



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 289 853**

② Número de solicitud: 200500370

⑤ Int. Cl.:  
**A61K 31/7008** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **18.02.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2008**

Fecha de la concesión: **26.11.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2009**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.02.2009**

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

⑱ Inventor/es: **Llebaria Soldevila, Amadeo;  
Casas Brugulat, Josefina;  
Egido Gabas, Meritxell;  
Delgado Cirilo, Antonio y  
Serrano Navarro, Pedro**

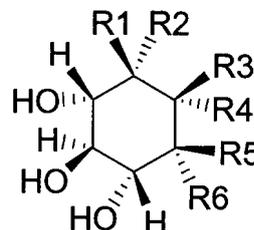
⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Ciclohexano hexasustituido activador de la enzima beta-glucosidasa, procedimiento de síntesis, composición farmacéutica que lo contiene y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Ciclohexano hexasustituido activador de la enzima beta-glucosidasa, procedimiento de síntesis, composición farmacéutica que lo contiene y sus aplicaciones.

Un objeto de la invención lo constituye un compuesto modulador de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, preferentemente activador, caracterizado porque es un ciclohexano hexasustituido de fórmula general I. Este compuesto activador puede ser utilizado para la fabricación de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y el cáncer. La ventaja de este compuesto es su alta especificidad por la enzima responsable de la enfermedad de Gaucher, y la posibilidad de administrarlo conjuntamente con la enzima beta-glucosidasa recombinante sustitutiva con el consiguiente gran ahorro económico.



ES 2 289 853 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Ciclohexano hexasustituido activador de la enzima beta-glucosidasa, procedimiento de síntesis, composición farmacéutica que lo contiene y sus aplicaciones.

5

**Sector de la técnica**

La presente invención es de interés para el sector farmacéutico. Se refiere a unos nuevos compuestos farmacéuticos derivados de ciclohexanos hexasustituidos como moduladores de la actividad de las glucosidasas y, más concretamente de la beta-glucosidasa asociada a la enfermedad de Gaucher.

10

**Estado de la técnica**

El lisosoma es un orgánulo clave en el catabolismo y reciclaje de las macromoléculas en la célula. A consecuencia de defectos en diferentes enzimas lisosomales se acumulan sus sustratos y compuestos estructuralmente relacionados en el interior de los lisosomas, ocasionando las enfermedades genéticas de acúmulo lisosomal (Winchester B.G. *Lysosomal Metabolism of Glycoconjugates*. En *Subcellular Biochemistry* Vol 27 Cap. 7 p191-238 Plenum Press 1996; Futerman AH; Van Meer G. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5, 554-65, 2004). Las enfermedades lisosomales conforman un grupo de más de 40 trastornos metabólicos hereditarios, la mayoría autosómicas recesivas, en las que la distribución específica en los tejidos de los compuestos no degradados se manifiesta con una amplia heterogeneidad fenotípica. Los síntomas clínicos incluyen organomegalias, lesiones óseas, oculares y dermatológicas y, en general, presentan un curso neurodegenerativo severo. Aunque su aparición puede tener lugar a cualquier edad, son enfermedades mayoritariamente de presentación infantil, incluso intraútero, con fallecimiento prematuro.

15

20

En general las estrategias terapéuticas se han basado en tratar de suministrar o incrementar los niveles enzimáticos para compensar el defecto primario mediante el trasplante de médula ósea y, más recientemente, mediante transferencia génica. La gran mortalidad y dificultades del trasplante y los escasos resultados hasta ahora de la terapia génica han hecho que los esfuerzos terapéuticos se focalizarán en opciones como la terapia de sustitución enzimática desarrollada desde 1991 para los pacientes con la enfermedad de Gaucher (EG), que destaca entre las enfermedades lisosomales por su incidencia (Futerman *et al.* *Trends Pharm. Sci.* 25: 147-151, 2004). Esta enfermedad se origina por la existencia de mutaciones en el gen que codifica el enzima lisosomal glucosilceramida hidrolasa (también conocido por glucocerebrosidasa) que reducen su actividad resultando en la acumulación del glicolípido glucosilceramida en los lisosomas. El enzima es una  $\beta$ -glucosidasa de la que recientemente se ha determinado su estructura tridimensional (Dvir *et al* *EMBO Rep.* 4: 1-6, 2003). La EG es la enfermedad lisosomal más frecuente, especialmente su variante clínica no neurológica (tipo 1). Además de la mayoritaria tipo 1, la enfermedad puede presentar formas neuropáticas aguda, de presentación infantil (tipo 2) y subaguda, juvenil (tipo 3). La EG es una glucoesfingolipidosis debida a la deficiencia de glucocerebrosidasa (EC.3.2.1.45) que ocasiona el acúmulo del esfingolípido glucosilceramida (Glc-Cer) en los macrófagos de bazo, pulmón y huesos (tipos 1, 2 y 3) y en el sistema nervioso central (SNC) (tipos 2 y 3) de los pacientes. La introducción en 1991 de la terapia de sustitución enzimática ha sido claramente beneficiosa en los más de 3000 pacientes con el tipo 1 de la EG tratados hasta la fecha, y se ha consolidado como modelo de tratamiento para otras glucoesfingolipidosis a pesar de su enorme coste económico (enzima obtenida a partir de placenta - alglucerasa - o por técnica recombinante - imiglucerasa). Sin embargo, su eficacia es prácticamente nula para los pacientes con afectación neurológica ya que el paso del enzima al SNC está restringido por la barrera hematoencefálica.

25

30

35

40

45

50

Por ello, en estos últimos años se han explorado nuevas estrategias terapéuticas para la EG basadas en el empleo de moléculas pequeñas, mediante la terapia de reducción de sustrato y, muy recientemente, la terapia mediada por chaperonas químicas. La terapia de reducción de sustrato se basa en tratar de equilibrar la síntesis del Glc-Cer con su degradación alterada empleando inhibidores de la glucosilceramida sintasa, el enzima que controla la primera etapa en la biosíntesis del Glc-Cer como precursor de otros glucoesfingolípidos neutros más complejos y de los gangliósidos (Platt F, Neises GR, Dwek R, Butters T. *J Biol Chem* 269: 8362-8365, 1994). El N-alkuil-iminoazúcar N-butil-desoxinjirimicina (NB-DNJ, OGT918) es un inhibidor de esta enzima glucosilceramida sintasa y en la actualidad se está administrando terapéuticamente a pacientes con el tipo 1 de la EG (Pastores G, Barnett N. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12: 273-281, 2003).

55

60

65

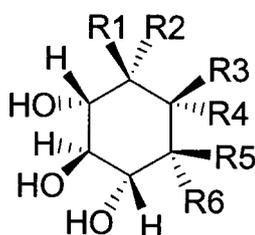
La terapia mediada por chaperonas químicas es de introducción muy reciente y se fundamenta en los trabajos iniciales sobre la enfermedad de Fabry (Fan JQ, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. *Nature Medicine* 5: 112-115, 1999), otra glucoesfingolipidosis lisosomal. Estos autores proponen que la actividad enzimática deficitaria en esta enfermedad se estimula *in vitro* hasta niveles significativos mediante el empleo de compuestos de bajo peso molecular que actuarían como chaperonas químicas y facilitarían el procesamiento del enzima. De hecho, se ha observado en varias enfermedades lisosomales que valores de actividad enzimática residual entre el 10 y 15% de los niveles normales permiten un adecuado recambio celular (Conzelmann E, Sandhoff K. *Dev. Neuroscience* 6: 58-71, 1983). Por lo tanto, un pequeño incremento en la actividad tendría un efecto significativo en el desarrollo de la enfermedad. Este ejemplo, constituye una aproximación terapéutica novedosa del uso de chaperonas químicas (T. Kolter, M. Wendeler, *ChemBioChem* 4: 260-4, 2003; D.H. Perlmutter, *Pediatric Res.* 52: 832-6, 2002). Se basa en la interacción de la proteína con moléculas orgánicas pequeñas que asisten al plegamiento correcto de la misma mediante una unión no covalente del tipo ligando-proteína, que operarían de manera análoga a las chaperonas proteicas (Morello *et al.*, *Trends Pharm. Sci.* 21: 466-9, 2000). El plegamiento es un proceso dinámico y por ello algunos enzimas mutados pueden alcanzar parcialmente un plegamiento correcto con lo que serían procesados y retendrían una actividad residual. Se ha sugerido que en las en-

fermedades debidas a mutaciones de cambio de sentido, e incluso las debidas a pequeñas deleciones/inserciones, sus efectos pudieran modificarse con cambios que favorezcan el plegamiento correcto de la proteína (Bross *et al.*, Hum Mutat 14: 186-189, 1999) En este sentido, los inhibidores competitivos enzimáticos a concentraciones sub-inhibidoras se comportarían como chaperonas debido a su elevada especificidad por el centro activo (Fan, J.-Q. Trends Pharm. Sci. 24, 355-60, 2003; patente US20030119874 de Fan, J.-Q *et al.* Method for enhancing mutant enzyme activity in Gaucher disease) resultando en un incremento de la actividad enzimática. Por lo tanto, este tipo de inhibidores tendría dos funciones antagónicas: como inhibidores a concentraciones elevadas y como estimuladores de la actividad enzimática a concentraciones sub-inhibidoras.

10 Anomalías en el proceso para adquirir la conformación funcional se han ligado a mutaciones concretas en la fibrosis quística, en la mayoría de las variantes de la deficiencia de alfa-1-antitripsina y en varios trastornos metabólicos como la enfermedad de Gaucher y otras enfermedades lisosomales. Respecto a este grupo de enfermedades los estudios realizados hasta la fecha se refieren a la enfermedad de Fabry, con ensayos sobre dos mutaciones concretas en cultivos de linfoblastos humanos y en un modelo murino (Fan J-Q, Ishii S, Asano N, Suzuki Y. Nature Medicine 5: 112-115, 1999; Asano N, Ishii S, Kizu H, Yasuda K, Kato A, Martin Ol, Fan J-Q. *In vitro* inhibition and intracellular enhancement of lysosomal alpha-galactosidase A activity in Fabry lymphoblasts by 1-deoxygalactonojirimycin and its derivatives. Eur. J. Biochem 267: 4179-4186, 2000) y en el tratamiento de un paciente con afectación cardiaca (Frustaci A, Chimenti C, Ricci R, Natale L, Russo M, Pieroni M, Eng C, Desnick R. N Engl J Med 345: 25-32, 2001) y a la gangliosidosis GM1, con un trabajo sobre una mutación determinada también en un modelo murino (Matsuda J, Suzuki O *et al.* PNAS 100: 15912-15917, 2003). Para la enfermedad de Gaucher existen aproximaciones basadas en el uso de desoxinojirimicina y compuestos relacionados - inhibidores de la glucocerebrosidasa - (Sawkar AR Cheng W-C, Beutler E, Wong C-H, Balch WE, Kelly JW. PNAS 99: 15428-15433, 2002) que se describen por ejemplo en las patentes US20030119874 (Fan, Jian-Qiang *et al.* (2003) Method for enhancing mutant enzyme activity in Gaucher disease) y, en combinación con el enzima glucocerebrosidasa (US2002127213, Jacob, *et al.* Combination drug therapy for glycolipid storage diseases) si bien son compuestos distintos a los de la fórmula general I, aquí descritos. Si bien como se ha comentado anteriormente los compuestos derivados de desoxinojirimicina son inhibidores de la glucosilceramida sintasa y de la glucocerebrosidasa además inhiben otras enzimas como  $\alpha$ -glucosidasa (Overkleeft, H.D. *et al.*, JBC, 273: 26522-26527, 1998) por lo que su uso no presenta una alta selectividad.

### 30 Explicación de la invención

Un objeto de la presente invención lo constituye un compuesto modulador de la enzima  $\beta$ -glucosidasa caracterizado porque es un ciclohexano hexasustituido de fórmula general I,



45 donde

- R1 y R2 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH

50 - R3 y R4 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

- R5 y R6 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>

55 - R7, R8, R9 y R10 son iguales o diferentes entre sí y pueden o no formar un ciclo y se seleccionan entre el conjunto integrado por:

i) Hidrógeno,

60 ii) un radical alquilo, alquenoilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición, o

65 iii) Un radical -CN, -C(=O)R<sup>11</sup>, -C(=S)R<sup>11</sup>, C(=NR<sup>12</sup>)R<sup>11</sup> o -C(=NR<sup>12</sup>)R<sup>11</sup>, -S(=O)R<sup>11</sup>, SO<sub>2</sub>-R<sup>11</sup> donde R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> pueden ser iguales o distintos entre sí, pueden o no formar un ciclo y se seleccionan de entre los siguientes grupos:

iii.i Hidrógeno

## ES 2 289 853 B1

iii.ii cualquier radical alquilo, alqueniilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición.

5 iv) un grupo  $-(C=XR^{13})-Y-R^{14}$  donde X puede ser O, S ó N; Y puede ser O, S, NH; donde  $R^{13}$  y  $R^{14}$  pueden ser iguales o diferentes entre sí, y pueden o no formar un ciclo y se seleccionan entre los siguientes grupos:

iv.i Hidrógeno

10 iv.ii Cualquier radical alquilo, alqueniilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición.

v) Fenetilo

15 Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de síntesis de los compuestos moduladores de la invención que comprende las siguientes etapas:

20 a) obtención de los productos de apertura en forma de ciclohexanopoliolos mediante la reacción de un epoxi-ciclohexano con nucleófilos o haluros adecuados,

b) Transformación de los ciclohexanopoliolos en otros intermedios de síntesis mediante reacciones de sustitución, alquilación o acilación de la función nitrogenada, y finalmente

25 c) la obtención del ciclohexanopoliol mediante una reacción de desbencilación.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de los compuestos moduladores de la invención para la fabricación de una composición farmacéutica moduladora de la enzima beta-glucosidasa útil para el tratamiento y profilaxis de enfermedades humanas.

30 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento moduladora de la actividad de la enzima beta-glucosidasa que comprende un compuesto modulador de la invención en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

35 Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención moduladora de la actividad de la enzima beta-glucosidasa en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad humana, preferentemente la enfermedad de Gaucher y el cáncer.

### 40 Breve descripción del contenido de las figuras

Figura 1.- Esquema de síntesis de compuestos de fórmula I por adición de nucleófilos X ó Y a epoxi-ciclohexanos conteniendo grupos hidroxilo o hidroximetilo y su posible resultado estereoquímico.

45 Figura 2.- Epóxidos utilizados como productos de partida en la preparación de compuestos de tipo I.

Figura 3.- Esquema de síntesis de compuestos de tipo I por adición de nucleófilos X o Y a epóxidos totalmente bencilados y su resultado estereoquímico.

50 Figura 4.- Esquema de síntesis de compuestos de tipo I conteniendo dos grupos nitrogenados X, Y a partir de epóxidos totalmente bencilados.

Figura 5.- *Efecto activador de (1R,2S,3S,4R,5S,6S) 6-fenitilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol sobre la glucosilceramida hidrolasa de la enfermedad de Gaucher (Imiglucerasa)*. En el panel superior se muestra el porcentaje de actividad Imiglucerasa, respecto a tiempo cero, de incubaciones realizadas a 45°C a diferentes tiempos, en ausencia (control) o presencia del producto a tres concentraciones (0.05, 0.1, 0.15 mM). En el panel inferior se muestra el efecto activador del compuesto en condiciones de desnaturalización térmica y se presenta como el cociente de los porcentajes de actividad a diferentes concentraciones de compuestos y los del control, a diferentes tiempos (representados en la gráfica superior).

60 Figura 6.- *Efecto activador de (1R,2S,3S,4R,5S,6S) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol sobre la glucosilceramida hidrolasa de la enfermedad de Gaucher (Imiglucerasa)*. En el panel superior se muestra el porcentaje de actividad Imiglucerasa, respecto a tiempo cero, de incubaciones realizadas a 45°C a diferentes tiempos, en ausencia (control) o presencia del producto a tres concentraciones (0.05, 0.1, 0.15 mM). En el panel inferior se muestra el efecto activador del compuesto en condiciones de desnaturalización térmica y se presenta como el cociente de los porcentajes de actividad a diferentes concentraciones de compuestos y los del control, a diferentes tiempos (representados en la gráfica superior).

**Descripción detallada de la invención**

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos compuestos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades humanas que cursan con alteraciones en la actividad de la enzima beta-glucosidasa.

5

La invención se basa en que los inventores han observado que los compuestos ciclohexanos hexasustituidos de fórmula general I a bajas concentraciones son activadores y estabilizadores de la enzima beta-glucosidasa, y más preferentemente de la enzima beta-glucosidasa asociada a la enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa lisosomal). A concentraciones elevadas, estos compuestos ciclohexanos hexasustituidos de fórmula general I son inhibidores selectivos del enzima, tal y como se ha descrito anteriormente para otros casos de compuestos útiles como chaperonas químicas. En la Tabla I se describe el efecto de varias realizaciones concretas de estos compuestos sobre la actividad de algunos enzimas glicosidasas y se aprecia la potencia y selectividad de los efectos inhibidores de dichos compuestos sobre la beta-glucosidasa asociada a la enfermedad de Gaucher (D y E). Ninguno de los compuestos descritos en el Ejemplo 24 inhibe la enzima alfa-galactosidasa (cuya alteración y deficiencia se encuentra en la enfermedad de Faber y en la enfermedad de Pompe, respectivamente).

10

Algunos compuestos que quedan englobados en la fórmula general I son inhibidores específicos e irreversibles de la glucocerebrosidasa lisosomal y de la imiglucersa. En la Tabla II se muestra la efectividad inhibidora de algunos de ellos y que es comparable a la descrita para el epóxido de condurito. Este compuesto se ha empleado para obtener modelos animales de Gaucher, ya que su tratamiento conduce a animales con problemas neurológicos y formación de células tipo Gaucher en hígado y bazo.

20

Además, los compuestos de fórmula I de la presente invención no actúan sobre la actividad de la enzima glucosilceramida sintasa (ver Ejemplo 26) lo que representa una ventaja sobre la inespecificidad del compuesto desoxinojirimicina (DNJ) y sus derivados.

25

Por otro lado, a dosis menores, y cuando el ensayo se lleva a cabo en condiciones de baja actividad del enzima, o en condiciones de desnaturalización, se ha comprobado que algunos compuestos de fórmula general I conducen a un incremento de la actividad del mismo, debido a un efecto estabilizador sobre la proteína, por lo que dichos compuestos actúan como chaperonas químicas del enzima y se pueden utilizar para mantener y aumentar la actividad hidrolítica del mismo. En las Figuras 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos de la medida del efecto estabilizador de dos compuestos de fórmula general I - 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol y 6-fenilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol - sobre la glucocerebrosidasa asociada a la enfermedad de Gaucher, que se ha llevado a cabo en condiciones similares a las descritas por Sawkar (Sawkar *et al.* *PNAS* 99: 15428-15433, 2002). Puede observarse en la parte superior de las Figuras 5 y 6 como la pérdida de actividad es menor en presencia de los compuestos utilizados, lo que constituye una prueba de la capacidad de dichos compuestos para actuar como chaperona química del enzima. En la parte inferior de las Figuras 5 y 6, se observa el incremento de actividad del enzima tratado con los compuestos de fórmula general I indicados frente al enzima no tratado en condiciones de desnaturalización térmica.

30

35

Por otra parte, puesto que la enzima beta-glucosidasa provoca la hidrólisis de glucosilceramida a ceramida, la activación de dicho enzima resulta en una producción aumentada de dicho lípido, que se conoce provoca una inducción de apoptosis celular (Gulbins, E. *Pharmacol. Res.* 47: 393, 2003) y, por consiguiente, puede ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades asociadas a la hiperproliferación celular. La ceramida es un importante transmisor lipídico (Hannun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 3125, 1994; Merrill, A.H. *Nutr. Rev.* 50: 78, 1992; Kolesnick F. *J. Exp. Med.* 181: 1949, 1995). Existen una serie de agentes extracelulares y de estrés, algunos fármacos utilizados en quimioterapia, las radiaciones ionizantes, etc., que provocan un aumento de los niveles endógenos de ceramida (Hannun *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269: 3125, 1994; Hannun y 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 y Watson, *FEBS Lett.* 314: 297, 1992; Dressler y Kolesnick, *Science* 255: 1715, 1992). La ceramida intracelular generada interviene como mediador, en respuesta a estos estímulos externos, en importantes procesos, tales como la diferenciación celular, la apoptosis, la supresión del crecimiento celular, etc. En este sentido, se ha demostrado que algunos análogos exógenos de la ceramida son capaces de provocar estos mismos efectos en distintos tipos de células (Hannun *et al.* *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; Laulerkind *et al.* *J. Exp. Med.* 182: 599, 1995).

40

45

50

55

Por otro lado, algunos de los efectos originados por la ceramida se han podido conseguir mediante manipulación del metabolismo de la misma (Okazaki *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264: 19076, 1989; Mathias *et al.*, *Science* 259: 519, 1993; Abe *et al.*, *J. Biochem. (Tokyo)* 111: 191, 1992). Existen varias enfermedades, como el cáncer, que derivan o están asociadas a una hiperproliferación celular por disminución de los niveles de ceramida y consiguiente pérdida de capacidad de apoptosis. Por lo tanto, el desarrollo de moléculas capaces de modular las actividades de las enzimas implicadas en la metabolización o biosíntesis de la ceramida constituye una aproximación al descubrimiento de nuevos fármacos, por lo que los compuestos descritos en la presente invención son susceptibles de uso terapéutico en dichas patologías.

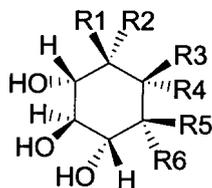
60

65

En resumen, los compuestos de la invención son capaces de actuar como chaperonas químicas sobre la beta-glucosidasa asociada a la enfermedad de Gaucher, al igual que los derivados de la desoxinojirimicina, pero presentan la ventaja de su selectividad respecto a la inhibición de otros enzimas (los derivados *N*-alquilados de la desoxinojirimicina son potentes inhibidores de la Glucosilceramida sintasa (Mellor *et al.* *Biochem. J.* 381: 861-866, 2004).

## ES 2 289 853 B1

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un compuesto modulador de la enzima beta-glucosidasa, en adelante compuesto modulador de la presente invención, caracterizado porque es un ciclohexano hexasustituido de fórmula general I,



donde

- R1 y R2 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH

- R3 y R4 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

- R5 y R6 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>

- R7, R8, R9 Y R10 son iguales o diferentes entre sí y pueden o no formar un ciclo y se seleccionan entre el conjunto integrado por:

i) Hidrógeno,

ii) un radical alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición, o

iii) Un radical -CN, -C(=O)R<sup>11</sup>, -C(=S)R<sup>11</sup>, C(=NR<sup>12</sup>)R<sup>11</sup> o -C(=NR<sup>12</sup>)R<sup>11</sup>, -S(=O)R<sup>11</sup>, SO<sub>2</sub>-R<sup>11</sup> donde R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> pueden ser iguales o distintos entre sí, pueden o no formar un ciclo y se seleccionan de entre los siguientes grupos:

iii.i Hidrógeno

iii.ii cualquier radical alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición.

iv) un grupo -(C=XR<sup>13</sup>)-Y-R<sup>14</sup> donde X puede ser O, S ó N; Y puede ser O, S, NH; donde R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> pueden ser iguales o diferentes entre sí, y pueden o no formar un ciclo y se seleccionan entre los siguientes grupos:

iv.i Hidrógeno

iv.ii Cualquier radical alquilo, alquenilo o alquinilo, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición.

v) Fenetilo

Un objeto particular de la invención lo constituye un compuesto modulador de la invención caracterizado porque es un activador de la enzima beta-glucosidasa.

Una realización particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el compuesto activador es el compuesto 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

Otra realización particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el compuesto activador es el compuesto 6-fenetilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

Por otro lado, algunos de los compuestos moduladores de la presente invención pueden tener uno o más centros quirales. 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 por un experto en este sector de la técnica mediante alguno de los procedimientos comúnmente empleados, por ejemplo, por resolución de la mezcla racémica mediante técnicas de recristalización, síntesis quiral, resolución enzimática, biotransformación o resolución cromatográfica.

## ES 2 289 853 B1

Además, algunos de los compuestos de fórmula I de la presente invención pueden existir como formas no solvatas o como solvatos, por ejemplo como hidratos. Algunos de los compuestos de fórmula general I pueden presentar polimorfismo, es decir, formas cristalinas distintas de un idéntico compuesto, comprendiendo esta invención todas las formas polimórficas posibles. La presente invención comprende todas las formas anteriormente citadas que sean farmacéuticamente activas.

Por tanto, otra realización particular de la invención lo constituye un compuesto de la invención en el que el compuesto activador es un estereoisómero, un polimorfismo, un solvato, una sal de adición farmacéuticamente aceptable, o una mezcla de cualquiera de los compuestos de fórmula general I.

Por otro lado, los compuestos moduladores de la presente invención pueden ser preparados por un experto en la materia siguiendo métodos generales descritos en la literatura y con la información suministrada en la presente invención que se resumen en las Figuras 1 a 4.

Así, otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de síntesis de los compuestos moduladores de la invención, en adelante procedimiento de síntesis de la presente invención, que comprende las siguientes etapas:

- a) obtención de los productos de apertura en forma de ciclohexanopoliolos mediante la reacción de un epoxi-ciclohexano con nucleófilos o haluros adecuados,
- b) Transformación de los ciclohexanopoliolos en otros intermedios de síntesis mediante reacciones de sustitución, alquilación o acilación de la función nitrogenada, y finalmente
- c) la obtención del ciclohexanopoliol mediante una reacción de desbencilación.

Por otro lado, el epoxiciclohexano de partida puede reemplazarse por una ciclohexanoaziridina, que sometida a las tres etapas indicadas conduce igualmente a compuestos de fórmula general I (ver ejemplo 19, 20, 21 y 22). Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de síntesis de la invención en el cual en la etapa a) de obtención de ciclohexanopoliolos, opcionalmente, el epoxiciclohexano de partida se substituye por una ciclohexanoaziridina.

Algunos de los compuestos de partida de tipo epóxido representados en la Figura 1 son productos conocidos, que pueden ser preparados siguiendo métodos análogos a los que se detallan en diversas publicaciones. Por ejemplo el compuesto II-A se prepara según descrito por Ishikawa (Ishikawa, T. *et al.*, *Org. Lett.* 5: 3879-82, 2003) o bien por Trost (Trost B.M. *et al Chem. Eur. J.* 7: 3768-3775, 2001). Mientras que el compuesto III se puede obtener según Jaramillo (Jaramillo C. *et al. J. Org. Chem.* 59: 3135-41, 1994).

El compuesto II-B se describe por primera vez en la presente invención y se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento.

Dichos compuestos de tipo epoxiciclohexano pueden hacerse reaccionar (etapa a)) de manera selectiva empleando diversos métodos descritos en la literatura pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- a) nucleófilos de nitrógeno, tales como azidas metálicas, aminas, sales de amidas o carbamatos, sales de ftalimida,
- b) nucleófilos de oxígeno tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles o sus sales, y
- c) haluros metálicos o derivados halogenados.

Dependiendo de las condiciones empleadas, se pueden obtener diferentes regioisómeros de la apertura de los epóxidos. Por ejemplo, cuando se usan por ejemplo aminas o azida sódica como nucleófilos, en presencia de diferentes activadores metálicos tales como sales de litio siguiendo el método descrito en Calvani, F. *et al* (Calvani, F. *et al Tetrahedron* 50: 12999-13022, 1994) o, alternativamente, sales de Iterbio tal como se detalla en Serrano, P. *et al* (Serrano, P. *et al. J. Org. Chem.* 67: 7165-7, 2002), los epóxidos II-A, II-B proporcionan selectivamente los productos IV-A y IV-B donde X es azida o amina. En el caso de utilizar el epóxido III los productos obtenidos son del tipo VI, donde X es igual a N<sub>3</sub> o amina en el caso de usar azida sádica o una amina como nucleófilos. Cuando la reacción de los epóxidos II-A, II-B a III se lleva a cabo en presencia de promotores de tipo ácido, tales como cloruro de amonio o algún ácido mineral, tal como ácido sulfúrico o clorhídrico, en mezclas agua/alcohol como disolvente, de acuerdo con el procedimiento descrito por Nakata (Nakata, M y Tatsuta, K. *J. Antibiotics* 46: 1919-22, 1993) o bien por Rohloff (Rohloff, J. C. *et al J. Org. Chem.* 63: 4545-4550, 1998), se obtienen respectivamente los productos V-A, V-B a VII, siendo Y igual a N<sub>3</sub> o amina en el caso de usar azida sádica o una amina como nucleófilos.

En la Figura 2 se describen los epoxiciclohexanos hexasustituidos totalmente bencilados que son igualmente productos de partida adecuados para la obtención de compuestos englobados en la fórmula general I. Algunos de dichos epóxidos son compuestos conocidos, y se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura. Así, VIII-A, VIII-B, VIII-C, VIII-D y VIII-E se preparan según Chung (Chung, S.-K. y Kwon, Y.-U. *Bioorg.*

## ES 2 289 853 B1

*Med. Chem. Lett.* 9: 2135-2140, 1999). VIII-F se describe por Carless (Carless, H.A.J. *et al. Synlett* 672-4, 1993) y VIII-G por Falshaw (Falshaw, A. *et al Carbohydrate Res.* 329: 301-308, 2000).

5 De manera preferente, dichos epóxidos se pueden obtener mediante métodos de *O*-bencilación generales tales como la reacción con un hidruro alcalino seguida de alquilación con el haluro de bencilo (Serrano, P. *et al. J. Org. Chem.* 67: 7165-7, 2002) o empleando otras reacciones de eterificación de Williamson a partir de los correspondientes epoxiciclohexanos hidroxilados. Así, por ejemplo, dicho método aplicado a compuestos tales como II-A, II-B y III, proporciona los compuestos IX-A, IX-B y VIII-D, respectivamente.

10 Como ejemplo no limitativo se describen en la Figura 3 las reacciones de los epóxidos VIII-D y IX-B, que también pueden aplicarse a sus diastereómeros, entre otros los descritos en la Figura 2. Dichos epóxidos pueden reaccionar con distintos nucleófilos mediante métodos similares a los descritos para los epóxidos II-A, II-B y III, lo que permite la obtención de los intermedios X, XI, XII y XIII, que presentan un único grupo hidroxilo libre, que puede ser transformado en los compuestos finales XIV, XV y XVI o bien XVII, XVIII y XIX mediante reacciones con retención o  
15 inversión de configuración, por ejemplo utilizando reacciones de Mitsunobu (Mitsunobu, O. *Synthesis* 1-28, 1981), o, alternativamente, mediante la formación de un ester activado intermedio con posterior desplazamiento del mismo por el nucleófilo, por ejemplo utilizando los métodos descritos por Ogawa (Ogawa *et al Org. & Biomol. Chem.* 2: 884-9, 2004) o bien por Merla (Merla y Risch, *Synthesis* 1365-1372, 2002). De esta forma, estos métodos permiten la síntesis de otros compuestos englobados bajo la fórmula general I.

20 Los compuestos de fórmula general I conteniendo dos sustituyentes X, Y nitrogenados unidos al núcleo de ciclohexano de I se pueden obtener mediante la secuencia de reacciones descrita en la Figura 4, en el que se detalla de manera esquemática y no limitante la apertura de los epóxidos VIII-D y XI-B utilizando azida sódica como nucleófilo, para la obtención de compuestos intermedios XIV, XV, XX y XXI, que se pueden transformar en las aziridinas XXII y XXVI o en sus derivados XXIII y XXVII, que posteriormente se hacen reaccionar con nucleófilos de nitrógeno adecuados de acuerdo con procedimientos habituales para este tipo de compuestos que se describen por ejemplo por Sweeney (Sweeney, J. B. *Chem. Soc. Rev.* 31: 247-258, 2002), o por Tanner (Tanner, D. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 33: 599-619, 1994) o por Watson (Watson y Yudin *J. Org. Chem.* 68: 5160-5167, 2003), para dar los ciclohexanos sustituidos en posiciones adyacentes con grupos nitrogenados iguales o distintos.

30 Los compuestos bencilados obtenidos mediante los métodos descritos en las Figuras 1 a 4 se pueden transformar en los correspondientes compuestos hidroxilados mediante hidrogenación catalítica o, alternativamente, mediante su reacción con tricloruro de boro a temperaturas inferiores a -50°C.

35 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de los compuestos moduladores de la invención, en adelante uso de los compuestos de la presente invención, para la fabricación de una composición farmacéutica moduladora de la enzima beta-glucosidasa útil para el tratamiento y profilaxis de enfermedades humanas.

40 Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de los compuestos de la invención en el que la composición farmacéutica está destinada al tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de los compuestos de la invención en el que la composición farmacéutica está destinada al tratamiento del tratamiento del cáncer.

45 Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento moduladora de la actividad de la enzima beta-glucosidasa, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un compuesto modulador de la invención en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

50 Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos, tales como mesilatos, fumaratos, clorhidratos, citratos, maleatos y tartratos. También pueden formarse sales fisiológicamente aceptables con los ácidos sulfúrico y fosfórico. Asimismo, pueden formarse sales de tipo básico de un metal alcalino, como por ejemplo el sodio, o de un metal alcalinotérreo, por ejemplo, calcio o magnesio. Puede haber más de un catión o anión dependiendo del número de funciones con carga y de la valencia de los cationes y aniones.

55 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto modulador de la actividad beta-glucosidasa de la invención, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración. En el caso del compuesto de fórmula general I de la invención la cantidad o concentración adecuada para activar la actividad y estabilidad de la enzima beta-glucosidasa será menor que para inhibir su actividad, porque como se ha demostrado funciona como una chaperona química.

65 En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará

## ES 2 289 853 B1

en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto modulador es el compuesto 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica de la invención en la que el compuesto modulador es el compuesto 6-fenilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

Finalmente, otro objeto de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención moduladora de la actividad de la enzima beta-glucosidasa, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad humana. Estas composiciones farmacéuticas modularían la actividad de la enzima beta-glucosidasa, preferentemente, incrementando su actividad.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad humana provocada por alteraciones de la enzima beta-glucosidasa - en concreto una disminución de su actividad - preferentemente, en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad humana en el que la enfermedad humana es un cáncer. En este caso el compuesto modulador incrementaría los niveles de ceramida en el interior celular e induciría la apoptosis de las células tumorales.

El uso de la composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse en un método de tratamiento de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos. En el caso concreto de la enfermedad de Gaucher el compuesto modulador de la invención puede administrarse conjuntamente con la enzima beta-glucosidasa de origen recombinante, por ejemplo, con la enzima imiglucerasa, sustitutiva de la enzima defectuosa endógena. De esta forma puede incrementarse la eficacia de ambos tratamientos por separado con una importante disminución de la enzima recombinante a administrar, y por tanto, del coste económico del mismo.

### 35 Ejemplos de realización

La invención se ilustra a continuación mediante ejemplos no limitativos.

#### Ejemplo 1

##### Preparación de (1R,2S,3S,4R,5S,6S)-2,3,4-tris-benciloxi-6-azido-5-hidroximetilciclohexanol

Se prepara una disolución en CH<sub>3</sub>CN (9 mL) 0.5 mmol del epóxido II-B obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 14. Dicha disolución se mezcla a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón con LiClO<sub>4</sub> (1.3 g, 12.3 mmol). Seguidamente, se añade una disolución de 5 mmol de NaN<sub>3</sub> en CH<sub>3</sub>CN (1 mL) y la mezcla de reacción se agita a 80°C bajo argón. Transcurridas 18 h, la mezcla se enfría y se añade agua (10 mL). Se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL), y dichos extractos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, evaporándose los volátiles para dejar un aceite, que es purificado por filtración a través de una columna de sílica eluyendo con hexano/EtOAc (1:1). Las fracciones seleccionadas se someten a una posterior evaporación rindiendo 0.48 mmoles del producto.

IR (film): 3444, 2910, 2106, 1878, 1813, 1732. <sup>13</sup>C NMR: 41.8, 58.4, 62.2, 73.3, 73.1, 75.4, 75.5, 80.2, 81.7, 83.7, 127-130, 137-139. <sup>1</sup>H NMR: 2.50 (m, 1H), 3.31 (t, J=J'=9 Hz, 1H), 3.45 (dd, J=9 Hz, J'=10.5 Hz, 1H), 3.65 (dd, J=9.9 Hz, J'=5.4 Hz, 1H), 3.75-3.90 (m, 4H), 4.6-5.0 (m, 6H), 7.2-7.4 (m, 15H). EIHRMS, calc C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 490.234197. Encontrada: 490.234533.

#### Ejemplo 2

##### Preparación de (1R,2S,3S,4R,5S,6S)-2,3,4-tris-benciloxi-6-butilamino-5-hidroximetilciclohexanol

Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, sustituyendo la azida sódica por idéntica cantidad en moles de *n*-butilamina, se obtiene el producto de apertura del epóxido II-B, que es purificado de manera similar, utilizando en este caso EtOAc como eluyente.

IR (film): 3590, 3323, 3033, 1942, 1872. <sup>13</sup>C NMR: 13.8, 30.9, 31.6, 36.85, 47.8, 60.5, 60.8, 70.6, 72.4, 75.5, 77.2, 80.3, 81.7, 83.7, 127.7-128.7, 137.8-138.3. <sup>1</sup>H NMR: 1.15-1.45 (m, 7H), 2.55-2.94 (m, 3H), 3.35 (t, 2H, J=J'=9.2 Hz), 3.52-4.1 (m, 4H), 3.84 (t, 1H, J=J'=9.2 Hz), 3.96 (A de un AXY, 1H, J=9.2 Hz, J'=3.2 Hz), 4.61-5.05 (m, 6H), 7.25-7.39 (m, 15H). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -10.4 (c, 1.35, CHCl<sub>3</sub>). HRMS, calc para C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>5</sub>: 520.3062. Encontrado: 520.3084.

## ES 2 289 853 B1

### Ejemplo 3

#### Preparación de (1R,2R,3S,4R,5R,6S) 2-Azido-3,4,5,6-tetrakis-benciloxiciclohexanol

5 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1 sobre el epóxido VIII-D, preparado según P. Serrano (P. Serrano *et al*  
*J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7165-7) se obtiene el azidoalcohol correspondiente que se purifica por cromatografía flash  
(SiO<sub>2</sub> pretratada con Et<sub>3</sub>N) fluyendo con hexano/EtOAc (2:1). IR(film):3448, 3107, 1456, 1359, 1200. <sup>13</sup>C NMR: 45.5,  
66.4, 72.7, 75.6, 75.8, 75.9, 81.1, 82.4, 82.6, 83.5, 127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.1, 128.4, 128.6, 137.9, 138.0, 138.1.  
10 <sup>1</sup>H RMN: 3.40-3.44 (m, 4H), 3.50-3.65 (m, 2H), 4.75-4.96 (m, 8H), 7.26-7.35 (m, 20H). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> -6.2 (c, 0.95, CHCl<sub>3</sub>).  
HRMS. calc para (M+H<sup>+</sup>) C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 567.2654. Encontrado: 567.2648.

### Ejemplo 4

#### Preparación de (1R,2S,3S,4R,5S,6S) 2,3,4-trisbenciloxi-6- octilamino-5-hidroxi metilciclohexanol

15 Una disolución de triflato de Iterbio (20.8 mg, 0.03 mmol) y n-octilamina (0.3 mmol) en 1,5 mL de tolueno anhidro,  
se añade sobre una disolución en tolueno anhidro (1.5 mL) de 30 mg (0.07 mmol) del epóxido II-B, que se ha obtenido  
de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 14. La mezcla de reacción se agita bajo una atmósfera de argón  
a 80°C. Transcurridas 24 h, dicha mezcla se enfría a temperatura ambiente, se trata con agua (2 mL), y se extrae con  
20 éter dietílico (3 x 10 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con disolución de cloruro sódico (5 mL), se secan  
y se concentran bajo presión reducida. El producto crudo se purifica por cromatografía "flash" en sílica gel utilizando  
una mezcla de dichlorometano/metanol (9:1) como eluyente. La evaporación de las fracciones seleccionadas produce  
0.056 mmoles del producto, en forma de aceite.

25 [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> - 4.78 (c 1.00 en CHCl<sub>3</sub>); IR film)/cm<sup>-1</sup> 3315, 3096, 3062,3027, 2954, 2933, 2864, 1480,1447; <sup>1</sup>H (200 MHz;  
CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 0.8-1.4 (15H, m, CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>), 2.44-2.96 (3H, m, 6 H, NCH<sub>2</sub>), 3.05-3.35 (3H, m, 1 H, 2 H, 3 H), 3.58-  
3.98 (4H, m, 4 H, 5 H, 7 H, 7' H), 4.61-5.05 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>OPh), 7.26-7.38 (15H, m, 3 x Ph); <sup>13</sup>C (50.3 MHz;  
CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 14.0 (q), 22.6 (t), 27.1 (t), 28.1-29.6 (4 x t), 31 (t) (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 47.4 (d, C6), 60.0  
30 (d, C1), 61.3 (d, C2), 70.3 (OCH<sub>2</sub>Ph), 72.6 (OCH<sub>2</sub>Ph), 75.6 (OCH<sub>2</sub>Ph), 77.2 (d, C7), 80.3 (d, C5), 82.0 (d, C4), 86.9  
(d, C3), 127.7-128.6 (CHAr), 138.0-139.2 (CAr).

### Ejemplo 5

#### Preparación de (1R,2S,3S,4R,5R,6S) 4,5,6-trisbenciloxi-2- octilaminociclohexano-1,3-diol

35 De acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 4, utilizando el epóxido III, previamente preparado de  
acuerdo con el procedimiento descrito por Jaramillo (Jaramillo *et al. J. Org. Chem.* **1994**, 59, 3135-3141), se obtiene  
el ciclohexanodiol con un rendimiento del 90%.

40 Aceite claro. IR (film)/cm<sup>-1</sup> 3414, 3316, 3105, 3067, 3032, 2964, 2929, 2856, 1490, 1456; <sup>1</sup>H (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>;  
Me<sub>4</sub>Si) 0.92 1.43 (15H, m, CH<sub>3</sub>, 7 x CH<sub>2</sub>), 2.48 (2H, m, NCH<sub>2</sub>), 2.87, (1H, t, J2-1=J2-6 10.5, 2-H), 3.17 (2H, m,  
NCH<sub>2</sub>), 3.47-3.50 (3H, m3-H, 4-H y 5-H), 3.78(2H, t, J1-2=J6-1 10.4, 1-H y 6-H) 4.6-5.0 (6H, m, 3 x OCH<sub>2</sub>Ph), 7.2-  
7.4 (15H, m, 3xPh); <sup>13</sup>C (50.3 MHz; CDCl<sub>3</sub>, Me<sub>4</sub>Si) 14.0 (q), 22.6 (t), 26.3 (t), 26.5 (t), 28.9 (t), 29.0 (t), 31.6 (t)  
(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.7 (t, N CH<sub>2</sub>), 61.2 (d, C2), 69.6 (d, C1, C3), 75.3-75.7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 82.4 (d, C5),  
45 84.3 (d, C4, C6), 127.7-128.5 (CHAr), 138.3-138.5(CAr).

### Ejemplo 6

#### Preparación de (1S,2S,3S,4S,5R,6R) 3-Azido-4,5,6-tris-benciloxiciclohexano-1,2-diol

50 Una disolución del epóxido III (250 mg, 0.48 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (0.48 mmol) en una mezcla 4:1 de MeOH/H<sub>2</sub>O  
(10 mL) se trata con NaN<sub>3</sub> (650 mg, 10 mmol). La mezcla de reacción se agita con calefacción a 80°C hasta que el  
epóxido de partida se ha consumido. Se enfría a temperatura ambiente, se diluye con agua (10 mL) y se extrae con  
Et<sub>2</sub>O (4x15 mL). Los extractos etéreos se combinan y se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se filtra y evaporan los volátiles  
55 obteniéndose un aceite que se purifica por cromatografía flash (SiO<sub>2</sub> pretratada con Et<sub>3</sub>N) eluyendo con hexano/EtOAc  
(1:1). IR(film): 3452, 3031, 2907, 2109, 1497, 1454, 1362. <sup>13</sup>C NMR: 60.2, 70.7, 72.9, 73.1, 75.7, 77.9 m 82.3, 82.9,  
127.8, 127.9, 128.0 m, 128.1, 128.5, 128.6, 137.4, 138.0. <sup>1</sup>H NMR: 2.75 (m, 1H), 3.4-3.6 (m, 2H), 3.71-3.85 (m,  
2H), 3.87-3.92 (m, 1H), 4.50-5.0 (m, 6H), 7.2-7.4(m, 6H). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +15.5 (c, 1.45, CHCl<sub>3</sub>). EIHRMS, calc C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>:  
475.210710. Encontrada: 475.21230.

60

### Ejemplo 7

#### Preparación de (1R,2S,3S,4S,5R,6R) 2-Azido-3,4,5-trisbenciloxi-6-hidroxi metilciclohexanol

65 De acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 6, a partir del epóxido II-A se obtiene el producto que se  
purifica en una columna de sílica mediante elusión con hexanes/EtOAc (1:1) con un rendimiento del 82%. IR (film):  
3416, 3933, 2902, 2104, 1496, 1454, 1369. <sup>13</sup>C NMR: 44.3, 63.3, 64.7, 66.9, 71.7, 71.4, 71.7, 72.4, 73.4, 77.68, 78.6,  
127.6, 127.7, 127.8, 127.9, 128.8, 128.1, 128.2, 128.3, 120.4, 129.5, 137.1, 137.3, 138.1. <sup>1</sup>H NMR: 2.0(m, 1H), 3.95

## ES 2 289 853 B1

(dd, J=9 Hz, J= 2.6 Hz, 1H), 3.68(m, 2H), 3.80(m, 2H), 3.85(m, 1H), 4.2-4.7(m, 6H), 4.38(d, J=9Hz, 1H). 4.6- 5.0 (m, 5H), 7.2-7.4 (m, 15H). EIHRMS, calc para C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 490.234197. Encontrado: 490.234489

### Ejemplo 8

5

#### *Preparación de (1R,2S,3S,4S,5R,6R) 2-Amino-3,4,5-trisbenciloxi-6-hidroximetilciclohexanol*

Una disolución del azidociclohexanol cuya preparación se describe en el ejemplo 7 (2.0 mmol) en (30 mL) se añade sobre una mezcla de LiAlH<sub>4</sub> (45 mg, 1.2 mmol) en THF anhidro (30 mL) manteniendo la temperatura a 0°C bajo atmósfera de argón. A continuación se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y se añaden secuencialmente acetato de etilo (20 mL) y agua (20 mL). La mezcla se extrae con éter (3 x 50 mL). Los extractos orgánicos se combinan y se lavan con agua y con disolución saturada de cloruro sódico (50 mL), secándose a continuación sobre sulfato de sodio anhidro. Por concentración a presión reducida se obtiene el producto crudo, que se purifica por cromatografía flash sobre sílica gel (desactivada con un 3% de trietilamina) utilizando diclorometano/metanol (12:1) como eluyente. Se evapora el disolvente de las fracciones de interés obteniéndose 1,62 moles (81%) del compuesto como un aceite incoloro.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> + 5.2 (c 1, CHCl<sub>3</sub>); IR,  $\nu_{\max}$ (film) /cm<sup>-1</sup> 3366, 3090, 3062, 3031, 2918, 2861, 1491, y 1454;  $\delta_{\text{H}}$  (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 2.00 (1H, m, 6-H), 2.98 (1H, br, 2-H), 3.72-3.77 (4H, m, 1-H, 3-H, 4-H y 5-H), 3.93-3.97 (2H, m, 7-H y 7'-H), 4.42-4.62 (6H, m, 3xOCH<sub>2</sub>Ph), 7.25-7.40 (15H, m, 3xPh);  $\delta_{\text{C}}$  (50.3 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 44.3 (d, C2), 54.8 (d, C1), 63.7 (d, C3), 69.3 (d, C5), 72.1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 72.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 72.8 (OCH<sub>2</sub>Ph), 78.5 (d, C4), 79.0 (C3), 127.8-128.5 (CHAr), 137.6-137.8 (CAr).

### Ejemplo 9

25

#### *Preparación de (1s,2R,3S,4r,5R,6S) 2,3,4,5,6-Pentakis-benciloxi-ciclohexilamina*

Una disolución del azidoalcohol descrito en el ejemplo 2 (2.0 mmol) en THF anhidro (20 mL) se añade lentamente sobre una suspensión hidruro de sodio (60% dispersión en aceite mineral, 130 mg, 6.0 mmol) manteniendo la temperatura a cero grados mediante enfriamiento externo y bajo atmósfera de argón. Se agita hasta que cesa el desprendimiento de gas, tras lo cual, se añade cloruro de bencilo (0.45 mL, 3.80 mmol). La mezcla de reacción se deja en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se añade agua (10 mL) y se extrae con éter dietílico (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavan con agua (20 mL), se secan con sulfato de sodio y se concentran para producir un aceite que está constituido por el producto O-pentabencilado, que se usa sin purificar en el siguiente paso, llevado a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 8 para la reducción del grupo azido a amina se obtiene el producto a partir de (1s,2R,3S,4r,5R,6S) 1-azido-2, 3, 4, 5, 6-Pentakis-benciloxi-ciclohexano crudo obtenido. Rendimiento total 87%.

IR  $\nu_{\max}$ (film)/cm<sup>-1</sup> 3331, 3062, 3031, 2907, 1580, 1456, 1359; <sup>1</sup>H RMN  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 2.97 (1H, t, J 9.9), 3.35 (2H, m), 3.62 (3H, m), 4.68-5.01(m, 10H), 7.24-7.40 (20H, m); <sup>13</sup>C RMN  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si): 66.8(d), 75.8 (2xd), 81.0 (2xt), 82.4(t), 83.2(2xt), 127.7-128.5 (25xd), 138.2-138.3 (5xs).

### Ejemplo 10

45

#### *(1S,2S,3S,4S,5R,6R)-3-amino-4,5,6-trisbenciloxiciclohexano-1,2-diol 40*

El azido alcohol descrito en el ejemplo 6 se somete a reducción mediante un procedimiento análogo al que se detalla en el ejemplo 8 con un rendimiento del 81%.

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> +10.7 (c 1, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$ (film)/cm<sup>-1</sup> 3423, 3316, 3153, 3102, 3084, 2925, 2886, 2856, 1499, 1469; <sup>1</sup>HRMN (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 3.53 (t, 1H, H2), 3.74 (t, 1H, H4), 3.92 (m, 3H, H3, H5, H6), 4.06 (dd, 1H, H1), 4.6-5 (m, 6H, 3xOCH<sub>2</sub>Ph), 7.23-7.41 (m, 15 H, 3xPh);  $\delta_{\text{C}}$  (50.3 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 51.3 (d, C2), 71.0 (d, C3), 72.1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 72.7 (OCH<sub>2</sub>Ph), 74.9 (OCH<sub>2</sub>Ph), 75.1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 80.3 (d, C6), 80.8 (d, C4), 81.2 (d, C5), 127.7-128.6 (CHAr), 138.3-138.5 (CAr).

55

### Ejemplo 11

#### *Preparación de (1s,2R,3S,4r,5R,6S)-2,3,4,5,6-Pentakis-benciloxi-N-fenil ciclohexilamina*

Una disolución del aminoalcohol preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9 (0.05 mmol) en metanol (2 mL) se trata sucesivamente con cianoborohidruro sódico (4.2 mg, 0.108 mmol), ácido acético (0.035 mL) y fenilacetaldehído (0.05 mmol). Se agita a temperatura ambiente durante 18 h se añade agua (2 mL) y se extrae con éter (3 x 20 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavan con disolución saturada de cloruro de sodio, se secan sobre sulfato de sodio anhidro y se concentran para dar un aceite, que se mediante cromatografía flash utilizando una mezcla de diclorometano/metanol (12:1). Se evapora el disolvente de las fracciones de interés obteniéndose 0,042 mmoles (85%) del compuesto como un aceite incoloro.

## ES 2 289 853 B1

IR  $\nu_{\max}$ (film)/cm<sup>-1</sup> 3057, 3027, 2957, 1480, 1456;  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si): 2.93 (3H, m), 3.15 (3H, m), 3.55-3.68 (5H, m), 4.81-5.00(m, 10H), 7.12 (2H, d, J 5.5), 7.24-7.40 (28H, m);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si): 37.0(t), 65.9(d), 75.2 (2xd), 76.0(d), 76.1 (2xd), 79.9(2xt), 82.8(t), (84.8(2xt), 85.4(t), 126.2(2xd), 127.7-128.9 (28xd), 138.6-138.9(5xs), 140.6(s).

5

### Ejemplo 12

*Preparación de (1R,2R,3R,4S,5S,6S)-3,4,5-tris-benciloxi-2-hidroximetil-6-butilaminociclohexanol*

10 El aminoalcohol descrito en el Ejemplo 7 se somete a reacción con butanal mediante un procedimiento análogo al que se detalla en el Ejemplo 11 para dar el producto final con un rendimiento del 91%.

15  $[\alpha]_{\text{D}}$  -22.1 (c 1, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$ (film)/cm<sup>-1</sup> 3302, 3075, 3051, 3027 1490, 1456, 1450; <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 0.86-1.24 (7H, m, CH<sub>3</sub>, 2 x CH<sub>2</sub>), 2.00 (1H, m, 6-H), 2.25 (2H, m, NCH<sub>2</sub>), 2.63 (1H, m, 2-H), 3.67-3.88 (4H, m, 1-H, 3-H, 4-H y 5-H), 3.99 (2H, m, 7-H y 7'-H), 4.23-4.62 (6H, m, 3 x OCH<sub>2</sub>Ph), 7.23-7.35 (15H, m, 3xPh); <sup>13</sup>C-RMN  $\delta_{\text{C}}$  (50.3 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 13.9 (q), 20.3 (t), 30.4 (t), 36.5 (t) (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 47.2 (d, C6), 61.4(d, C1), 61.6 (d, C2), 72.1 (OCH<sub>2</sub>Ph), 72.4 (OCH<sub>2</sub>Ph), 72.6 (OCH<sub>2</sub>Ph), 77.0 (d, C7), 127.8-128.5 (CHAR), 138.2-138.4 (CAr).

20 Ejemplo 13

*Preparación de (1S,2S,3R,4R,5S,6S) 3,4,5-tris-benciloxi-6-octilaminociclohexano-1,2-diol*

25 El aminoalcohol descrito en el Ejemplo 10 se somete a reacción con octanal mediante un procedimiento análogo al que se detalla en el Ejemplo 11 para dar el producto final con un rendimiento del 83%.

30  $[\alpha]_{\text{D}}$  +24.8 (c 1, CHCl<sub>3</sub>);  $\nu_{\max}$ (film)/cm<sup>-1</sup> 3306, 3029, 2909, 1485, 1444, 1359, 1345;  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 0.88 (3H, t, 7.2, J CH<sub>3</sub>), 1.25-1.44(8H, m, 2xCH<sub>2</sub>), 2.38-2.60 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 3.23(t, 1H, J 4.6, CHNHR), 3.67(t, 1H, J 8.6, CHOH), 3.78-4.10 (4H, m, CH), 4.50-4.98 (6H, m, OCH<sub>2</sub>Ph), 7.2-7.4 (15H, m, Ar);  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 14.1(q), 20.4(t), 25.9(t), 28.6(t), 29.4 (t), 29.5 (t), 32.3(t), 48.1(t), 58.2(d), 68.9 (2xd), 71.1 (2xd), 72.4 (2xd), 75.0 (d), 75.2(d), 79.6(t), 81.3(t), 127.5-128.6(12xd), 138.3(s), 138.7(s).

### Ejemplo 14

35 *Preparación de (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6R) 2,3,4-Tris-benciloxi-5-benciloximetil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptano, epóxido II-B*

40 A una disolución de 1,0 g en 10 mL de THF de (1R, 2R, 3S, 4R, 6R) 2,3,4-Tris-benciloxi-5-metileno-7-oxa-biciclo [4.1.0]heptano preparado de acuerdo con el procedimiento descrito por P. Letellier (P. Letellier *et al. Synthesis*. 925-930, 1994), se añaden porciones de 0.5 mL de H<sub>3</sub>B (1 M en THF) a temperatura ambiente en cantidad suficiente para la desaparición total del producto de partida, utilizando cromatografía de capa fina para el análisis de la evolución de la reacción. Seguidamente se enfría la mezcla de reacción a 0° y se añaden 3 mL de agua, y a los 10 minutos, 7 mL de NaOH 2 N y 3.4 mL de agua oxigenada al 30%. Se deja que la mezcla de reacción llegue a temperatura ambiente, se agita durante 10 minutos y se evapora a presión reducida. El residuo se reparte entre 20 mL de agua y 20 mL de éter dietílico. Se separan las fases y la acuosa se extrae repetidamente con éter dietílico. Los extractos étereos se secan con sulfato de sodio y se evaporan dejando un aceite que se purifica mediante cromatografía en columna sobre sílica gel utilizando una mezcla de hexano/AcOEt 8:1 como eluyente. La evaporación de las fracciones de interés conduce a 0.55 g del epóxido II-B.

50  $[\alpha]_{\text{D}}$  +4.1 (c 1, CHCl<sub>3</sub>); IR  $\nu_{\max}$ (film)/cm<sup>-1</sup> 3306, 3029, 2909, 1485, 1444, 1359, 1345;  $\delta_{\text{H}}$  (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 2.8 (1H, m), 3.22 (1H, d, J 3.6), 3.4 (1H, m), 3.73 (dd, 1H, J 10.9, 7.6), 3.85 (dd, 1H, J 10.9, 6.1), 3.87 (t, 1H, J 11.2), 3.97 (1H, d, J 6.1), 4.0 (dd, 1H, J 11.2, 7.4), 4.6-4.9 (m, 6H), 7.2-7.4 (15H, m);  $\delta_{\text{C}}$  (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 36.8, 53.6, 55.7, 61.3, 73.2, 73.7, 74.9, 77.3, 79.8, 80.3, 127.5-128.6(mult), 136.4, 137.3, 138.0.

55 Ejemplo 15

*Preparación de (1R,2S,3S,4R,5R,6S)-2,3,4-tris-benciloxi- 6-butilamino-5-hidroximetilciclohexanol*

60 Siguiendo el procedimiento del Ejemplo 1, se hace reaccionar el epóxido II-A con *n*-butilamina, produciendo un producto que es purificado de manera similar, utilizando en este caso MeOH/diclorometano 1:9 como eluyente. De la evaporación de las fracciones de interés se obtiene un aceite claro. Rendimiento 88%.

65 IR (film): 3590, 3323, 3033, 1942, 1872. <sup>1</sup>H NMR: 1.15-1.45 (m, 7H), 1.51, (ddt J= 10.8, 10.6, 3.2), 2.55-2.94 (m, 3H), 3.35 (t, 2H, J=J'= 9.2 Hz), 3.52-4.1 (m, 4H), 3.84 (t, 1H, J=J'=9.8 Hz), 3.96 (m, 1H), 4.61-5.05 (m, 6H), 7.25-7.39 (m, 15H). HRMS, calc para C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>5</sub>: 520.3062. Encontrado: 520.3004.

## ES 2 289 853 B1

### Ejemplo 16

#### Preparación de (1' s, 2' R, 3' S, 4' r, 5' R, 6' S)-N-Fenetil-N-(2,3,4,5,6-pentakis-benciloxiciclohexil)octanamida

5 A una disolución de la amina preparada según el procedimiento descrito en el Ejemplo 11 (0.060 mmol) y trietilamina (0,025 mL) en dichlorometano (1 mL) se añaden 0.030 mL de cloruro de octanoilo. Se deja en agitación durante 18 horas, tras lo cual se lava la mezcla de reacción con agua (1 mL). La fase orgánica resultante se seca con sulfato sódico y se evapora el disolvente para dar un crudo que se purifica por cromatografía en columna sobre sílica (hexano/AcOEt 10:1). La evaporación de las fracciones de interés conduce a un aceite con un rendimiento del 82%.

10 IR  $\nu_{\max}$ (film)/ $\text{cm}^{-1}$  3039, 3020, 2957, 2918, 1684, 1521, 1477, 1389, 1332;  $\delta_{\text{H}}$  (500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ ) 0.88 (3H, t, J=6.5,  $\text{CH}_3$ ), 1.20-1.40 (10H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1.6-1.7 (m, 2H), 2.19 (2H, t, J=8.0), 2.76(2H, t, J=9.5,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{Ar}$ ), 2.97 (2H, m), 3.42 (2H, m), 3.51(2H, t, J=10.5), 3.69 (1H, t, J=9.5), 4.60(1H, d, J=10.0), 4.67 (1H, t, J=8.0), 4.81-5.02 (9H, m), 7.11 (2H, d, J=5.0), 7.24-7.40 (28 H, m);  $\delta_{\text{C}}$  (125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ;  $\text{Me}_4\text{Si}$ ): 14.3 (q), 22.8 (t), 24.5(t), 24.9(t), 29.1(t), 29.9(t), 34.2(t), 35.6(t), 37.0(t), 43.5(t), 54.5(d), 69.5(d), 70.4(d), 75.8(d), 76.2(d), 78.6(d), 82.9 (t), 84.7(t), 126.2(d), 127.2-129.8 (29 x d), 138.4-138.7 (5 x s), 140.6(d), 179.9 (s).

### Ejemplo 17

#### 20 Preparación del hidrocloreto de (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol

El aminodiol preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 (0.2 mmol) disuelto en 2 mL de diclorometano anhidro se trata con 0.85 mL de una disolución 1 M de tricloruro de boro en *n*-heptano a temperatura inferior a  $-50^\circ\text{C}$ , bajo atmósfera de argón. La mezcla se deja evolucionar lentamente hasta temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. Seguidamente, se vuelve a enfriar con un baño externo de  $\text{CO}_2$ /acetona y se añade metanol gota a gota (0.5 mL). Se retira el baño y una vez a temperatura ambiente se evaporan los volátiles a presión reducida, se añaden 2 mL de acetato de etilo y se introduce el matraz en un baño de ultrasonidos durante 1 minuto, tras lo cual se obtiene un precipitado sólido que se filtra y seca a vacío, dejando un sólido higroscópico en forma pura. Rendimiento 87%.

30  $^1\text{HNMR}$  (500 MHz,  $\text{NeOD}$ ): 0.91 (t, J=7.0 Hz, 3H), 1.22-1.40 (m, 10H), 1.61 (m, 2H), 2.46 (t, J=8 Hz, 2H), 3.25 (m, 4H), 3.59 (t, J=8.5 Hz, 1H), 3.68 (dd, J=9.5, 10.5 Hz, 1H). Análisis elemental; calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{ClNO}_5$ : C, 51,29; H, 9,22; Cl, 10,81; N, 4,27; Encontrado: C, 51,19; H, 9,32; Cl, 11,04; N, 4,20.

### 35 Ejemplo 18

#### Preparación de (1R, 2S, 3R, 4R, 5S, 6S) 2,3,4,5-Tetrakis-benciloxi-7-aza-biciclo[4.1.0]heptano

40 Una disolución del azidoalcohol preparado de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 3 (277 mg, 0.49 mmol) y trietilamina (0.5 mL) en THF (20 mL) se trata con  $\text{MsCl}$  (58 mg, 0.51 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 horas, se diluye con agua (10 mL), se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$  (4 x 15 mL) y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se filtra y evapora para dar un azidomesilato intermedio que se purifica por filtración a través de sílica eluyendo con hexano/ $\text{EtOAc}$  (2:1). La evaporación de las fracciones proporciona un aceite que se disuelve en THF (3 mL) y se añade a una suspensión de  $\text{LiAlH}_4$  (30 mg, 0.79 mmol) en THF (3 mL) a  $0^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se agita 2 h y se añade  $\text{EtOAc}$  (2 mL) a  $0^\circ\text{C}$ . La suspensión se diluye con agua (10 mL), se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$  (4x10 mL), y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se filtra y evapora para dar la aziridina cruda, que se purifica por cromatografía en columna utilizando hexano/ $\text{EtOAc}$  (2:1) en presencia de TEA (3%) para dar 229 mg (0.41 mmol, 90%) del producto.

50 IR (film): 3292, 3062, 3031, 2920, 1858, 1488, 1454, 1365;  $^{13}\text{CNMR}$  (75 MHz): 34.2, 72.7, 72.8, 75.2, 75.7, 79.5, 79.7, 81.2, 127.3-128.3, 138.0-138.9;  $^1\text{HNMR}$  (300 MHz): 2.36 (m, 1H), 2.51 (bb, 1H), 3.44 (q, J=7.8, J=10.2 Hz, 1H), 3.65 (t, J=9.3 Hz), 3.83-3.90 (m, 2H), 4.65-4.95 (m, 10H), 7.24-7.34 (m, 20H). HRMS. calc para ( $\text{M}+\text{H}^+$ )  $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{NO}_4$ : 522.2644 Encontrado: 522.2622.

### Ejemplo 19

55 Preparación de (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-Azido-3,4,5,6-tetrakis-benciloxi-ciclohexilamina y de (1S, 2S, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-Azido-3,4,5,6-tetrakis-benciloxi-ciclohexilamina

60 Una disolución de la aziridina descrita en el Ejemplo 18 (250 mg, 0.48 mmol) y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0.48 mmol) en una mezcla 4:1 de  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) se trata con  $\text{NaN}_3$  (650 mg, 10 mmol). La reacción se agita a  $80^\circ\text{C}$  hasta que el producto de partida se ha transformado en su totalidad. Se enfría la mezcla a temperatura ambiente, se diluye con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL), se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$  (4x15mL) y se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se filtra y se evapora para dar una mezcla 1:1 de los azidoaminociclohexanos regioisoméricos, que se separan y purifican por cromatografía en capa fina, eluyendo con hexano/ $\text{EtOAc}$  (1:2) en presencia de trietilamina (2% v:v).

65 Isómero (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S): (112 mg, 0.20 mmol, 42%); IR(film): 3043, 3039, 3045, 3032, 2922, 2876, 2103, 1476, 1359;  $^{13}\text{CNMR}$  (75 MHz): 50.9, 63.1, 72.9, 73.5, 75.7, 79.3, 78.4, 81.0, 81.9, 127.5-128.4, 138.1-138.8;  $^1\text{HNMR}$  (300 MHz): 3.41 (t, J= 3.9 Hz, 1H), 3.72 (dd, J= 3.9, J=9.0 Hz, 1H), 3.79 (t, J= 3.9 Hz, 1H), 3.84-3.89 (m,

## ES 2 289 853 B1

2H), 4.21 (dd, J=3.3, J=9 Hz, 1H), 4.60-5.00 (m, 8H), 7.23-7.34 (m, 20H); ESP(+): M+H: 565.3. HRMS. calc para (M+H<sup>+</sup>) C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 565.2814 Encontrado:565.2806.

Isómero (1S, 2S, 3S, 4R, 5R, 6S): (109 mg, 0.19 mmol, 40%); IR(film): 3081, 3035, 2939, 2910, 2106, 1496, 1457. <sup>13</sup>CNMR (75 MHz): 53.9, 67.0, 75.8, 75.9, 82.5, 83.1, 83.9, 127.6-128.6, 137.5-138.2; <sup>1</sup>HNMR (500 MHz): 2.68 (t, J=9.9 Hz, 1H), 3.26 (t, J=10.2 Hz, 1H), 3.33 (t, J= 9, 3 Hz, 1H), 3.50 (t, J=9.9 Hz, 1H), 3.56-3.67 (m, 2H), 4.68-5.05 (m, 8H), 7.29-7.38 (m, 20H); ESP(+): M+H: 565.3. HRMS. Calc para (M+H<sup>+</sup>) C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>: 565.2814 Encontrado: 565.2831.

### 10 Ejemplo 20

*Preparación de la (1S, 2S, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-azido-3,4,5,6-tetrakis benciloxiciclohexil-amida del ácido octanoico*

15 Una disolución de la (1S, 2S, 3S, 4R, 5R, 6S) azidoamina preparada de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 19 se trata con cloruro de octanoilo según el procedimiento de N-acilación detallado en el Ejemplo 16. El producto crudo se purifica por cromatografía flash eluyendo con un gradiente de mezclas de hexano/EtOAc (de 20:1 a 4:1). Se obtiene un rendimiento del 79%.

20 IR(film): 3056, 3028, 2929, 2862, 2107, 1713, 1694, 1459, 1362; <sup>13</sup>C NMR (125 MHz): 14.3, 22.8, 25.8, 29.3, 29.5, 31.9, 37.3, 54.8, 64.0, 75.4, 76.0, 76.0, 76.1, 79.1, 82.4, 83.4, 84.0, 128.0-128.7, 137.9-138.4, 174.0; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz): 0.89 (t, J= 7.0 Hz, 3H), 1.22-1.32 (m, 10H), 2.09 (m, 2H), 3.41 (m, 2H), 3.55 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.62 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.85 (t, J=10.0 Hz, 1H), 4.62 (d, J=11 Hz, 1H), 4.86- 4.98 (m, 9H), 5.40 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 7.24-7.40 (m, 20H); ESP(+): M+H: 691.4. HRMS. Calc para (M+H<sup>+</sup>) C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>:691.3859. Encontrado: 691.3837.

### 25 Ejemplo 21

*Preparación de la (1S, 2S, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-amino-3,4,5,6-tetrakis benciloxiciclohexil-amida del ácido octanoico*

30 A una disolución de la azidoamida (0.03 mmol) descrita en el Ejemplo 20 en 1 mL de THF se añaden 8 mg de catalizador Pd-C al 5%. La mezcla de reacción se agita bajo H<sub>2</sub> (3 atm) hasta desaparición del grupo azido por análisis de espectroscopia IR de la mezcla de reacción una vez decantado el catalizador sólido. A continuación la mezcla se diluye con THF y se filtra a través de Celite®, que se lava con MeOH (2 x 2 mL) para dar el producto puro con rendimiento cuantitativo por evaporación de los disolventes.

35 IR(film): 3301, 3054, 3037, 2955, 2849, 1678, 1499; <sup>13</sup>CNMR (125 MHz): 14.3, 22.8, 26.2, 29.3, 29.5, 31.9, 49.6, 50.9, 72.3, 72.3, 72.4, 72.5, 75.4, 75.7, 79.7, 127.9-128.7, 138.0-138.9, 174.4; <sup>1</sup>HNMR (500 MHz): 0.89 (t, J= 6.9 Hz, 3H), 1.20-1.40 (m, 8H), 1.59 (m, 2H), 2.10 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 3.60 (t, J=8.5 Hz, 1H), 3.70 (dd, J=4.0, J=8.5 Hz, 1H), 3.83 (t, J= 4Hz, 1H), 4.00 (t, J=8.0 Hz, 1H), 4.25 (dd, J=4.0, J=8.5 Hz, 1H), 4.34 (dd, J=5.0, J=10 Hz) 4.55-4.66 (m, 5H), 4.77-4.86 (m, 4H), 5.61 (d, J=5.0 Hz, 1H), 7.24-7.40 (m, 20H); ESP(+): M+H:665.4. HRMS. Calc para (M+H<sup>+</sup>) C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 665.3954 Encontrado: 665.3978.

### 45 Ejemplo 22

*Preparación del hidrocloreto de (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-amino-3,4,5,6-tetrahidroxíciclohexil-amida del ácido octanoico*

50 A partir de la (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S) aminoazida descrita en el Ejemplo 19 se obtiene la correspondiente azidooc-tanoilamida por N-acilación de acuerdo con el ejemplo 20; el producto obtenido se hace reaccionar por hidrogenación catalítica de manera análoga a la descrita en el Ejemplo 21 para dar la (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-amino-3,4,5,6-tetrakis benciloxiciclohexil-amida del ácido octanoico con un 82% de rendimiento y que presenta los siguientes datos espectroscópicos y analíticos:

55 IR(film): 3291, 3029, 2925, 2853, 1638, 1557; <sup>13</sup>CNMR (125 MHz): 14.3, 22.8, 26.2, 29.3, 29.5, 31.9, 49.6, 50.9, 72.3, 72.3, 72.4, 72.5, 75.4, 75.7, 79.7, 127.9-128.7, 138.0-138.9, 174.4; <sup>1</sup>HNMR (500 MHz): 0.89 (t, J= 6.9 Hz, 3H), 1.20-1.40 (m, 8H), 1.59 (m, 2H), 2.1 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 3.60 (t, J= 8.5Hz, 1H), 3.7 (dd, J= 4.0, J= 8.5 Hz, 1H), 3.83 (t, J= 4Hz, 1H), 4.00 (t, J= 8.0 Hz, 1H), 4.25(dd, J= 4.0, J= 8.5 Hz, 1H), 4.34 (dd, J= 5.0, J= 10 Hz) 4.55- 4.66 (m, 5H), 4.77-4.86 (m, 4H), 5.61 (d, J= 5.0 Hz, 1H), 7.24- 7.40 (m, 20 H); HRMS. Calc para (M+H<sup>+</sup>) C<sub>42</sub>H<sub>52</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 665.3954, Encontrado: 665.3940.

65 En una etapa posterior, la (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-amino-3,4,5,6-tetrakis benciloxiciclohexil-amida del ácido octanoico obtenida, se somete a la reacción de desbencilación que se describe en detalle en el ejemplo 17, conduciendo al hidrocloreto de (1R, 2R, 3S, 4R, 5R, 6S) 2-amino-3,4,5,6-tetrahidroxíciclohexil-amida del ácido octanoico con rendimiento cuantitativo.

IR(film): 3303, 3074, 3049, 2965, 2855, 1678, 1499.

## ES 2 289 853 B1

Análisis elemental; calculado para C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: Cr 49,33; H, 8,58; Cl, 10,40; N, 8,22; Encontrado: C, 49,29; H, 8,79; Cl, 10,31; N, 8,22.

### 5 Ejemplo 23

*Preparación del hidrocloreto de (1R,2S,3S,4R,5S,6S) 6-fenetilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol*

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 17, se trata el compuesto (1s,2R,3S,4r,5R,6S) 2,3,4,5,6 Pentakis benciloxi-N-fenetil ciclohexilamina cuya preparación se describe en el Ejemplo 11 con tricloruro de boro. Se obtiene un sólido blanco con un rendimiento del 89%.

<sup>1</sup>HNMR (500 MHz, MeOD): 2.90 (2H, m), 3.25 (2H, m), 3.40-3.48 (m 3H), 3.50 (t, J=8.5 Hz, 1H), 3.63 (dd, J=9.5, 10.5 Hz, 1H), 7.12 (2H, d, J 5.5), 7.24-7.40 (3H, m) Análisis elemental; calculado para C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>ClNO<sub>5</sub>: C, 52,58; H, 6,93; Cl, 11,09; N, 4,38; Encontrado: C, 52,29; H, 6,99; Cl, 11,01; N, 4,22.

### Ejemplo 24

20 *Efecto de compuestos de la invención sobre distintas glicosidasas de distintas especies y origen*

En general todos los compuestos evaluados se ensayaron a la misma concentración que el sustrato. Cuando su actividad inhibitoria era superior a un 40% se determinó el parámetro IC<sub>50</sub>, el tipo de inhibición y la constante de inhibición (K<sub>i</sub>). En caso contrario en la Tabla I se indica el % de inhibición obtenido, o nada en el caso que resultaran inactivos.

La actividad de los compuestos sobre la  $\alpha$ -glucosidasa neutra de levadura de panadero (A) se determina empleando la enzima comercial (Sigma) y 1 mM  $\alpha$ -p-Nitrofenilglucósido como sustrato. Las incubaciones se realizan en 100 mM tampón fosfato a pH 7.2, se paran después de 3 minutos con Tris 1 M y se determina la cantidad de p-nitrofenol formado mediante detección de UV a 405 nm (Ver Tabla I).

La actividad de los compuestos sobre la  $\alpha$ -fucosidasa de riñón bovino (B) se determina empleando la enzima comercial (Sigma) y 0.12 mM  $\alpha$ -p-Nitrofenilglucósido como sustrato. Las incubaciones se realizan en 25 mM tampón acetato sódico a pH 5.5, se paran después de 7 minutos con Tris 1 M y se determina la cantidad de p-nitrofenol formado mediante detección de UV a 405 nm (Ver Tabla I).

La actividad de los compuestos sobre la  $\beta$ -glucosidasa de almendra (C) se determina empleando la enzima comercial (Sigma) y 1 mM  $\beta$ -p-Nitrofenilglucósido como sustrato. Las incubaciones se realizan en 50 mM tampón fosfato a pH 5.8, se paran después de 3 minutos con Tris 1 M y se determina la cantidad de p-nitrofenol formado mediante detección de UV a 405 nm (Ver Tabla I).

La actividad de los compuestos sobre la glucocerebrosidasa lisosomal (D) se determina sobre suspensiones de membranas de hígado de rata, siguiendo un procedimiento descrito por Overkleeft (Overkleeft *et al J. Biol. Chem.* 273: 26522-26527, 1998). Para ello, se utiliza 4-metilumbeliferil-beta-D-glucopiranosido 1 mM como sustrato en tampón McIlvaine (100 mM citrato sódico y 200 mM fosfato sódico, pH 5.2) (ver Tabla I). Después de 30 minutos de incubación se añade tampón glicina/NaOH 100 mM (hasta pH 10.6) para detener la reacción enzimática. La cantidad de 4-metilumbeliferona formada se determina con un fluorómetro a 355 nm (excitación) y 460 nm (emisión). Por otro lado, la actividad imiglucerasa (E) se determina empleando el enzima comercial (glucocerebrosidasa recombinante de Genzyme (CEREZYME)) con 4-metilumbeliferil-b-D-glucopiranosido 2.4 mM en presencia de 0.25% (peso/volumen) de taurocolato sódico y 0.1% (v/v) de Tritón X-100 en tampón McIlvaine (pH 5.2) Después de 10 minutos de incubación se añade tampón glicina/NaOH 100 mM (hasta pH 10.6) para detener la reacción enzimática. La cantidad de 4-metilumbeliferona formada se determina con un fluorómetro a 355 nm (excitación) y 460 nm (emisión) (ver Tabla I).

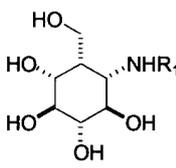
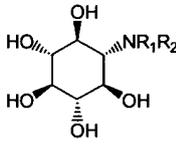
Las disoluciones enzimáticas se incuban a 37°C en ausencia (como experimento control) o presencia de concentraciones crecientes (0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 400, 800 y 1000 microM) de los compuesto a evaluar, por ejemplo, el compuesto (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol, preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17 (R1,R2/Oc,H; ver Tabla I). En este último caso, de la representación del porcentaje de inhibición respecto al control frente al logaritmo de la concentración de inhibidor se obtiene un IC<sub>50</sub> de 352 microM para el enzima glucocerebrosidasa lisosomal (D) y de 15.7 microM para la imiglucerasa (E). La incubación de la Imiglucerasa (E) con diferentes concentraciones de sustrato (0.8, 1.2, 1.6, 2.4 mM) y de inhibidor (0, 15, 20 microM) permiten ver que el compuesto (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol es un inhibidor competitivo con una muy buena afinidad por el enzima (K<sub>i</sub>= 2.4 microM). Este compuesto es, además específico, ya que no muestra una afinidad destacable por otras glicosidasas ensayadas.

65

# ES 2 289 853 B1

TABLA I

Inhibición enzimática por compuestos de fórmula general I

		Inhibición enzimática IC50/Ki (microM)					
		R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub>	A&	B#	C#	D#	E#
	Bu		1000/998				(34%)
	2-PhEt		122/118			(34%)	876/249
	OC		(30%)*	800/300		386/113	21.5/5.3
	H, H						
	Bu, H		254/293	807/448	1144/1118	(35%)	15/2.7
	2-PhEt, H		(47%)			420/163	16/2.2
	<b>OC, H</b>		<b>(24%)</b>			<b>352/136</b>	<b>15.7/2.4</b>
	COC <sub>7</sub> H <sub>15</sub> , H				(26%)	498/208	(30%)
	COC <sub>13</sub> H <sub>27</sub> , H						
	COCH <sub>2</sub> OPh					412/168	
	CONHC <sub>8</sub> H <sub>17</sub> , H					(34%)	1219/285
2-PhEt, COC <sub>7</sub> H <sub>15</sub>			961/745			350/43	12/0.9

- A, alfa-glucosidasa de levadura de panadero, sustrato: 1 mM alfa-*p*-Nitrofenilglucósido;  
 B, beta-fucosidasa riñón bovino, sustrato: 0.12 mM *p*-Nitrofenilfucósido;  
 C, beta-glucosidasa almendra, sustrato: 1 mM alfa-*p*-Nitrofenilglucósido  
 D, Glucocerebrosidasa lisosomal, sustrato: 4-metillumbeliferil-beta-D-glucopiranosido 1 mM;  
 E, Imiglicerasa, sustrato: 4-metillumbeliferil-beta-D-glucopiranosido 2.4 mM.  
 & Los compuestos activos son inhibidores no competitivos  
 # Los compuestos activos son inhibidores competitivos  
 \* % inhibición a 1 mM

Los compuestos bicíclicos de fórmula general I que se muestran en la Tabla II son buenos inhibidores de la glucoce-rebrosidasa (no se muestran los datos) y de la imiglicerasa, ya que presentan valores de IC50 del orden de micromolar. Además, son muy selectivos ya que no inhiben las otras glicosidasas estudiadas. Un estudio más a fondo permitió de-terminar que su inhibición era de tipo irreversible con una potencia inhibidora del mismo orden que el epóxido de condritol.

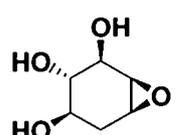
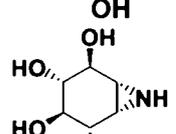
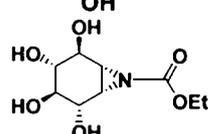
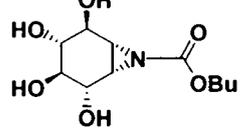
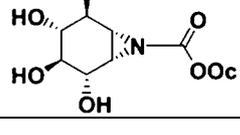
Para comprobar que la inhibición es irreversible se incubó el enzima imiglicerasa con el inhibidor (2.5, 5, 7.5, 10 microM) y a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos) se toman alícuotas, se diluyen y se determina la actividad residual de la enzima tal como se ha descrito más arriba. Se calculan los cocientes de la actividad enzimática a cada concentración de inhibidor y tiempo, respecto al valor al tiempo 0 correspondiente, y se representa el logaritmo neperiano cambiado de signo de estos valores frente al tiempo de incubación con el inhibidor, con lo que se obtienen una recta para cada concentración de inhibidor. Finalmente, la representación de los inversos de las pendientes de dichas rectas frente a los inversos de las concentraciones de inhibidor permiten calcular los valores de *k<sub>i</sub>* (velocidad de inhibición) y *K<sub>i</sub>* (constante de afinidad). El cociente de estos dos valores (*k<sub>i</sub>*/*K<sub>i</sub>*) permite definir la efectividad del inhibidor.

# ES 2 289 853 B1

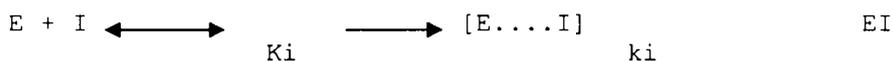
TABLA II

*Inhibición irreversible de la imiglucerasa por compuestos bicíclicos de tipo epóxido o aziridina*

5

		Glucosilceramida hidrolasa				
		IC <sub>50</sub> /μM	ki/min <sup>-1</sup>	Ki/mM	ki/Ki	
15	Conduritol B epóxido		4.7	0.1076	0.0035	30.6
20	Compuesto bicíclico		2.2	0.0652	0.0025	25.8
25	Compuesto bicíclico		1.8	0.0590	0.0020	29.5
30	Compuesto bicíclico		3.2	0.0415	0.0018	23.1
35	Compuesto bicíclico		6.1	0.0348	0.0017	20.5

40



45

K<sub>i</sub> (mM): afinidad

k<sub>i</sub> (min<sup>-1</sup>): velocidad de inactivación

k<sub>i</sub>/K<sub>i</sub> (mM<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>): efectividad del inhibidor

## 50 Ejemplo 25

*Activación de la beta-glucocerebrosidas asociada a la enfermedad de Gaucher mediante su interacción con el compuesto (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol y (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-fenetilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol*

55

Se mide la capacidad activadora de las compuestos de la invención empleando el procedimiento de desnaturalización térmica descrito por Sawkar (Sawkar *et al.* PNAS, 99: 15428, 2002). Para ello se emplea el enzima comercial imiglucerasa que se mantiene a 48°C en tampón McIlvaine (pH 5.2) en ausencia (experimento control) o presencia de concentraciones crecientes (50, 100 y 150 microM) de (1R, 2S, 3s, 4R, 5S, 6s) 6-octilaminociclohexano-1, 2, 3, 4, 5-pentaol y (1R, 2S, 3s, 4R, 5S, 6s) 6-fenetilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol preparados de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17 y del Ejemplo 23, respectivamente. A intervalos constantes se retira una alícuota de dicha disolución y se determina la actividad hidrolítica del enzima sobre 4-metilumbeliferil-b-D-glucopiranosido 2.4 mM, utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 23. La estabilización del enzima por el compuesto se determina por el aumento de actividad hidrolítica respecto al enzima no tratado. Así, puede observarse en la parte superior de las Figuras 5 y 6 como la pérdida de actividad de la enzima es menor en presencia de los mencionados compuestos utilizados, especialmente con el compuesto de la Figura 6 lo que constituye una prueba de la capacidad de dichos compuestos para actuar como chaperona química del enzima. En la parte inferior de las Figuras 5 y 6, se observa el

65

## ES 2 289 853 B1

incremento de actividad del enzima tratado con los compuestos de formula general I indicados frente al enzima no tratado en condiciones de desnaturalización térmica.

5 La utilización de los compuestos de la presente invención para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades humanas se realizará a través de composiciones farmacéuticas que comprendan al menos una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos definidos por la fórmula general como principio activo y excipientes o disolventes farmacéuticamente aceptables.

### Ejemplo 26

10 *El compuesto (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol no actúa sobre la actividad de glucosilceramida sintasa*

15 Se obtienen microsomas de hígado de ratas Sprage-Dawley de acuerdo con el procedimiento descrito por Paul *et al.* (Paul *et al* en *J. Biol. Chem.* 271: 2287-2293, 1996). La proteína microsomal - glucosilceramida sintasa - se incuba durante 10 minutos a 37°C con *N*-octanoil-D-esfingosina complejada con seroalbúmina bovina (0.12 mM) y NADP 1.6 mM en tampón TRIS-HCl 50 mM (pH 7.4) en ausencia (experimento control) o presencia de concentraciones crecientes (0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 400, 800 y 1000 microM) del compuesto de la invención (1R,2S,3s,4R,5S,6s) 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol, preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17. Tras la adición de 0.04 mM [<sup>14</sup>C]UDP-glucosa (2 mCi/mmol), las incubaciones se prolongan durante 35 minutos y se detiene la reacción enzimática por adición de 0.5 mL de una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1). La [<sup>14</sup>C]-glucosyl-*N*-octanoil-D-esfingosina formada se extrae y cuantifica en un contador de centelleo líquido siguiendo el procedimiento descrito por Platt *et al* (Platt *et al* *J. Biol. Chem.* 269: 27108-27114, 1994). A ninguna de las concentraciones ensayadas se observó efecto del compuesto sobre el enzima (datos no presentados). En un experimento independiente, utilizando como inhibidor 200 microM de *N*-butildesoxinojirimicina, se encontró un 90% de inhibición de la glucosilceramida sintasa. Así pues todos los compuestos de fórmula general I que son inhibidores de la glucocerebrosidasa son específicos para este enzima ya que presentan una baja o nula afinidad sobre enzimas que hidrolizan glicósidos y sobre el enzima responsable de la síntesis del sustrato natural, la glucosilceramida. Esto último es una ventaja con respecto al compuesto desoxinojirimicina (DNJ) y sus derivados.

30

35

40

45

50

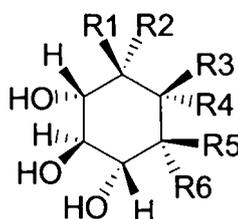
55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto modulador de la enzima beta-glucosidasa útil para el tratamiento de enfermedades humanas **carac-**  
**terizado** porque es un ciclohexano hexasustituido de fórmula general I,



donde

- R1 y R2 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH

- R3 y R4 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NR<sub>7</sub>R<sub>8</sub>,

- R5 y R6 son distintos entre sí y se eligen entre los siguientes grupos: H, OH, CH<sub>2</sub>OH, NR<sub>9</sub>R<sub>10</sub>

- R7, R8, R9 y R10 son iguales o diferentes entre sí y pueden o no formar un ciclo y se seleccionan entre el conjunto integrado por:

i) Hidrógeno,

ii) un radical alquilo, alqueno o alquino, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición, o

iii) Un radical -CN, -C(=O)R<sup>11</sup>, -C(=S)R<sup>11</sup>, C(=NR<sup>12</sup>)R<sup>11</sup> o -C(=NR<sup>12</sup>)R<sup>11</sup>, -S(=O)R<sup>11</sup>, SO<sub>2</sub>-R<sup>11</sup> donde R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> pueden ser iguales o distintos entre sí, pueden o no formar un ciclo y se seleccionan de entre los siguientes grupos:

iii.i Hidrógeno

iii.ii cualquier radical alquilo, alqueno o alquino, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición.

iv) un grupo -(C=XR<sup>13</sup>)-Y-R<sup>14</sup> donde X puede ser O, S ó N; Y puede ser O, S, NH; donde R<sup>13</sup> y R<sup>14</sup> pueden ser iguales o diferentes entre sí, y pueden o no formar un ciclo y se seleccionan entre los siguientes grupos:

iv.i Hidrógeno

iv.ii Cualquier radical alquilo, alqueno o alquino, lineal, ramificado o cíclico, o cualquier radical arilo, que pueden presentar o no heteroátomos y contener o no sustituyentes en cualquier posición, o cualquier heterociclo, que a su vez puede contener sustituyentes en cualquier posición.

v) Fenetilo

2. Compuesto modulador según la reivindicación 1 **caracterizado** porque es un activador de la enzima beta-glucosidasa.

3. Compuesto modulador según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque es el compuesto 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

4. Compuesto modulador según las reivindicaciones 1 y 2 **caracterizado** porque es el compuesto 6-fenilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

5. Compuesto modulador según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque es un estereoisómero, un polimorfismo, un solvato, una sal de adición farmacéuticamente aceptable, o una mezcla de cualquiera de los compuestos de fórmula general I.

## ES 2 289 853 B1

6. Procedimiento de síntesis del compuesto modulador según las reivindicaciones 1 a la 5 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- a) obtención de los productos de apertura en forma de ciclohexanopoliol mediante la reacción de un epoxi-ciclohexano con nucleófilos o haluros adecuados,
- b) transformación de los ciclohexanopoliol en otros intermedios de síntesis mediante reacciones de sustitución, alquilación o acilación de la función nitrogenada, y finalmente
- c) la obtención del ciclohexanopoliol mediante una reacción de desbencilación.

7. Procedimiento de síntesis según la reivindicación 6 **caracterizado** porque en la etapa a) de obtención de ciclohexanopoliol, opcionalmente, el epoxi-ciclohexano de partida se substituye por una ciclohexanoaziridina.

8. Procedimiento de síntesis según la reivindicación 6 **caracterizado** porque los compuestos de tipo epoxi-ciclohexano pueden hacerse reaccionar (etapa a)) de manera selectiva empleando diversos métodos pertenecientes al siguiente grupo:

- a) nucleófilos de nitrógeno, tales como azidas metálicas, aminas, sales de amidas o carbamatos, sales de ftalimida,
- b) nucleófilos de oxígeno tales como ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles o sus sales, y
- c) haluros metálicos o derivados halogenados.

9. Uso del compuesto modulador según las reivindicaciones 1 a la 5 para la fabricación de una composición farmacéutica moduladora de la actividad de la enzima beta- glucosidasa útil para el tratamiento y profilaxis de enfermedades humanas.

10. Uso del compuesto modulador según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la composición farmacéutica es útil para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

11. Uso del compuesto modulador según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la composición farmacéutica es útil para el tratamiento del cáncer.

12. Composición farmacéutica o medicamento que modula la actividad de la enzima beta-glucosidasa y se **caracteriza** porque comprende un compuesto modulador según las reivindicaciones 1 a la 5 en cantidad terapéuticamente efectiva junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 **caracterizada** porque el compuesto modulador es el compuesto 6-octilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

14. Composición farmacéutica según la reivindicación 12 que se **caracteriza** porque el compuesto modulador es el compuesto 6-fenilaminociclohexano-1,2,3,4,5-pentaol.

FIGURA 1

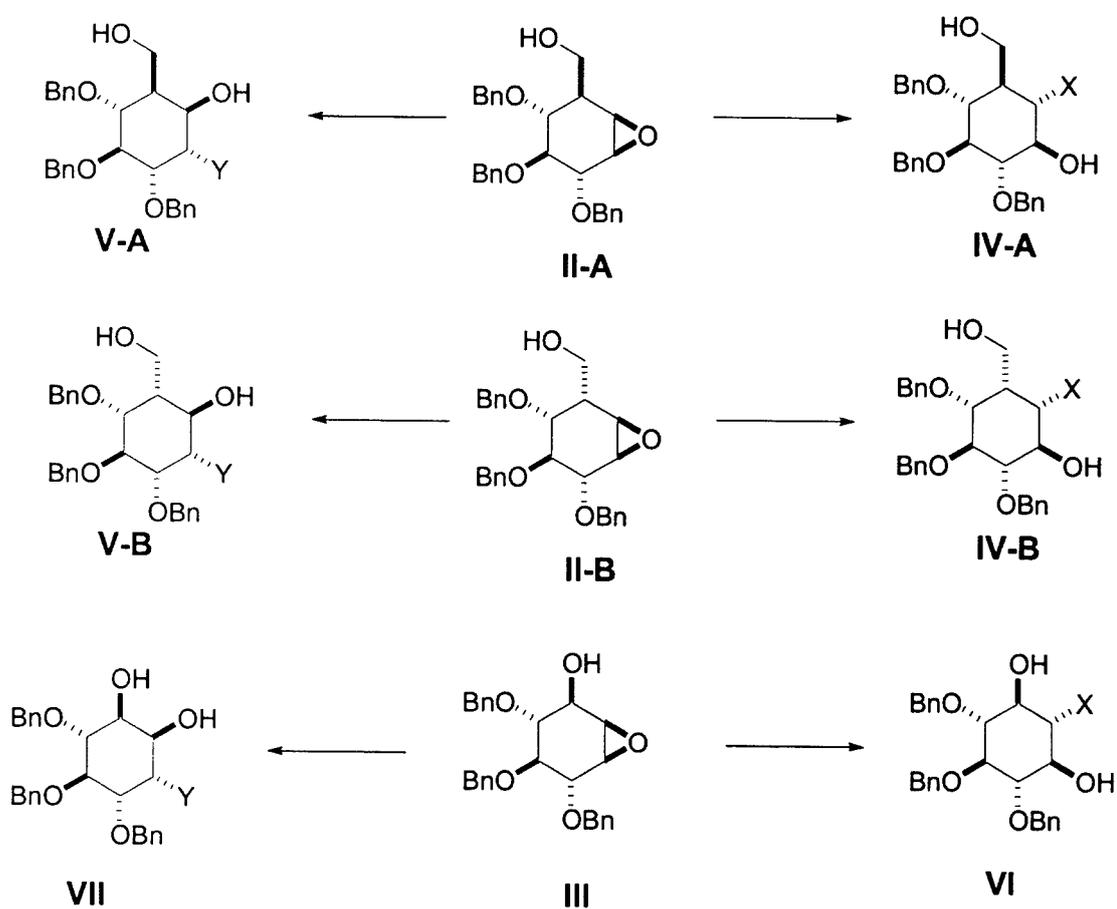
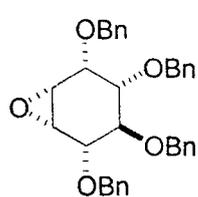
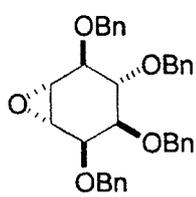


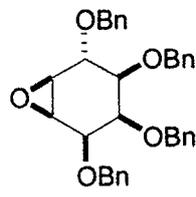
FIGURA 2



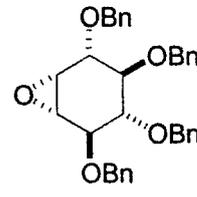
VIII-A



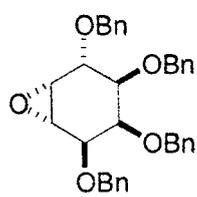
VIII-B



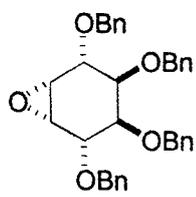
VIII-C



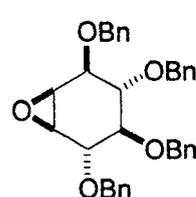
VIII-D



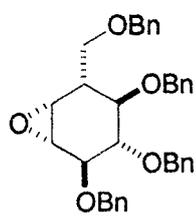
VIII-E



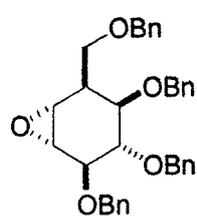
VIII-F



VIII-G



IX-A



IX-B

FIGURA 3

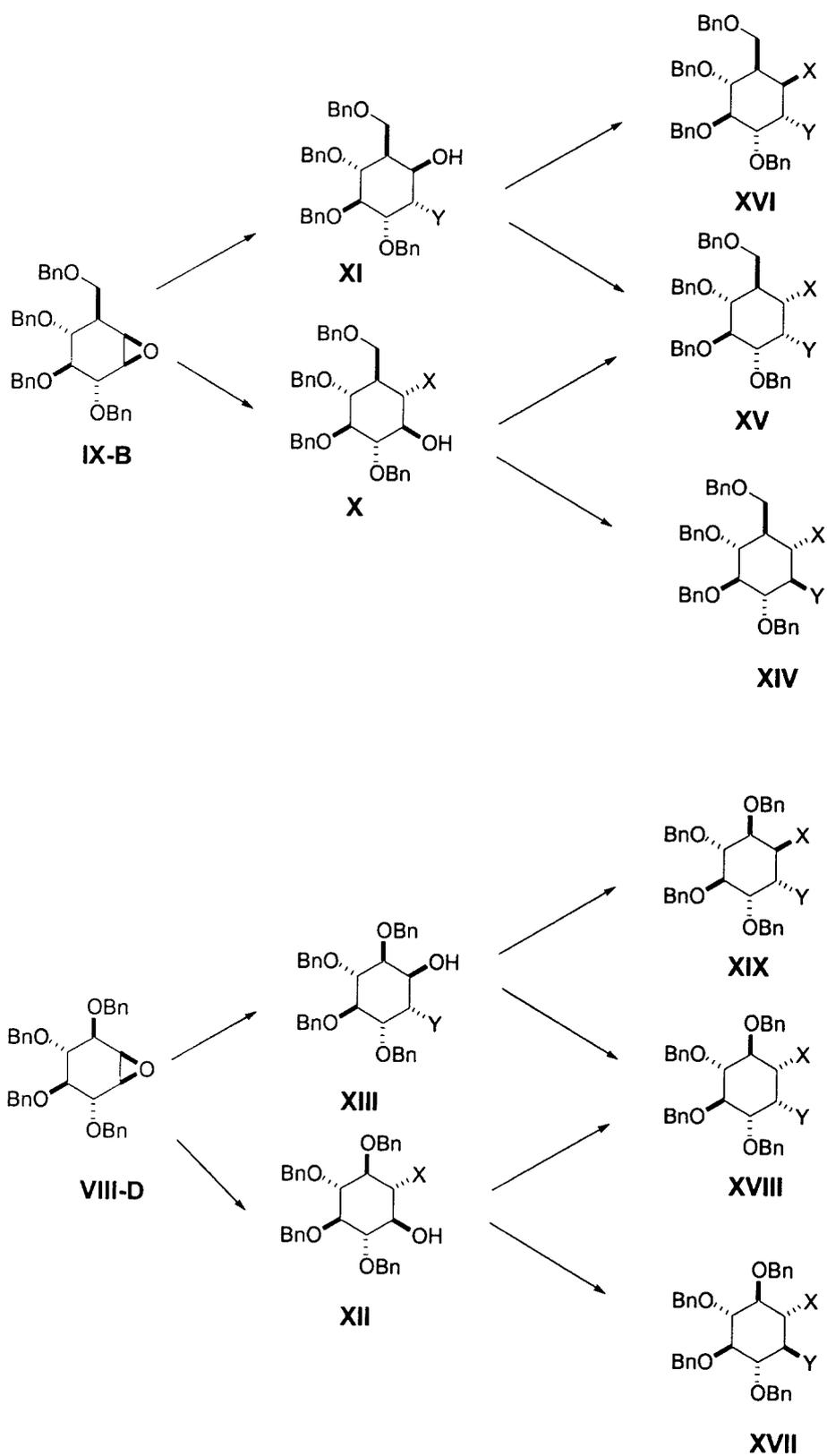




FIGURA 5

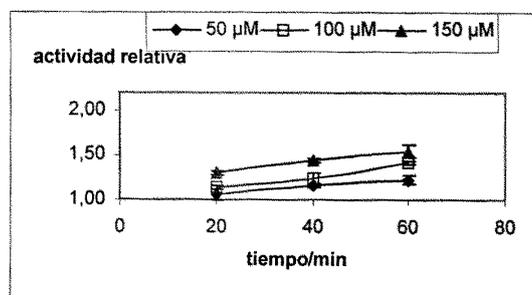
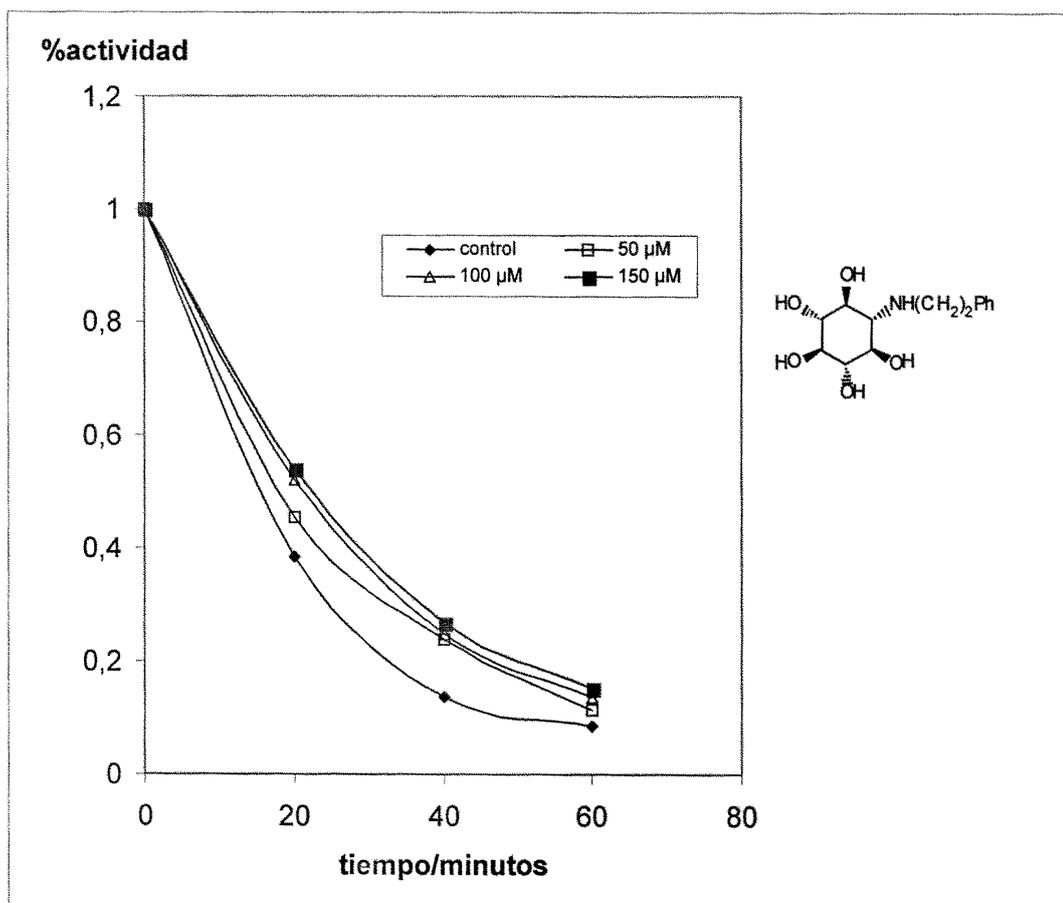
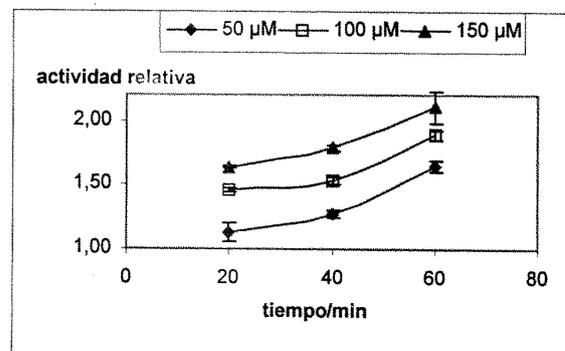
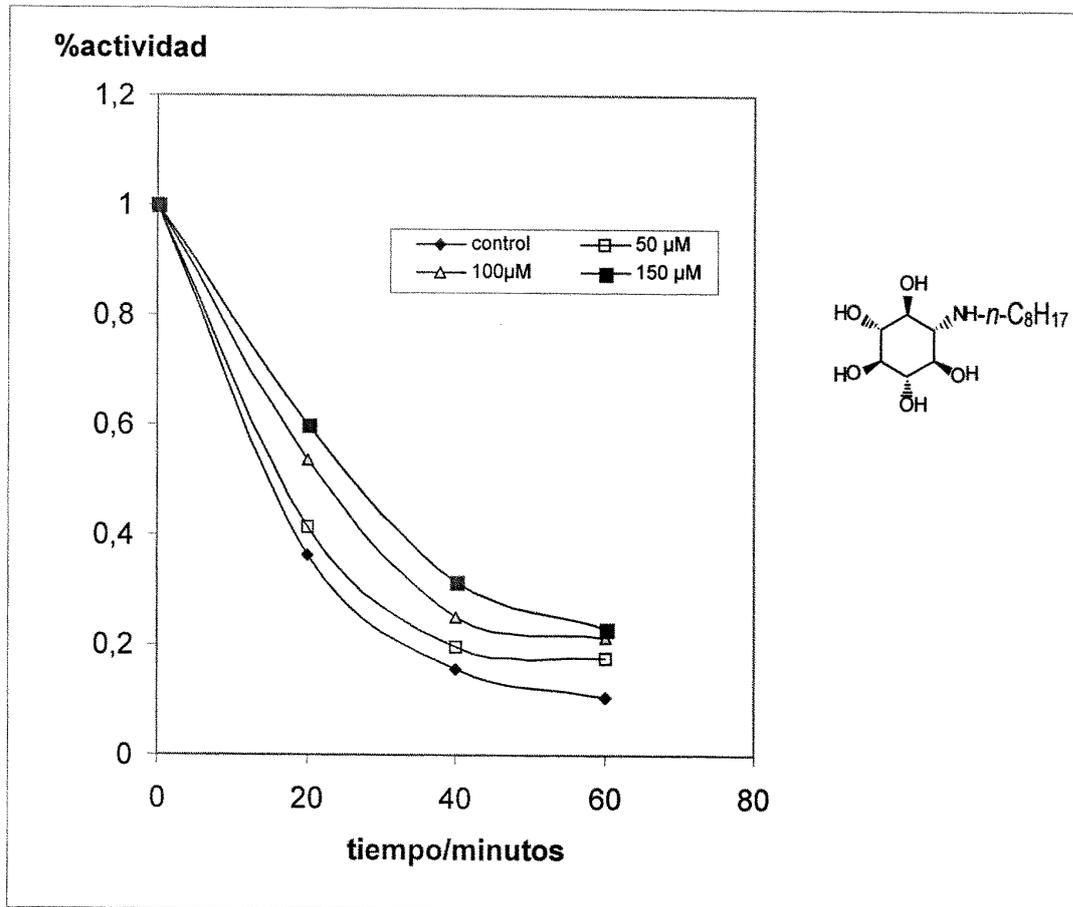


FIGURA 6





OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 289 853

② Nº de solicitud: 200500370

③ Fecha de presentación de la solicitud: **18.02.2005**

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A61K 31/7008** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KAMEDA, et al.: "Valiolamine, a new alfa-glucosidase inhibiting aminocyclitol produced by streptomyces hygroscopicus". The Journal of antibiotics, 1984, vol. 37, páginas 1301-1307. Página 1301, figura 1.	1,2,9
X	MAHMUD, T. : "The C7N aminocyclitol family of natural products". Nat. Prod. Rep, 2003, vol. 20, páginas 137-166. Página 138, compuesto 18.	1,2,9
X	OGAWA,S. et al.: "Synthetic studies on the validamycins. 5. Synthesis of DL-hydroxyvalidamine and DL-valienamine". J. Org. Chem. 1983, vol. 48, páginas 1203-1207. Página 1203, compuesto 3.	1,2
A	FALSHAW, A. et al.: "New syntheses of 1D- and 1L-1,2-anhydro-myo- inositol and assessment of their glycosidase inhibitory activities". Carbohydrate Research, 2000, vol. 329, páginas 301-308. Página 301, compuesto 3.	1-14
A	HIYAMA, K. et al.: "N-(6-aminohexyl)-1-deoxy-1-aminocyclitol. A potent inhibitor of beta-glucosidases". Chemistry Express, 1986, vol. 1, páginas 303-306. Página 303, compuesto 4.	1-14

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la  
misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación  
de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha  
de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.12.2007

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/1