determinó la actividad enzimática tal como se describe más arriba. Tal como se ilustra en la Figura 1, los compuestos I-B2, I-B8, I-B9 y I-B17, y fueron los más activos en células intactas, aunque sólo I-B2, I-B9 y I-B17 fueron también activos *in vitro*.

En otro ejemplo concreto se determinó el efecto inhibidor de los compuestos sobre la actividad ceramidasa ácida de las células de adenocarcinoma de pulmón A549. Las células se incubaron con los compuestos problema durante 24 h y después de este tiempo se añadió el sustrato, se incubó durante 3 h y se continuó tal como se describe más arriba. Tal como se muestra en la Figura 2, los compuestos ID2, IE2 IF2 IG2 y IH2 fueron los más activos, presentando una inhibición de la ceramidasa ácida superior al 95% respecto al control.

En otro ejemplo se determinó el efecto de los compuestos I-B2, I-9B y I-B17 sobre la actividad ceramidasa ácida de las células de cáncer de próstata PC-3Mc. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células/ml y los compuestos problema se añadieron 24 horas después de la siembra. Se usaron tres dosis de cada inhibidor, 1 µM, 5 µM y 10 µM, en incubaciones durante 48 h. La Figura 3 representa gráficamente los resultados obtenidos. Los compuestos I-B17 y I-B2 causan una clara inhibición de la actividad ceramidasa ácida a todas las dosis empleadas, con mayor efecto inhibidor a mayor dosis.

Ejemplo 2. Efecto de los inhibidores sobre el ceramidoma

En estos experimentos, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000 células/ml. Los compuestos se añadieron 24 h después de la siembra y se incubaron durante distintos períodos de tiempo. Después de los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se transfirieron a viales de vidrio, donde se prepararon los extractos lipídicos siguiendo el procedimiento descrito (Merrill et al Methods, 2005, 36, 207). Los análisis se llevaron a cabo por cromatografía líquida de ultrarresolución acoplada a un detector de masas de tiempo de vuelo acelerado, que permite la identificación de los compuestos en base a su masa exacta, mediante ionización en electrospray en

modo positivo. Las condiciones cromatográficas y analíticas son las descritas en trabajos anteriores (Munoz-Olaya et al ChemMedChem, 2008, 3, 946 y Canals et al Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 235).

En un ejemplo concreto se detallan los efectos de los compuestos problema sobre la producción de ceramidas totales en la línea de cancer de pulmón A549 después de 24 h de incubación. Los resultados se ilustran en la Figura 4. Los compuestos que producen un mayor aumento de los niveles de ceramidas son ID2, IF2, IG2 y IH2, con las cuales las ceramidas son 6 veces superiores a las de las células tratadas con vehículo.

En otro ejemplo concreto se detallan los efectos de los inhibidores I-B17, I-B9 y I-B2 sobre el esfingolipidoma de la línea celular de cáncer de próstata PC-3Mc. El contenido en esfingolípidos se determinó tras 48 h de incubación con los inhibidores a dos dosis diferentes, 1 μM o 5 μM . Se determinaron niveles de ceramidas, dihidroceramidas, esfingomielinas, dihidroesfingomielinas y glucosilceramidas. La Figura 5 ilustra gráficamente los cambios en los niveles de los diferentes esfingolípidos tras incubar las células PC-3Mc con los inhibidores. Los tratamientos con I-B2 causaron, tanto a 1 μM como a 5 μM , una acumulación significativa de ceramidas y dihidroceramidas. El tratamiento con I-B17 también causó una acumulación de ceramidas y dihidroceramidas, más acusada en tratamientos con una concentración del inhibidor de 5 μM .

Ejemplo 3. Efecto de los inhibidores sobre la viabilidad celular

La citotoxicidad se determinó por medida de la actividad deshidrogenasa mitocondrial con el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) después de 24-72 h de incubación de las células con los compuestos problema a distintas concentraciones. La Figura 6A ilustra el efecto de los compuestos problema sobre la viabilidad de las células de cáncer de pulmón A549 y de fibroblastos dérmicos después de 24 h de incubación. La Figura 6B ilustra gráficamente los efectos de los inhibidores I-B17, I-B9 y I-B2 sobre la viabilidad de las células PC-3Mc después de 72 h de incubación. El análisis de la curva generada con los datos representados proporciona unos valores de CC_{50} sobre las células PC-3Mc de 13,7 μM para el compuesto I-B17, de 37,2 μM para el compuesto I-B9 y de más de 100 μM para el compuesto I-B2. Es decir, la citotoxicidad relativa de los tres compuestos es, de mayor a menor, la causada por I-B17, I-B9 y I-B2.

Ejemplo 4. Efecto de los inhibidores sobre el crecimiento celular sobre sustrato plástico.

Las células PC-3Mc, cultivadas en medio con un 10% de suero fetal bovino, fueron expuestas a los compuestos problema, a una concentración final de 5 μM . Para realizar este ejemplo, se sembraron 500 células en cada pocillo de placas de 96 pocillos, dejándose adherir al plástico durante 24 h, seguido de tratamiento con los compuestos. Cada tratamiento se realizó en pocillos triplicados. La Figura 7 ilustra gráficamente el efecto de las incubaciones con estos compuestos sobre el crecimiento celular, cuantificado como número de células presentes a las 24 h, 48 h, 72 h, 120 h, 144 h y 168 h de tratamiento con los compuestos. Los compuestos I-B17 y I-B2 causaron una casi total inhibición del crecimiento de las células PC-3Mc durante los primeros 6 días de tratamiento. Por el contrario, el compuesto I-B9 no causó diferencias significativas sobre el número de células presentes a lo largo de los 7 días del tratamiento, en comparación con células control, expuestas únicamente al disolvente utilizado para los compuestos.

Ejemplo 5. Efecto de los inhibidores sobre la formación de colonias celulares en medio semisólido.

En este ejemplo, se determinó la capacidad de las células PC-3Mc para crecer formando colonias tridimensionales en semisuspensión. En el ensayo utilizado, las células se resuspenden a temperaturas que preservan la viabilidad celular en medio de cultivo completo que contiene agar al 0,6%, dejando posteriormente solidificar a temperatura ambiente, sobre un lecho de medio con 3% de agar. Las células sembradas en esta disposición se incuban durante 2 o 3 semanas a 37 °C en una atmósfera del 5% de CO_2 / 95% aire y humedad del 90%. Una vez sembradas, se añadieron los compuestos problemas a concentraciones finales de 1 μM o 5 μM , reañadiéndolos con una periodicidad de 3 días, coincidiendo con la adición de medio de cultivo nuevo. Después de 3 semanas, las colonias se fijan con glutaraldehído al 0,5%, se tiñen con cristal de violeta y se visualizan al microscopio. Las colonias de un diámetro mayor o igual que 0.2 mm se cuentan con el programa ImageJ 1.43u (NIH, USA).

La Figura 8 ilustra cómo, a la concentración de 1 μM , ninguno de los compuestos afectó la capacidad de las células PC-3Mc para formar colonias, mientras que a 5 μM , los compuestos I-B17 y I-B2 inhiben la formación de colonias por debajo de un 25% respecto al control.

Ejemplo 6. Efecto de los inhibidores sobre la invasividad celular.

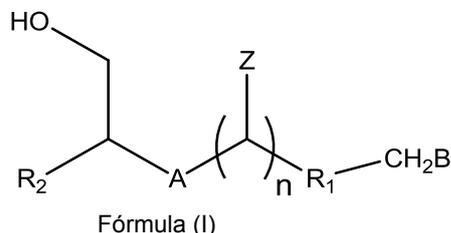
En la realización de este ejemplo, se utilizó el ensayo conocido como de invasividad en cámaras de Boyden. La versión comercial que se ha usado de estas cámaras se llama Transwell (de la casa Corning), y consiste en membranas relativamente inertes de poliéster, con poros de 8.0 μm , colocadas en un soporte plástico que se inserta en pocillos de placas de 96 pocillos. Estas membranas se recubren con componentes de la matriz extracelular (Matrigel Growth Factor Reduced, de la casa Becton-Dickinson). Las células se depositan con medio carente de suero fetal bovino en la cámara superior, y en la cámara inferior (el pocillo de la placa de 96 pocillos) se coloca el mismo medio. Se permite la invasión de las células desde la cámara superior hacia la cámara inferior durante 48 h en las condiciones habituales de cultivo descritas en anteriores ejemplos. Al cabo de esa incubación, se procede al recuento de las células que han pasado a la cámara inferior.

5 Para la realización de este ejemplo, las células PC-3Mc fueron tratadas con los compuestos problema a una concentración final de 5 μ M durante las 48 h previas al ensayo de invasividad. Tras ese tiempo de tratamiento, las células fueron despegadas de las placas de cultivo mediante incubación con tripsina (25 unidades / mL) y EDTA (0.1 mM) durante 5 minutos, resuspendidas en medio completo, y sembradas sobre las cámaras superiores de los insertos Transwell previamente cubiertos con Matrigel a una concentración de 10 mg/mL. Los compuestos problema se añadieron tanto a la cámara superior como a la inferior, a una concentración de 5 mM, manteniéndose este tratamiento a lo largo de todo el período de duración del ensayo. Cada condición se realizó por triplicado. La Figura 9 ilustra cómo, en estas condiciones, tanto el I-B17 como el I-B2 inhiben significativamente la invasividad de las células PC-3Mc.

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I)

5



o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste,

10 donde:

A se selecciona entre $-\text{CH}(\text{OH})-$ y $-\text{C}(=\text{O})-$,

Z se selecciona entre H y OH,

n es un número entero seleccionado entre 0 y 1,

R₁ se selecciona entre alquilo(C₁-C₃₀), alquenilo(C₂-C₃₀) y alquinilo(C₂-C₃₀),

15

B se selecciona entre -H, -N₃ y $-\text{C}\equiv\text{CH}$,

R₂ se selecciona entre $-\text{NHR}_3$ y maleimida, donde

R₃ se selecciona entre $-\text{COR}_4$, $-\text{COCOR}_4$ y $-\text{SO}_2\text{R}_4$, donde

R₄ se selecciona entre alquilo(C₁-C₁₆), alquenilo(C₂-C₁₆), alquinilo(C₂-C₁₆), epóxido y aziridina;

20

donde los grupos alquilo, alquenilo o alquinilo de R₁ y R₄ pueden estar, independientemente, opcionalmente sustituidos por uno o varios sustituyentes elegidos independientemente entre halógeno, OH, OR, OCF₃, NH₂, NO₂, NRR', NHCOR; CONRR, COOH, COOR, OCOR y CN, donde R y R' son alquilo o alquenilo

con la condición de que

25

a) cuando A es $-\text{CH}(\text{OH})$ y B es H, R₃ es diferente de $-\text{COR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆) sin sustituir o sustituido por halógeno o hidroxilo;

b) cuando A es $-\text{CH}(\text{OH})$, B es H, y R₃ es $-\text{COCOR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₆), R₁ es diferente de $-\text{CH}=\text{CH}_2$ -alquilo(C₁₂), $-\text{C}\equiv\text{CH}$ -alquilo(C₁₂) o alquilo(C₁₃-C₁₅); o

30

c) cuando A es $-\text{C}(=\text{O})$, R₁ es alquenilo(C₂-C₃₀), B es H y n es 0, R₃ es diferente de $-\text{COR}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆).

2.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, caracterizado porque R₁ se selecciona entre alquilo(C₁-C₃₀) y alquenilo(C₂-C₃₀)

35

3.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque n es 0.

4.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque R₃ es $-\text{CO}-\text{R}_4$ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆), y B se selecciona entre -N₃ y $-\text{C}\equiv\text{CH}$.

40

5.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 4, caracterizado porque R₄ es un alquilo(C₁-C₁₆) sustituido con al menos un átomo de halógeno.

6.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 5, caracterizado porque R₄ es un alquilo(C₁-C₁₆) sustituido con al menos un átomo de flúor o bromo.

45

7.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizado porque A es $-\text{C}(=\text{O})$.

8.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque R₃ es $-\text{CO}-\text{R}_4$ siendo R₄ epóxido.

50

9.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque R₃ es $-\text{CO}-\text{R}_4$ siendo R₄ epóxido, n es 1 y Z es OH.

10.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque R₃ es $-\text{CO}-\text{R}_4$ y R₄ se selecciona entre alquenilo(C₂-C₁₆) y alquinilo(C₂-C₁₆).

55

11.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 10, caracterizado porque R₄ es un alquenilo(C₂-C₁₆) sustituido con al menos un átomo de halógeno.

- 12.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 11, caracterizado porque R₄ es un alquenoilo(C₂-C₁₆) sustituido con al menos un átomo de flúor o bromo.
- 5 13.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque R₄ es un alquenoilo(C₂-C₁₆) o alquinoilo(C₂-C₁₆) sustituido con al menos un grupo -CHO o -COOH.
- 14.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque R₃ es -CO-CO-R₄ siendo R₄ alquilo(C₁-C₁₆) y B se selecciona entre -N₃ y -C≡CH.
- 10 15.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque R₃ es -SO₂-R₄, donde R₄ se selecciona entre alquilo(C₁-C₁₆), alquenoilo(C₂-C₁₆), alquinoilo(C₂-C₁₆), epóxido y aziridina.
- 16.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 15, caracterizado porque R₄ es alquilo(C₁-C₁₆).
- 15 17.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque R₃ es -SO₂-R₄, donde R₄ se selecciona entre alquilo(C₁-C₁₆), alquenoilo(C₂-C₁₆), alquinoilo(C₂-C₁₆), epóxido y aziridina, n es 1 y Z es OH.
- 20 18.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 17, caracterizado porque R₄ es alquilo(C₁-C₁₆).
- 19.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque R₂ es maleimida.
- 20.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de la lista que consiste en:
- 25 1-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-1H-pirrol-2,5-diona,
N-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il]etanosulfonamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]etanosulfonamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]etanosulfonamida,
30 *N*-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]etanosulfonamida,
2-bromo-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]acetamida,
N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]bromoacetamida,
N-[(2S,3R,*E*)-14-azido-1,3-dihidroxitetradec-4-en-2-il]bromoacetamida,
2-bromo-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]acetamida,
35 (*S*)-*N*-(14-azido-1-hidroxi-3-oxotetradecan-2-il)-2-bromoacetamida,
(*RS*)-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-2-il]oxirano-2-carboxamida,
(*RS*)-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]oxirano-2-carboxamida,
(*RS*)-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]oxirano-2-carboxamida,
(*RS*)-*N*-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]oxirano-2-carboxamida,
40 *N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]propiolamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]but-2-inamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]acrilamida,
(*E*)-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-2-butenamida,
N-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]metacrilamida,
45 *N*-[(2S,3R)-*N*-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-3-metil-2-butenamida,
(2*E*,4*E*)-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]hexa-2,4-dienamida,
Ácido (*E*)-4-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-ilamino]-4-oxo-2-butenico,
(*Z*)-2,3-dibromo-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadecan-2-il]-4-oxo-2-butenamida,
(2S,3R)-2-(bromometil)-*N*-(1,3-dihidroxiocetadecan-2-il)acrilamida,
50 (*E*,2S,3R)-*N*-(1,3-dihidroxi-2-octadecil)-2-metil-2-butenamida,
(2S,3R)-*N*-(1,3-dihidroxi-17-octadecin-2-il)-2-oxooctanamida y
(2S,3R)-*N*-(14-azido-1,3-dihidroxi-2-tetradecil)-2-oxooctanamida,
o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.
- 55 21.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 20, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de la lista que consiste en:
- 2-bromo-*N*-[(2S,3R)-1,3-dihidroxiocetadec-17-in-2-il]acetamida,
N-[(2S,3R)-14-azido-1,3-dihidroxitetradecan-2-il]bromoacetamida,
N-[(2S,3R,*E*)-14-azido-1,3-dihidroxitetradec-4-en-2-il]bromoacetamida,
60 2-bromo-*N*-[(2S,3R,*E*)-1,3-dihidroxiocetadec-4-en-17-in-2-il]acetamida y
(*S*)-*N*-(14-azido-1-hidroxi-3-oxotetradecan-2-il)-2-bromoacetamida,
o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.
- 22.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque dicho compuesto se selecciona de la lista que consiste en:
- 65

N-[(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihidroxiocadecan-2-il]etanosulfonamida y
(*RS*)-*N*-[(2*S*,3*S*,4*R*)-1,3,4-trihidroxiocadecan-2-il]oxirano-2-carboxamida,
o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos.

- 5 23.- Composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula general (I) o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de éste tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 24.- Un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos, para utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular.
- 15 25.- Una composición tal como se define en la reivindicación 23 o una composición que comprende un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos y al menos un excipiente, para utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad que cursa con hiperproliferación celular.
- 20 26.- Un compuesto según la reivindicación 24 o una composición según la reivindicación 25, para utilizar en el tratamiento o prevención de una enfermedad cursada con hiperproliferación celular elegida entre cáncer, metástasis, inflamación, asma y arteriosclerosis.
- 25 27.- Un compuesto o una composición según la reivindicación 26, para utilizar en el tratamiento de un tipo de cáncer elegido entre cáncer de próstata, de páncreas, de cerebro, de colon, de pulmón, de mama, de cabeza y cuello, de ovario, de laringe, de vejiga urinaria, de útero, de piel, sarcomas, linfomas y leucemia.
- 30 28.- Un compuesto o una composición según la reivindicación 27, para utilizar en el tratamiento de un tipo de cáncer elegido entre cáncer de próstata y cáncer de pulmón.
- 35 29.- Un compuesto de fórmula general (I) tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 o un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos, para utilizar en combinación con otra terapia para el tratamiento de una enfermedad tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 24, 26 a 28.
- 40 30.- Una composición tal como se define en la reivindicación 23 o una composición que comprende un compuesto elegido entre 2,2-dibromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida y 2-bromo-*N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihidroxiocadecan-2-il)acetamida o un estereoisómero, una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de uno de estos compuestos al menos un excipiente, para utilizar en combinación con otra terapia para el tratamiento de una enfermedad tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 25, 26 a 28.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131119

②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.07.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 1580187 A1 (DEIGNER, HANS-PETER) 28.09.2005, tablas, páginas 3-5.	1-30
A	WO 200172701 A1 (THE LIPOSOME COMPANY, INC) 04.10.2001, resumen; página 4.	1-30
A	SZULC, Z.M. et al.: "Tailoring structure-function and targeting properties of ceramides by site-specific cationization". Bioorganic & Medicinal chemistry, 2006, vol. 14, páginas 7083-7104, todo el documento.	1-30
A	PARK, J. et al.: "Divergent syntheses of all stereoisomers of phytosphingosine and their use in the construction of a ceramide library". Bioorganic chemistry, 2008, vol. 36, páginas 220-228, todo el documento.	1-30

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
24.09.2012

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C233/18 (2006.01)

C07C311/04 (2006.01)

A61K31/164 (2006.01)

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

C07C, 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, NPL, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-30	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-30	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 1580187 A1 (DEIGNER, HANS-PETER)	28.09.2005
D02	WO 200172701 A1 (THE LIPOSOME COMPANY, INC)	04.10.2001
D03	SZULC, Z.M. et al.: "Tailoring structure-function and targeting properties of ceramides by site-specific cationization". Bioorganic & Medicinal chemistry, 2006, vol. 14, páginas 7083-7104, todo el documento.	
D04	PARK, J. et al.: "Divergent syntheses of all stereoisomers of phytosphingosine and their use in the construction of a ceramide library". Bioorganic chemistry, 2008, vol. 36, páginas 220-228, todo el documento.	

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 compuestos de fórmula I que son amidas de 2-amino-1,3 propanodiolos, composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso como inhibidores de ceramidasa en enfermedades que cursan con hiperproliferación celular tales como cáncer, metástasis, inflamación, asma y arterioesclerosis

Los documentos D1-D4, se refieren todos ellos a derivados de ceramidas y se cita su actividad antiproliferativa, su utilización en la apoptosis, y en respuestas inflamatorias.

Ninguno de los documentos citados se refiere específicamente a los compuestos reivindicados en la presente solicitud.

Por lo tanto, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-30 de la presente solicitud presenta novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.