



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 017 659**

⑫ Int. Cl.:
C07F 9/10
(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 20214357 (4)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2025 EP 3842443**

④ Título: **Procedimientos para la síntesis de enfingomielinas y dihidroesfingomielinas**

⑩ Prioridad:

**15.03.2013 US 201361801641 P
23.07.2013 EP 13306056**

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.05.2025

⑦ Titular/es:

**ABIONYX PHARMA (100.00%)
33-43 Avenue Georges Pompidou, Bâtiment D
31130 Balma, FR**

⑦ Inventor/es:

**ONICIU, DANIELA CARMEN;
HECKHOFF, STEFAN;
OSWALD, BENOIT;
REBMAN, PETER;
PEER, ANDREAS;
GONZALEZ, MIGUEL y
SAUTER, PATRIK**

⑦ Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 3 017 659 T3

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

DESCRIPCIÓN

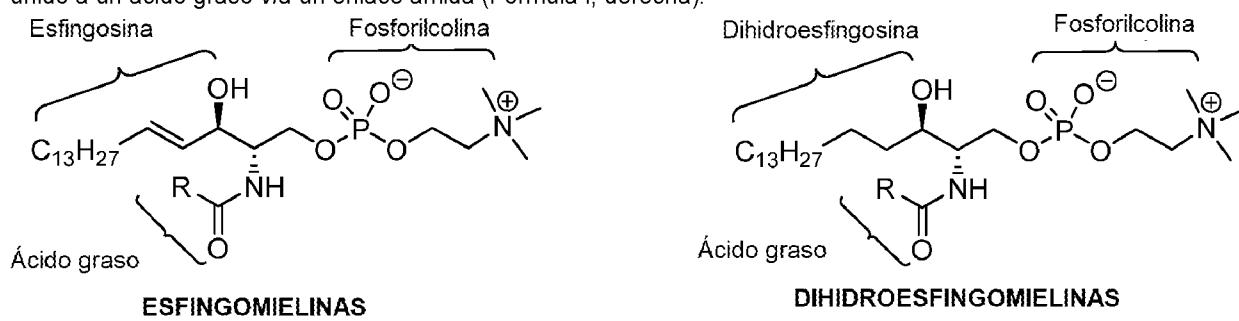
Procedimientos para la síntesis de esfingomielinas y dihidroesfingomielinas

5 REFERENCIA A LAS SOLICITUDES ANTERIORES

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 61/801,641, presentada el 15 de marzo de 2013 y la solicitud de patente europea N.º 13306056.6, presentada el 23 de julio de 2013.

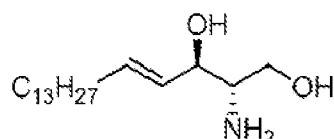
10 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las esfingomielinas son los componentes fosfolípidos principales de membranas biológicas y lipoproteínas plasmáticas. Las esfingomielinas consisten en un núcleo ceramida (esfingosina unida a un ácido graso vía un enlace amida) y un grupo de cabeza de fosforilcolina (Fórmula 1, izquierda). Las dihidroesfingomielinas son los homólogos saturados de esfingomielinas, y tienen un núcleo de ceramida saturada, más específicamente, dihidroesfingosina unido a un ácido graso vía un enlace amida (Fórmula 1, derecha).

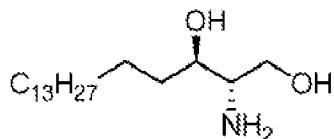


Fórmulas 1

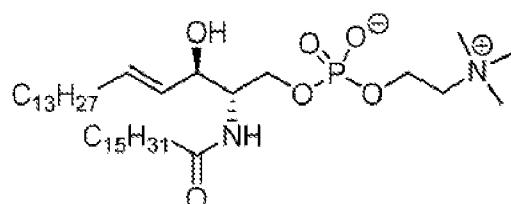
- 20 La esfingosina que se encuentra típicamente en esfingomielina de origen natural es *D*-eritro-esfingosina un aminoacohol de 18 carbonos con una cadena hidrocarbonada insaturada que tiene una configuración estereoquímica de *D*-eritro. El nombre IUPAC para la esfingosina es (2S,3R,E)-2-aminoctadec-4-eno-1,3-diol (Compuesto A). La dihidroesfingosina, *D*-eritro-dihidroesfingosina, es su homólogo saturado con el nombre IUPAC (2S,3R)-2-aminoctadecano-1,3-diol (Compuesto B).
- 25 Las esfingomielinas disponibles comercialmente son normalmente productos naturales que comprenden mezclas de esfingomielinas de origen natural. La composición real de la mezcla varía dependiendo del origen biológico y contiene varias longitudes de cadenas de ácidos grasos. La *N*-palmitoil-esfingomielina es un componente principal en las esfingomielinas naturales.
- 30 La *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto C), uno de los isómeros de palmitoil esfingomielina, que tiene el nombre IUPAC *N*-(2S, 3R, *E*)-1,3-dihidroxioctadec-4-en-2-il)palmitamida, se cree que es el principal isómero de origen natural. Se corresponde a la dihidroesfingomielina, *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto D), tiene el nombre IUPAC (2S,3R)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadecil (2-(trimetilamonio)ethyl) fosfato.



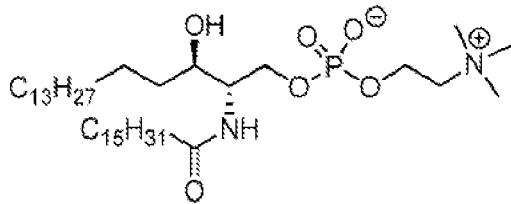
Compuesto A



Compuesto B



Compuesto C

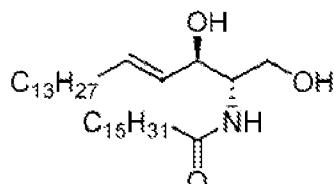


Compuesto D

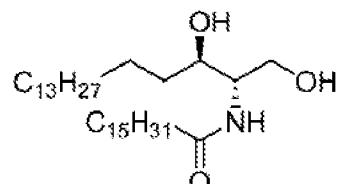
5

Las alternativas sintéticas industrialmente y económicamente relevantes de este origen natural de esfingomielina todavía no se han desarrollado. Los mecanismos sintéticos conocidos en la técnica no han sido útiles para la síntesis a gran escala de esfingomielinas, particularmente aquellas con ácidos grasos que tienen de 12 a 25 carbonos.

10 Las ceramidas *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingosina (Compuesto E) y *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-dihidroesfingosina (Compuesto F) son intermedios en la síntesis de *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingomielina y *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-dihidroesfingomielina, respectivamente.



Compuesto E



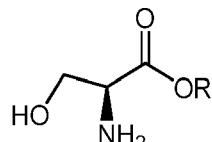
Compuesto F

15 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN**

En una realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D*-*eritro*-esfingosina, que comprende las etapas de:

a) proteger el grupo de amino de un éster de *L*-serina que tiene la siguiente estructura:

20



25

en la que R es un grupo alquilo C1-5, o una sal del mismo, con un grupo *terc*-butoxicarbonilo, que da como resultado un éster de *L*-serina protegido con Boc;

b) permitir que el éster de *L*-serina protegido con Boc reaccione con 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido bencenosulfónico en condiciones efectivas para producir el correspondiente éster de alquilo C1-C5 del ácido (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico;

c) permitir que el correspondiente éster de alquilo C1-C5 de ácido (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico reaccione con metilfosfonato de dimetilo en presencia de n-butil-litio en condiciones efectivas

para producir (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etyl)-2,2-dimetiloxazolidina;
 d) permitir que la (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxoetyl)-2,2-dimetiloxazolidina reaccione con 1-tetradecanal en condiciones efectivas para producir (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina;

- 5 e) permitir que la (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina reaccione con borohidruro de sodio y tricloruro de cerio en condiciones efectivas para producir (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxihexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina; y
 f) eliminar el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc) de (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina en condiciones efectivas para producir *D*-eritro-esfingosina.

10 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina, que comprende las etapas de:

- a) permitir que (1*R*, 2*R*, 5*R*)(+)-2-hidroxi-3-pinanova reaccione con etilglicinato en condiciones efectivas para producir (1*R*, 2*R*, 5*R*)-etyl-((2-hidroxipinan-3-ileno)amino)acetato;
 15 b) permitir que (1*R*, 2*R*, 5*R*)-etyl-((2-hidroxipinan-3-ileno)amino)acetato (Compuesto IIIb) reaccione con 2-(*E*)-hexadecen-1-al en presencia de triisopropóxido de clorotitanio y trietilamina en condiciones efectivas para producir uno o ambos de 3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicitclo[3.1.1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato de (2*S*,3*R*,*E*)-etilo y 3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicitclo[3.1.1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato de (2*S*,3*R*,*E*)-isopropilo;
 20 a) permitir que el uno o ambos de 3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicitclo[3.1.1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato de (2*S*,3*RE*)-etilo y 3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicitclo[3.1.1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato de (2*S*,3*RE*)-isopropilo reaccionen con ácido hidroclórico en condiciones efectivas para producir uno o ambos de 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*RE*)-etilo y 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*RE*)-propilo;
 25 d) permitir que el uno o ambos de 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*R*,*E*)-etilo y 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*R*,*E*)-propio reaccionen con borohidruro de sodio en condiciones efectivas para producir *D*-eritro-esfingosina; y
 e) permitir que *D*-eritro-esfingosina reaccione con ácido palmitíco en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-*D*-eritro-esfingosina.

30 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina que comprenden las etapas de:

- a) permitir que *D*-eritro-esfingosina reaccione con un ácido graso en condiciones efectivas para producir una *D*-eritro-ceramida;
 35 b) permitir que *D*-eritro-ceramida reaccione con un reactivo de tritilación en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida;
 c) permitir que 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida reaccione con un reactivo benzoilante en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida;
 d) eliminar al grupo tritilo de 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida para producir *D*-eritro-3-O-benzoil-ceramida;
 40 e) permitir que 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida;
 f) permitir que 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir la *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina; y
 45 g) eliminar al grupo benzoilo de *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina en condiciones efectivas para producir la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina.

En una realización particular, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D*-eritro-3-O-benzoil-ceramida, que comprenden las etapas de

- a) permitir que *D*-eritro-ceramida reaccione con un reactivo de tritilación en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida;
 b) permitir que 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida reaccione con un reactivo benzoilante en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida; y
 c) eliminar al grupo tritilo de 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida.

55 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina que comprenden las etapas de:

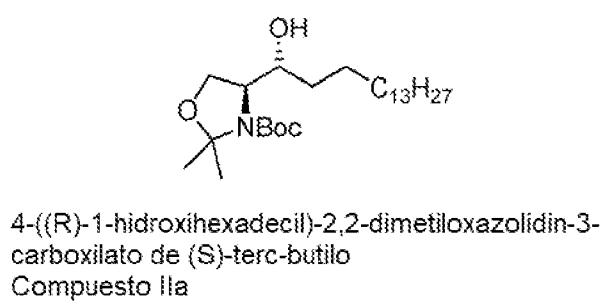
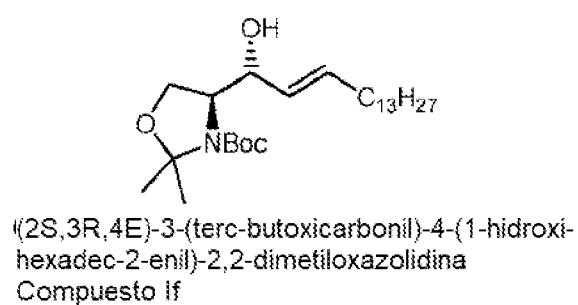
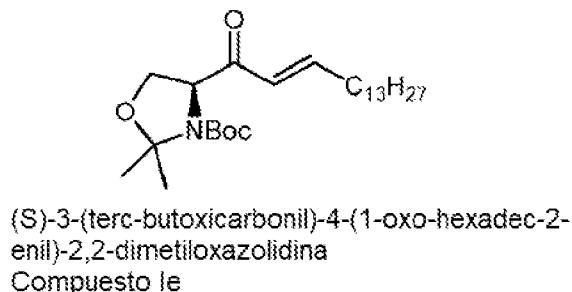
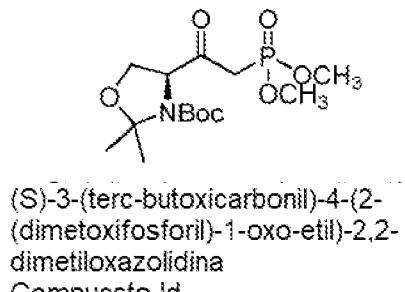
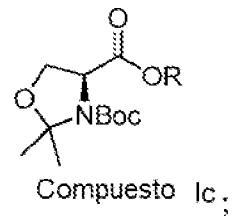
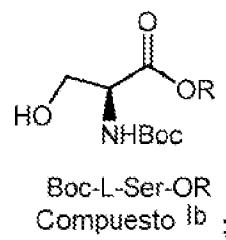
- a) permitir que 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida;
 60 b) permitir que 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida reaccione con trimetilamina para producir la 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida; y
 c) eliminar al grupo benzoilo de 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida en condiciones efectivas para producir la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina.

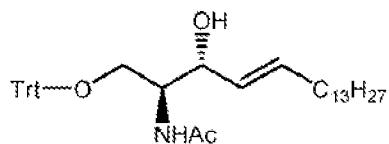
65 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina que comprenden las etapas de:

- a) permitir que una *D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con un ácido graso en condiciones efectivas para producir una *D*-eritro-dihidroceramida;
- b) permitir que la *D*-eritro-dihidroceramida reaccione con un agente trilitante en condiciones efectivas para producir una 1-O- trilit-*D*-eritro-dihidroceramida;
- 5 c) permitir que la 1-O- trilit-*D*-eritro-dihidroceramida reaccione con un agente benzoilante en condiciones efectivas para producir 1-O- trilit-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida;
- d) eliminar al grupo trilito de 1-O- trilit-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida en condiciones efectivas para producir una 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida;
- 10 e) permitir que la 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)dihidroceramida;
- f) permitir que la 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano) dihidroceramida reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir una *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina; y
- 15 g) eliminar al grupo benzoilo de la *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina en condiciones efectivas para producir la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina.
- 15 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprenden las etapas de:
- a) permitir que la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina reaccione con halofosfito de etileno en condiciones efectivas para producir *N*-(2S,3R,E)-1-((1,3,2-dioxafosfolano-2-il)oxi)-3-hidroxioctadec-4-en-2-il)palmitoilamida;
- 20 b) permitir que la *N*-(2S,3R,E)-1-((1,3,2-dioxafosfolano2-il)oxi)-3-hydriodiooctadec-en-2-il)palmitoilamida reaccione con bromo en condiciones efectivas para producir ((2S,3R,E)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadec-4-en-1-il)fosforobromidato de 2-bromoetilo; y
- c) permitir que el ((2S,3R,E)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadec-4-en-1-il)fosforobromidato de 2-bromoetilo reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina.
- 25 En una realización particular, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina, que comprenden las etapas de:
- a) permitir que la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con clorofosfito de etileno en condiciones efectivas para producir *N*-(2S,3R)-1-((1,3,2-dioxafosfolano-2-il)oxi)-3-hidroxioctadecan-2-il)palmitamida;
- 30 b) permitir que la *N*-(2S,3R)-1-((1,3,2-dioxafosfolano-2-il)oxi)-3-hidroxioctadecan-2-il)palmitamida reaccione con bromo en condiciones efectivas para producir ((2S,3R)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadecil)fosforobromidato de 2-bromoetilo; y
- c) permitir que el ((2S,3R)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadecil)fosforobromidato de 2-bromoetilo reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina.
- 35 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprenden las etapas de:
- a) hacer reaccionar 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida;
- 40 b) hacer reaccionar 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida con trimetilamina en condiciones efectivas para producir *N*-acil-3-O-*D*-eritro-benzoil-esfingomielina; y
- c) eliminar al grupo benzoilo de 3-O-*D*-eritro-benzoil-esfingomielina en condiciones efectivas para producir la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina.
- 45 En otra realización, la presente invención proporciona los siguientes compuestos, que son útiles como intermedios para los procedimientos de la presente invención:

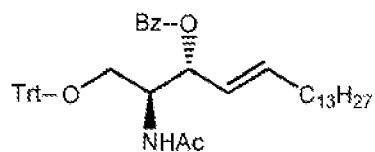


y sales de los mismos;

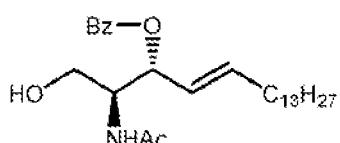




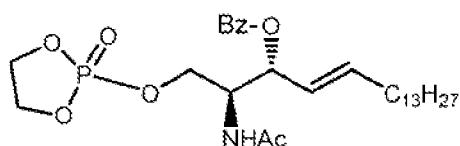
1-O-trityl-D-eritro-ceramida
Compuesto Vc-Trt



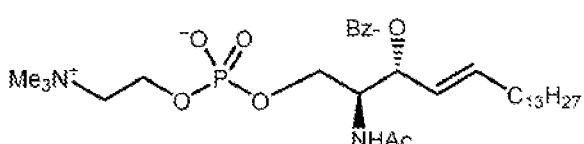
1-O-benzoyl-3-O-trityl-D-eritro-ceramida
Compuesto Vd-Bz-Trt



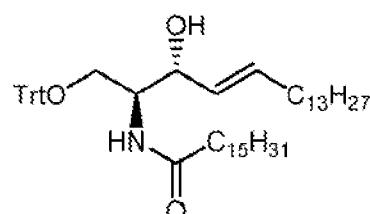
1-O-benzoyl-D-eritro-ceramida
Compuesto Ve-Bz



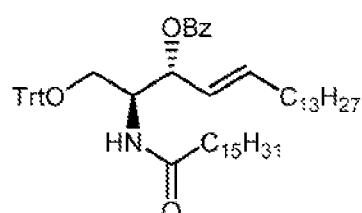
3-O-benzoyl-D-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-ceramida
Compuesto Vf-Bz



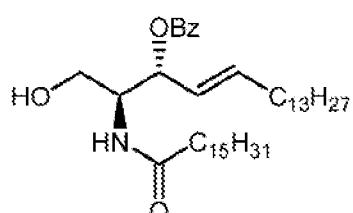
Compuesto Vg-Bz



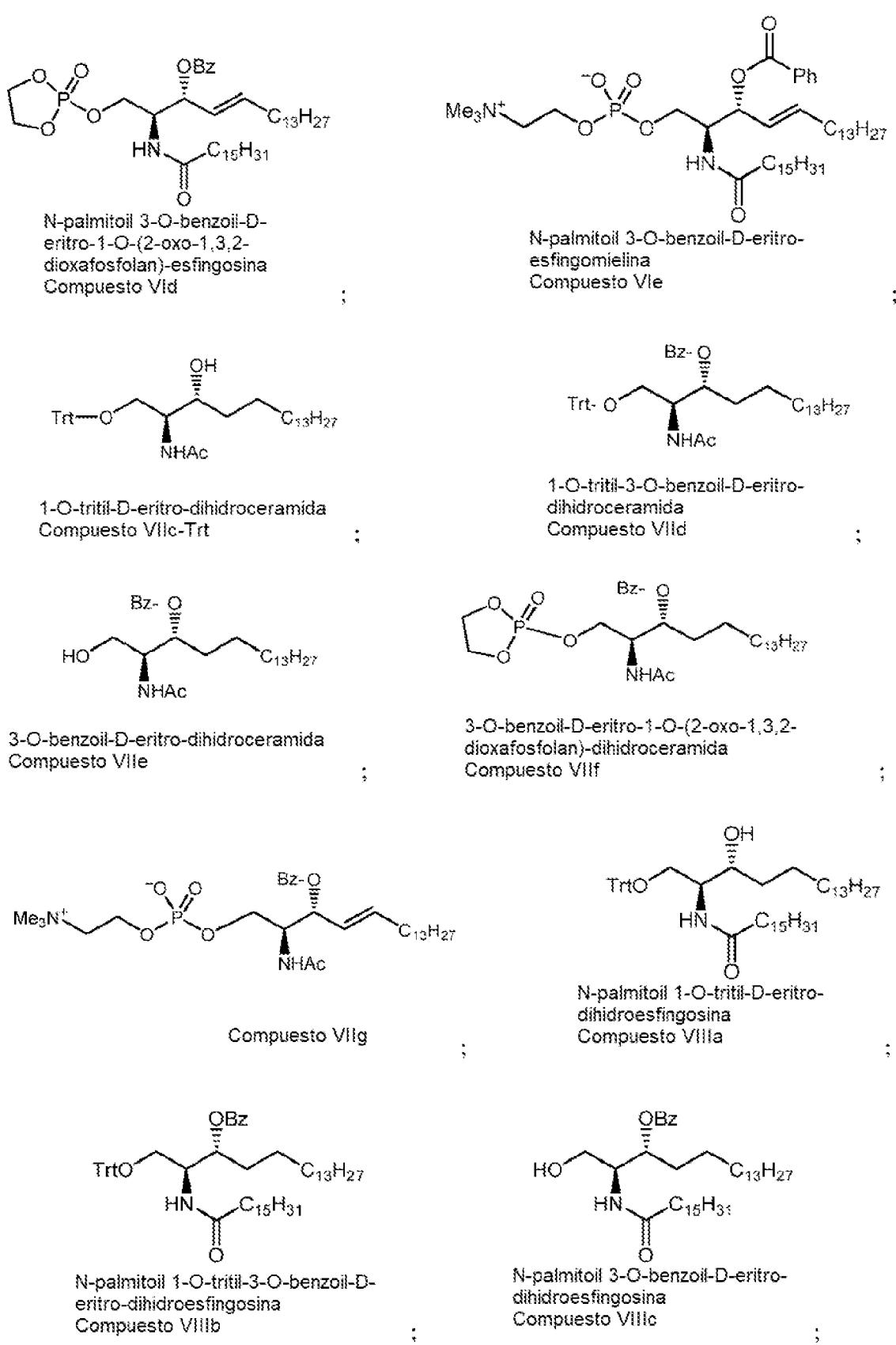
N-palmitoil-1-O-trityl-D-eritro-esfingosina
Compuesto Vla

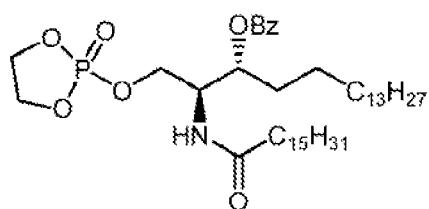


N-palmitoil-1-O-trityl-3-O-benzoyl-D-eritro-esfingosina
Compuesto Vib

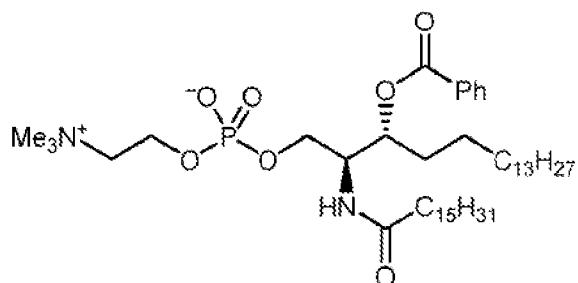


N-palmitoil-3-O-benzoyl-D-eritro-esfingosina
Compuesto Vlc

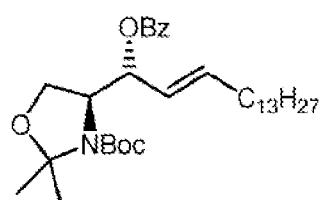




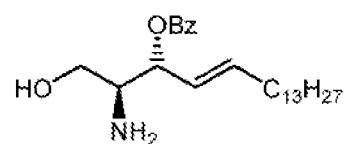
N-palmitoil 3-O-benzoyl-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan) D-eritro-dihydroesfingosina
Compuesto VIIId



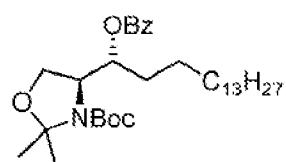
N-palmitoil 3-O-benzoyl-D-eritro-dihydroesfingomielina
Compuesto VIIle



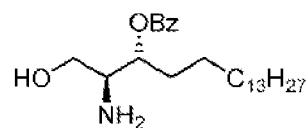
(2S,3R,4E)-3-(tert-butoxycarbonil)-4-(1-benzoyl-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina
Compuesto IXa



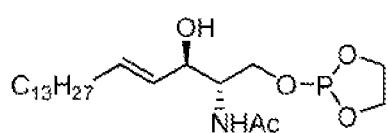
D-eritro-3-O-benzoyl-esfingosina
Compuesto IXb



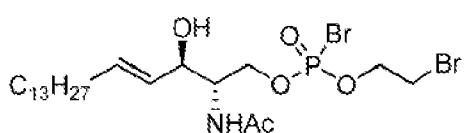
4-((R)-1-(benzoxoloxi)hexadecil)-2,2-dimetiloxazolidin-3-carboxilato de (S)-terc-butilo
Compuesto XIa



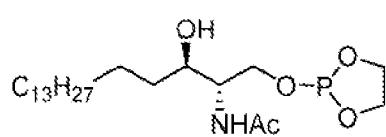
3-O-benzoyl-D-eritro-dihydroesfingosina
Compuesto XIb



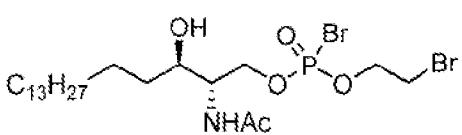
Compuesto XIIa



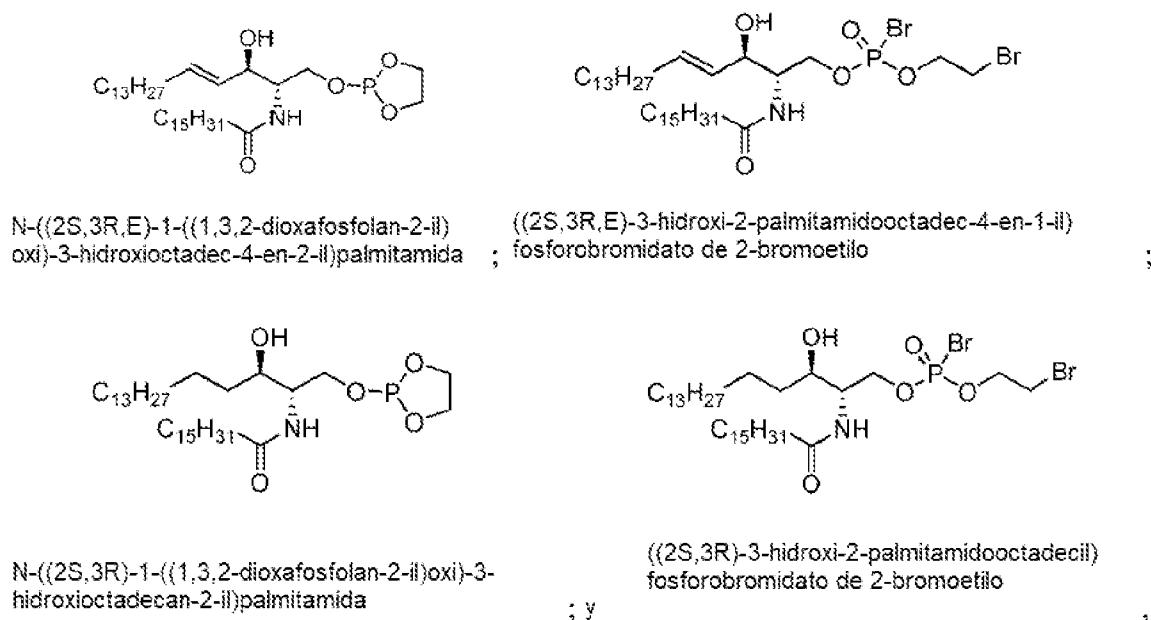
Compuesto XIIib



Compuesto XIVa



Compuesto XIVb



5 en las que Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono; y R es un grupo alquilo C1-5.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- La Figura 1 es un espectro de ^1H RMN de esfingomielina de huevo de origen natural.
- 10 La Figura 2 es un espectro de ^1H RMN de *N*-palmitoil-*D-Eritro*-esfingomielina sintetizada de acuerdo con los procedimientos de la invención.
- 15 La Figura 3 es un espectro de ^1H RMN de *N*-palmitoil-*D-Eritro*-esfingomielina sintetizada de acuerdo con los procedimientos de la invención.
- 20 La Figura 4 es un espectro de ^1H RMN de una muestra obtenida de una mezcla de reacción de ácido *R*-metoxifenilacético y de esfingomielina de huevo de origen natural.
- 25 La Figura 5 es un espectro de ^1H RMN de una muestra obtenida de una mezcla de reacción de ácido *R*-metoxifenilacético y *N*-palmitoil-*D-Eritro*-esfingomielina sintetizados de acuerdo con los procedimientos de la invención.
- 30 La Figura 6 es un espectro de ^1H RMN de una muestra obtenida de una mezcla de reacción de ácido *R*-metoxifenilacético y *N*-palmitoil-*D-Eritro*-esfingomielina sintetizados de acuerdo con los procedimientos de la invención.
- 35 La Figura 7 es un espectro de ^1H RMN de una muestra obtenida de una mezcla de reacción de un equivalente de esfingomielina de huevo y 1,2 equivalentes de una mezcla racémica de ácido *R*-(-)-MPA metoxifenilacético (R-MPA) y ácido *S*-(+)-metoxifenilacético (S-MPA), 1,2 equivalentes de dicitrilochexilcarbodiimida (DCC), y una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (parte inferior) y espectro 1D-TOCSY (Espectroscopía de correlación total unidimensional) que muestra una excitación selectiva del pico de hidrógeno H2 en los ésteres de R-MPA (parte superior) y S-MPA (parte central).
- 40 La Figura 8 es una fotografía de una placa cromatográfica de capa fina de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D-eritro*-esfingosina bruta (Compuesto Vlc). En la columna marcada como "Producto Bruto" la mancha identificada como "A" es *N*-palmitoil-*D-eritro*-esfingosina (Compuesto E), la mancha identificada como "B" es *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D-eritro*-esfingosina (Compuesto Vlc), la mancha identificada como "C" es *N*-palmitoil-1-O-benzoil-*D-eritro*-esfingosina (un producto de migración de grupo benzoilo), la mancha identificada como "D" es trifenilmetanol (tritil-OH) y la mancha identificada como "E" es *N*-palmitoil-1,3-O,O-dibenzoil-*D-eritro*-esfingosina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina. La invención también proporciona procedimientos para la síntesis de *D*-eritro-esfingosina. La invención proporciona también procedimientos para sintetizar *N*-Palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina. La invención también proporciona procedimientos para la síntesis de *D*-eritro-dihidroesfingosina. La invención también proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina y *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina.

5 La invención también proporciona procedimientos para sintetizar *D*-eritro-esfingosinas a escala de kilogramo. En una realización particular, la *D*-eritro-esfingosina es *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina.

10 La invención también proporciona procedimientos para sintetizar *D*-eritro-dihidroesfingosinas a escala de kilogramo. En una realización particular, la *D*-eritro-esfingosina es *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina.

15 La presente invención proporciona los procedimientos para sintetizar esfingomielina. Los procedimientos permiten la síntesis a gran escala de compuestos sustancialmente enantioméricamente puros y el uso de intermedios sustancialmente enantioméricamente puros. Un compuesto que es "sustancialmente enantioméricamente puro" contiene no más de aproximadamente 10 % molar de su enantiómero opuesto correspondiente, en otra realización no más de aproximadamente 5 % molar de su enantiómero opuesto correspondiente, en otra realización no más de aproximadamente 2 % molar de su enantiómero opuesto correspondiente, en otra realización no más de aproximadamente 1 % molar de su enantiómero opuesto correspondiente, y en otra realización no más de aproximadamente 0,1 % molar de su enantiómero opuesto correspondiente. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para preparar esfingomielinas que tienen una longitud de cadena de ácidos grasos de 12 a 25 carbonos.

20 La presente invención proporciona los procedimientos para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina. En ciertas realizaciones de la invención, la *D*-eritro-esfingomielina puede sintetizarse a gran escala comercialmente relevante utilizando un éster de L-serina adecuado (metilo, etilo, i-propilo, n-butilo, etc.). Los procedimientos de la presente invención son útiles para la síntesis de *D*-eritro-esfingomielina.

25 La presente invención también proporciona procedimientos útiles para la síntesis de *D*-eritro-esfingosina.

30 La invención también proporciona compuestos sintetizables utilizando los procedimientos descritos en el presente documento, incluyendo compuestos útiles como intermedios.

35 La presente invención proporciona además cada etapa individual de los procedimientos descritos en el presente documento, que es útil para la síntesis de un intermedio o un producto de los procedimientos descritos en el presente documento.

40 Tal como se describe en el presente documento, las esfingomielinas tienen un núcleo ceramida unido a un grupo de cabeza polar.

45 El núcleo de ceramida incluye una esfingosina unida a un ácido graso vía un enlace amida. Cuando se usa el término "ceramida-C", n es un número entero y se refiere al número de carbonos (C) en el residuo de ácido graso, por ejemplo, ceramida-C16 se refiere a un núcleo de ceramida que tiene un residuo de ácido graso de 16 carbonos, tal como palmitoilo, y ceramida-C18 se refiere a un núcleo de ceramida que tiene un residuo de ácido graso de 18 carbonos, tal como estearoilo.

50 Cuando se usa "ceramida" o "núcleo de ceramida" sin especificar la longitud de cadena de carbonos del ácido graso, se entiende que la cadena de carbonos de ácido graso puede ser de cualquier longitud adecuada.

55 Como se usa en el presente documento, el término "esfingomielina" describe un núcleo de ceramida unido a un grupo funcional de fosforilcolina.

60 Un ácido graso es un ácido carboxílico que tiene una larga cola alifática que puede ser saturada o insaturada. Los ácidos grasos insaturados tienen uno o más enlaces dobles carbono-carbono, y cada doble enlace carbono-carbono puede estar en una configuración *cis* o *trans*. Un residuo de ácido graso es un ácido graso menos el grupo -OH del grupo carboxílico de ácido graso. Como se usa en el presente documento, el término "Ac" se refiere a un residuo de ácido graso.

65 En ciertas realizaciones de la invención el ácido graso o el residuo de ácido graso tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono. En las realizaciones particulares de la invención el ácido graso o el residuo de ácido graso tiene de 4 a 28 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono. En otras realizaciones de la invención, el ácido graso o el residuo de ácido graso tiene de 11 a 25 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono. En otras realizaciones de la invención, el ácido graso o el residuo de ácido graso tiene de 11 a 25 carbonos y uno o dos enlaces dobles de carbono-carbono. En otras realizaciones de la invención, el ácido graso o el residuo de ácido graso tiene de 14 a 20 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono. En otras realizaciones de la invención, el ácido graso o el residuo de ácido graso tiene de 15 a 17 carbonos y de cero a seis

dobles enlaces carbono-carbono. En una realización particular de la invención, el ácido graso es un ácido palmítico y el residuo de ácido graso es palmitoilo.

5 Los ácidos grasos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, ácidos grasos omega tales como ácido grasos ω -3, o ω -6, o ω -9; y ácidos grasos esenciales, tales como, pero no se limitan a, ácido linoleico (LA), ácido α -linoleico (ALA), un ácido graso n-3, por ejemplo, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA).

10 Los ácidos grasos adecuados útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caproico, ácido enántico, ácido caprílico, ácido pelargónico, ácido cáprico, ácido undecílico, ácido láurico, ácido tridecílico, ácido mirístico, ácido pentadecílico, ácido palmitíco, ácido margárico, ácido esteárico, ácido nonadecílico, ácido araquídico, ácido heneicosílico, ácido behénico, ácido tricosílico, ácido lignocérico, ácido pentacosílico, ácido cerótico, ácido heptacosílico, ácido montánico, ácido nonacosílico, ácido melísico, ácido henatriacontílico, ácido laceroico, ácido psílico, ácido gédico, ácido ceroplástico, ácido hexatriacontílico, ácido miristolélico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoelaídico, ácido a-linolénico y ácido erúcico.

15 Si el ácido graso es un ácido graso monoinsaturado, puede ser un ácido graso cis- o trans-monoinsaturado tal como, pero no está limitado a, ácido oleico, ácido elaídico, ácido miristolélico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido vaccénico y ácido erúcico.

20 Como se usa en el presente documento, " $C_{13}H_{27}-$ " y " $C_{15}H_{31}-$ " significan $CH_3(CH_2)_{12}-$ y $CH_3(CH_2)_{14}-$, respectivamente.

25 Como se usa en el presente documento, el término "acilo" se refiere a un radical de fórmula general $-C(O)R$, donde R es un grupo alquilo que tiene de 2 a 35 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono.

30 Ciertos compuestos de la invención pueden estar en forma de una sal. En algunas realizaciones, la sal es una sal farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, sales de adición de ácido y sales de adición de base. El ácido que forma una sal de adición de ácido puede ser un ácido orgánico o un ácido inorgánico. Una base que forma una sal con adición de base puede ser una base orgánica o una base inorgánica.

35 En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal metálica. En algunas realizaciones, una sal farmacéuticamente aceptable es una sal de amonio.

40 Las sales de adición de ácido pueden surgir de la adición de un ácido a la forma de base libre de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el ácido es orgánico. En algunas realizaciones, el ácido es inorgánico. Los ejemplos no limitativos de ácidos adecuados incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido fosfórico, ácido nicotínico, ácido isonicotínico, ácido láctico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido tartárico, ácido ascórbico, ácido gentisínico, ácido glucónico, ácido glucarónico, ácido sacárico, ácido fórmico, ácido benzoico, ácido glutámico, ácido pantoténico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido hidroximalélico, ácido metilmalélico, ácido glicólico, ácido málico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido fenilacético, ácido N-ciclohexilsulfámico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido 2-fosfoglicérico, ácido 3-fosfoglicérico, ácido glucosa-6-fosfórico y un aminoácido.

45 Los ejemplos no limitativos de sales adecuadas de adición de ácido incluyen una sal de clorhidrato, una sal de bromhidrato, una sal de yodhidrato, una sal de nitrato, una sal de nitrito, una sal de sulfato, una sal de sulfito, una sal de fosfato, una sal de hidrógenofosfato, una sal de dihidrógenofosfato, una sal de carbonato, una sal de bicarbonato, una sal de nicotinato, una sal de isonicotinato, una sal de lactato, una sal de salicilato, una sal de 4-aminosalicilato, una sal de tartrato, una sal de ascorbato, una sal de gentisinato, una sal de gluconato, una sal de glucaronato, una sal de sacarato, una sal de formiato, una sal de benzoato, una sal de glutamato, una sal de pantoténato, una sal de acetato, una sal de propionato, una sal de butirato, una sal de fumarato, una sal de succinato, una sal de citrato, una sal de oxalato, una sal de maleato, una sal de hidroximaleato, una sal de metilmaleato, una sal de glicolato, una sal de malato, una sal de cinamato, una sal de mandelato, una sal de 2-fenoxibenzoato, una sal de 2-acetoxibenzoato, una sal de embonato, una sal de fenilacetato, una sal de N-ciclohexilsulfamato, una sal de metanesulfonato, una sal de etanosulfonato, una sal de bencenosulfonato, una sal de p-toluenosulfonato, una sal de 2-hidroxietanosulfonato, una sal de etano-1,2-disulfonato, una sal de 4-metilbencenosulfonato, una sal de naftaleno-2-sulfonato, una sal de naftaleno-1,5-disulfonato, una sal de 2-fosfoglicerato, una sal de 3-fosfoglicerato, una sal de glucosa-6-fosfato y una sal de aminoácido.

50 Las sales metálicas pueden producirse de la adición de una base inorgánica a un compuesto de la invención que tiene un grupo carboxilo. La base inorgánica consiste en un catión metálico emparejado con un contraíón básico, tal como, por ejemplo, hidróxido, carbonato, bicarbonato o fosfato. El metal puede ser un metal alcalino, metal alcalinotérreo, metal de transición o metal de grupo principal. Los ejemplos no limitativos de metales adecuados incluyen litio, sodio, potasio, cesio, cerio, magnesio, manganeso, hierro, calcio, estroncio, cobalto, titanio, aluminio, cobre, cadmio y zinc.

5 Los ejemplos no limitativos de sales metálicas adecuadas incluyen una sal de litio, una sal de sodio, una sal de potasio, una sal de cesio, una sal de cerio, una sal de magnesio, una sal de manganeso, una sal de hierro, una sal de calcio, una sal de estroncio, una sal de cobalto, una sal de titanio, una sal de aluminio, una sal de cobre, una sal de cadmio y una sal de zinc.

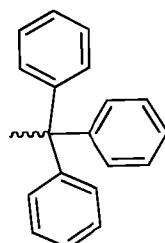
10 Las sales amónicas pueden producirse de la adición de amoníaco o de una amina orgánica a un compuesto de la invención que tiene un grupo carboxilo. Los ejemplos no limitativos de aminas orgánicas adecuadas incluyen trietilamina, diisopropilamina, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, morfolina, *N*-metilmorfolina, piperidina, *N*-metilpiperidina, *N*-etilpiperidina, dibencilamina, piperazina, piridina, pirazol, imidazol, pirazina, piperazina, etilenediamina, *N,N*'-dibenciletilendiamina, procaína, cloroprocaína, colina, diciclohexilamina y *N*-metilglucamina.

15 Los ejemplos no limitativos de sales de amonio adecuadas incluyen una sal de trietilamonio, una sal de diisopropilamonio, una sal de etanolamonio, una sal de dietanolamonio, una sal de trietanolamonio, una sal de morfolinio, una sal de *N*-metilmorfolinio, una sal de piperidinio, una sal de *N*-metilpiperidinio, una sal de *N*-etilpiperidinio, una sal de dibenzilamonio, una sal de piperazinio, una sal de piridinio, una sal de pirazolio, una sal de imidazolio, una sal de pirazinio, una sal de etilendiamonio, una sal de *N,N*'-dibenziletilendiamonio, una sal de procaína, una sal de cloroprocaína, una sal de colina, una sal de diciclohexilamonio y una sal de *N*-metilglucamina.

20 20 El término "aproximadamente" cuando se usa con relación a una indicación numérica de referencia significa la indicación numérica de referencia más o menos hasta 10 % de aquella indicación numérica de referencia. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 50" cubre el rango de 45 a 55.

Procedimientos Generales

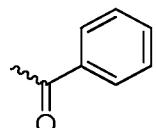
25 "Trt" representa al grupo protector de tritilo (trifenilmetilo), que tiene la estructura:



40 Como se usa en el presente documento, los reactivos de tritilación incluyen, pero no se limitan a, haluros de tritilo, tales como cloruro de tritilo y bromuro de tritilo.

45 La eliminación del grupo protector de tritilo se realiza típicamente de la siguiente manera: la esfingomielina protegida por tritilo se disuelve en un disolvente orgánico y se añade un ácido. La reacción continúa a una temperatura de aproximadamente 22°C durante 1 a 16 horas. La mezcla de reacción se neutraliza mediante la adición de una base. El disolvente orgánico puede ser un disolvente polar prótico, un disolvente polar aprótico o una mezcla de los mismos. En una realización el disolvente orgánico es un disolvente polar prótico y es metanol, etanol, *n*-propanol o isopropanol. En una realización el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico. En una realización, el disolvente aprótico orgánico es clorado y es cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono. En otra realización, el disolvente aprótico orgánico es no clorado y es éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. El ácido puede ser cualquier ácido conocido por el experto en la materia que sea adecuado para eliminar el grupo protector de tritilo, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico y ácido *p*-toluenosulfónico. En ciertas realizaciones de la invención el ácido es ácido *p*-toluenosulfónico. En realizaciones particulares, la base es una base orgánica, tal como trietilamina o piridina.

55 "Bz" representa al grupo protector de benzoílo, que tiene la estructura:



Como se usa en el presente documento, los reactivos benzoilantes incluyen, pero no se limitan a, tales como, haluros de benzoílo tales como cloruro de benzoílo y bromuro de tritilo.

La eliminación del grupo protector de benzoílo se realiza típicamente de la siguiente manera: la esfingomielina protegida por benzoílo se disuelve en un disolvente polar prótico y se añade una base. La reacción continúa durante 8 hasta 24 horas a aproximadamente 22 °C. En una realización, el disolvente polar prótico es metanol, etanol, n-propanol, isopropanol o mezclas de los mismos. En otra realización, la base es metóxido de sodio, carbonato de potasio, hidróxido de litio. En una realización particular, la base es metóxido de sodio.

5 **D-eritro-esfingosina**

10 En una realización particular, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D-eritro-esfingosina* utilizando un éster de *L*-serina, tal como el del Compuesto la en el Esquema I, donde R es un grupo alquilo C1-5. El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un grupo lineal, ramificado o cíclico saturado derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un alcano. Los grupos alquilo de cadena lineal representativos incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo y -n-pentilo. Los grupos alquilo ramificados típicos incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, -neopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo y 1,2-dimetilpropilo. Los grupos alquilo cíclicos típicos incluyen ciclopentilo y ciclopropilo.

15 En ciertas realizaciones de la invención, el éster de *L*-serina es éster metílico de *L*-serina. En otra realización, el éster de *L*-serina es éster etílico de *L*-serina. En otra realización, el éster de *L*-serina es éster butílico de *L*-serina.

20 En una realización de la invención, *D-eritro-esfingosina* se sintetiza utilizando el procedimiento mostrado en el Esquema I, que comprende las siguientes etapas:

25 a) proteger el grupo amino de un éster de *L*-serina (Compuesto la) con grupo *terc*-butoxicarbonilo, que da como resultado a un éster de *L*-serina protegido con Boc (Compuesto Ib);

30 b) permitir que el éster de *L*-serina protegido con Boc reaccione con 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido bencenosulfónico en condiciones efectivas para producir el correspondiente éster de alquilo C1-C5 de ácido (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidinacarboxílico (Compuesto Ic);

35 c) permitir que el correspondiente éster de alquilo C1-C5 de ácido (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidinacarboxílico (Compuesto Ic) reaccione con metilfosfonato de dimetilo en presencia de n-butil-litio en condiciones efectivas para producir (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxoetil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto Id);

40 d) permitir que la (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxoetil)-2,2-dimetiloxazolidina reaccione con 1-tetradecanal en condiciones efectivas para producir (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto Ie);

45 e) permitir que la (S)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina reaccione con borohidruro de sodio y tricloruro de cerio en condiciones efectivas para producir (2S,3R,4E)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxihexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto If); y

50 e) eliminar el grupo protector de *terc*-butoxicarbonilo (Boc) de (2S,3R,4E)-3-(*terc*-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina para producir *D-eritro-esfingosina* (Compuesto A).

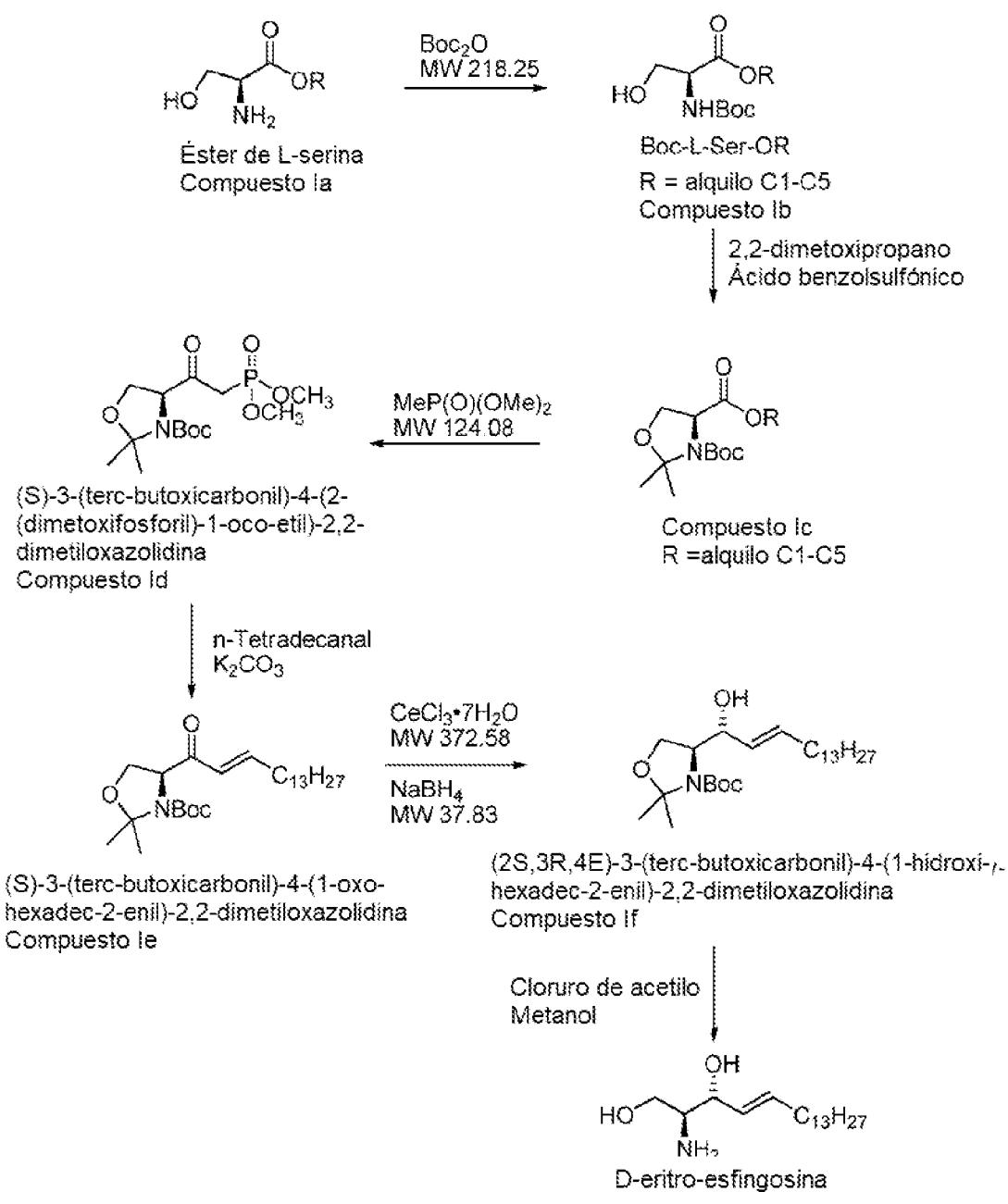
40

45

50

55

60



Esquema I

En un aspecto de la invención, el grupo amino del éster de L-serina (Compuesto Ia del Esquema I) se protege con un grupo de *terc*-butoxicarbonilo (Boc) en presencia de una base, tal como trietilamina o piridina, para producir un éster de L-serina protegido con Boc (Compuesto Ib). La reacción se puede detener entonces añadiendo agua y el producto de reacción, Compuesto Ib, se recupera de la capa orgánica.

- 5 La adición mencionada anteriormente del grupo protector Boc puede proseguir en un disolvente orgánico aprótico a una temperatura de aproximadamente 22 °C durante aproximadamente de 6 a 24 horas. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es un hidrocarburo clorado, por ejemplo, cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono. En otra realización, el disolvente orgánico aprótico es no clorado y es, por ejemplo, éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. La base es típicamente una base orgánica, tal como trietilamina o piridina. El producto de reacción, Compuesto Ib, se puede extraer de la capa orgánica con un disolvente orgánico, que incluye, pero no se limita a, un disolvente orgánico aprótico descrito anteriormente.
- 10 15 En otro aspecto de la invención el éster de L-serina protegido con Boc (Compuesto Ib) reacciona con 2,2-

- 5 dimetoxipropano en presencia de ácido bencenosulfónico para producir el correspondiente éster de alquilo C1-C5 de ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico (Compuesto 1c). La reacción puede proseguir a temperatura de reflujo durante 1-3 horas en un disolvente orgánico. En una realización, el disolvente orgánico es no polar y es tolueno, benceno o hexano. En otra realización, el disolvente orgánico es un disolvente orgánico polar y es éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. A continuación, se puede neutralizar la reacción con una base y se evapora el disolvente. A continuación, se puede añadir agua y un disolvente orgánico al residuo restante y el producto de reacción se puede extraer de la capa orgánica utilizando un disolvente orgánico. La base es típicamente una base orgánica, tal como trietilamina o piridina. El producto de reacción se puede extraer de la capa orgánica con un disolvente orgánico, que incluye, pero no se limita a, los disolventes orgánicos descritos anteriormente.
- 10 10 En otro aspecto de la invención, el éster de ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico (Compuesto 1c) reacciona con n-butil-litio en presencia de metilfosfonato de dimetilo para producir (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1d). La reacción se puede detener con agua y el pH se ajusta mediante la adición de un ácido orgánico. Se puede recuperar el producto de la fase orgánica. La reacción puede continuar en un disolvente orgánico a una temperatura de aproximadamente de -70 a -80°C durante aproximadamente de 2 a 4 horas. En ciertas realizaciones, el disolvente orgánico es un disolvente orgánico polar y es éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. En ciertas realizaciones el ácido es ácido cítrico o ácido acético.
- 15 15 20 En una realización adicional de la invención, la (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1d) reacciona con tetradecanal en presencia de una base para producir (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e). En una realización, la base es carbonato de potasio. La reacción puede proseguir a temperatura ambiente, por ejemplo, a aproximadamente 22 °C, y en presencia de un disolvente orgánico y agua. La reacción puede proseguir durante 8-14 horas con agitación. Se puede recuperar el producto, (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e), de la fase orgánica. En ciertas realizaciones, el disolvente orgánico es un disolvente orgánico polar y es acetonitrilo, tetrahidrofurano o acetato de etilo.
- 25 25 30 En otra realización adicional de la invención, se reduce la (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e) en presencia de borohidruro de sodio y cloruro de cerio heptahidratado para producir (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxihexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1f). Por ejemplo, el Compuesto 1e y el cloruro de cerio heptahidratado se agitan en un disolvente orgánico y la mezcla se enfriá hasta -20 a -15°C. Se añade borohidruro de sodio a la mezcla durante 1 a 6 horas. Después de la adición del borohidruro de sodio, la reacción puede proseguir durante 15 a 90 minutos, en cuyo punto se calienta hasta aproximadamente 22 °C de 1 a 3 horas. Después de alcanzar 22 °C, se puede agitar la mezcla de 30 a 90 minutos. En una realización el disolvente orgánico es un disolvente polar prótico y es metanol, etanol, n-propanol o isopropanol. En ciertas realizaciones, se añade el borohidruro de sodio como un sólido. En ciertas realizaciones, se añade el borohidruro de sodio como una solución acuosa. En ciertas realizaciones de la invención, se elimina al menos un poco del disolvente a través de la evaporación y las sales precipitadas se filtran y se lavan con un disolvente orgánico. El producto, el Compuesto 1f, se puede recuperar de la fase orgánica del filtrado resultante.
- 35 35 40 En una cierta realización de la invención, la (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1f) se desprotege para producir *D*-eritro-esfingosina. La reacción puede proceder de la siguiente manera: se enfriá metanol hasta aproximadamente 0 °C y se añade cloruro de acetilo a lo largo de aproximadamente 15 a 60 minutos. A continuación, se calienta la solución para producir una solución de clorhidrato metanólico. (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina se disuelve en metanol y se añade la solución de clorhidrato metanólico en el transcurso de aproximadamente 15 a 60 minutos. La reacción se puede neutralizar añadiendo una base. A continuación, se puede eliminar el disolvente y se puede recuperar la *D*-eritro-esfingosina resultante del residuo. La base puede ser una base orgánica, tal como, pero no se limita a, trietilamina o piridina.
- 45 45 50 En ciertas realizaciones de la invención, se puede purificar la *D*-eritro-esfingosina (Compuesto A) mediante recristalización, cromatografía con gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.
- 55 55 60 Una realización particular de la invención también proporciona un procedimiento de la síntesis de *D*-eritro-esfingosina utilizando un éster metílico de *L*-serina.
- 65 65 70 En una realización particular de la invención, un éster metílico de *L*-serina (Compuesto 1a, R = metilo) se suspende en acetato de etilo y se enfriá hasta aproximadamente 2 °C, se añaden aproximadamente 1,15 equivalentes molares de trietilamina, seguidos de aproximadamente 1,15 equivalentes molares de di-terc-butil dicarbonato en acetato de etilo. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 22 °C y se agita de 8 a 12 horas. Se añade agua purificada y se separan las fases. Se puede extraer el producto de reacción Boc-*L*-Ser-OMe (Compuesto 1b, R = metilo] con acetato de etilo de la capa orgánica y las fracciones resultantes se secan al vacío.
- 65 65 75 En una realización particular de la invención, se disuelve Boc-*L*-Ser-OMe (Compuesto 1b, R = metilo) en

5 tetrahidrofurano y se añaden 3-4 equivalentes de 2,2-dimetoxipropano, seguidos de una solución de aproximadamente 0,10 equivalentes de ácido bencenosulfónico en tetrahidrofurano, y se calienta la reacción a reflujo mientras que se destila un poco de tetrahidrofurano. La reacción se neutraliza hasta pH 6,5 con trietilamina a aproximadamente 22 °C. El disolvente se destila y se añade agua y hexano. Se puede aislar el producto de reacción, éster metílico del ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico (Compuesto 1c, R = metilo), de la capa de hexano.

10 En otro aspecto de la invención, 2 equivalentes de metilfosfonato de dimetilo se disuelven en tetrahidrofurano y la mezcla resultante se enfriá hasta aproximadamente -70 a -80°C. Se añaden aproximadamente 2 equivalentes de n-butil-litio en heptano en el transcurso de 1 a 3 horas mientras que la mezcla se mantiene a aproximadamente -70 a -80°C. Despues de agitar durante aproximadamente 1 hora, se añade 1 equivalente de éster metílico de ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico en tetrahidrofurano en el transcurso de 30 a 90 minutos mientras que la mezcla se mantiene a aproximadamente 0°C a lo largo de 30 a 60 minutos y despues se agita de 15 a 60 minutos. La reacción se detiene con la adición de agua en tetrahidrofurano y el pH se modifica a pH 6-7 con la adición de una solución de ácido cítrico. Se añade un disolvente orgánico, tal como, pero no limitado a, acetato de etilo o éter dietílico y el producto, (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etyl)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1d), se recuperó de la capa orgánica.

15 En un aspecto adicional de la invención, 1 equivalente de (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etyl)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1d) y aproximadamente 2 equivalentes de carbonato de potasio se mezclan en acetonitrilo a aproximadamente 22 °C, seguido de la adición de aproximadamente 0,5 equivalentes de 1-tetradecanal y agua. La reacción prosigue durante 8-14 horas con agitación. Las sales se filtran y se lavan con hexano y el producto, (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e), se recupera de la fase orgánica.

20 En otro aspecto adicional de la invención, 1 equivalente de (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e) y aproximadamente 2 equivalentes de carbonato de potasio se mezclan en acetonitrilo a aproximadamente 22 °C, seguido de la adición de aproximadamente 0,5 equivalentes de 1-tetradecanal y agua. La reacción prosigue durante 8-14 horas con agitación. Las sales se filtran y se lavan con hexano y el producto, (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e), se recupera de la fase orgánica.

25 En otro aspecto adicional de la invención, 1 equivalente de (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1e) y aproximadamente de 1,1 a 1,5 equivalentes de cloruro de cerio heptahidratado se agitan en metanol y la mezcla se enfriá hasta -20 a -15°C. Una solución acuosa de aproximadamente 1,5 equivalentes de borohidruro de sodio y aproximadamente 0,01 equivalentes de NaOH se enfriá hasta aproximadamente 0°C y se añade a la mezcla de (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina en el transcurso de aproximadamente 4 a 6 horas. Despues de 15 a 60 minutos de agitación adicional, la mezcla se calienta hasta aproximadamente 22°C a lo largo de 1 a 3 horas, seguido de agitación de 30 a 90 minutos. Se elimina el metanol al vacío y se filtra la suspensión acuosa resultante. Los sólidos resultantes se lavan con un disolvente orgánico, tal como tolueno. Se extrae la capa acuosa al menos dos veces con un disolvente orgánico, tal como tolueno. Las capas orgánicas se combinan y el producto, (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1f), se recupera de la capa orgánica.

30 En una cierta realización de la invención, la (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto 1f) se convierte en *D*-eritro-esfingosina. La reacción procede de la siguiente manera: se enfriá metanol hasta aproximadamente 0°C y se añaden aproximadamente 2 equivalentes de cloruro de acetilo en el transcurso de aproximadamente 15 a 60 minutos, generando una solución metanólica de ácido clorhídrico. A continuación, la solución se calienta hasta temperatura ambiente. (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina) se disuelve en metanol y se añade la solución de clorhidrato metanólico en el transcurso de aproximadamente 15 a 60 minutos. La reacción se neutraliza añadiendo trietilamina. A continuación, se puede eliminar el disolvente y se puede recuperar la *D*-eritro-esfingosina resultante del residuo.

35 En una realización particular, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D*-eritro-esfingosina, que comprende las etapas de:

a) proteger el grupo amino de un éster metílico de *L*-serina o una sal del mismo con un grupo terc-butoxicarbonilo para producir Boc-*L*-Ser-OMe;

40 b) permitir que Boc-*L*-Ser-OMe reaccione con 2,2-dimetoxipropano en presencia de ácido bencenosulfónico en condiciones efectivas para producir el éster metílico de ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico;

45 c) permitir que el éster metílico de ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico reaccione con metilfosfonato de dimetilo en presencia de n-butil-litio en condiciones efectivas para producir (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etyl)-2,2-dimetiloxazolidina;

50 d) permitir que la (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etyl)-2,2-dimetiloxazolidina reaccione con 1-tetradecanal en condiciones efectivas para producir (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina;

55 e) permitir que la (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina reaccione con borohidruro de sodio y tricloruro de cerio en condiciones efectivas para producir (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxihexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina; y

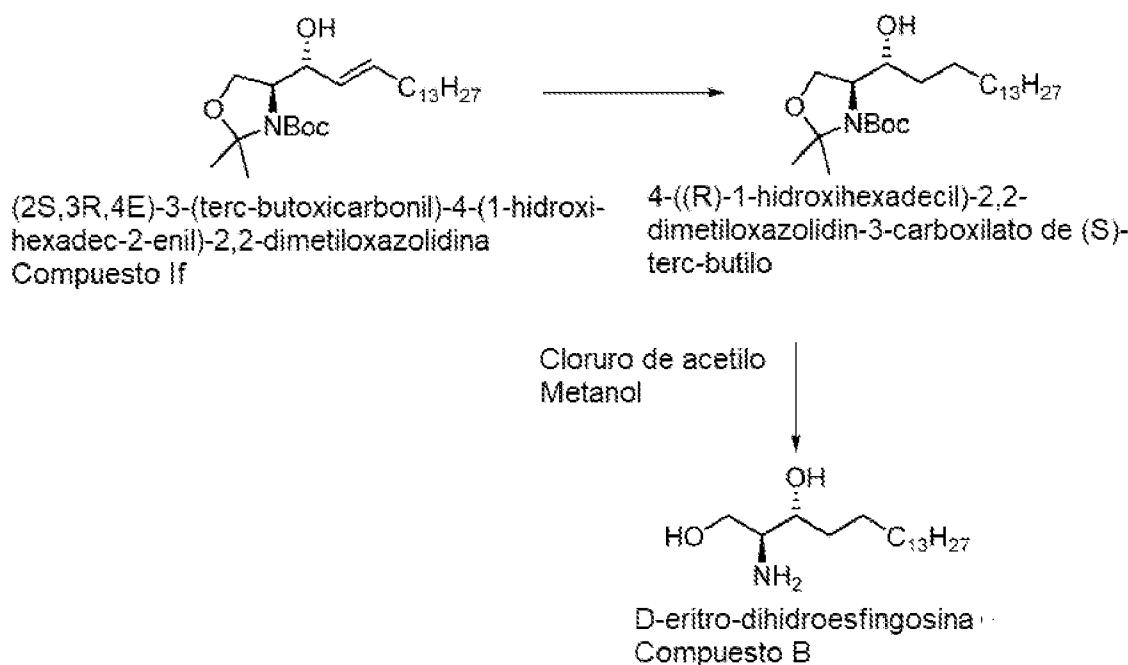
60 f) eliminar el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc) de (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina en condiciones efectivas para producir *D*-eritro-esfingosina.

65 ***D*-eritro-dihidroesfingosina**

En una realización particular, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D*-eritro-dihidroesfingosina utilizando un éster de *L*-serina adecuado, tal como el del Compuesto Ia. En una cierta realización de la invención, R es un grupo alquilo que tiene de 1 a 5 carbonos. El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un grupo lineal, ramificado o cíclico saturado derivado de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un alcano. Los grupos alquilo de cadena lineal típicos incluyen -metilo, -etilo, -n-propilo, -n-butilo y -n-pentilo y n-heptilo. Los grupos alquilo ramificados típicos incluyen -isopropilo, -sec-butilo, -isobutilo, -terc-butilo, -isopentilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 1,1-dimetilpropilo y 1,2-dimetilpropilo. Los grupos alquilo cíclicos típicos incluyen ciclohexilo, ciclopentilo y ciclopropilo.

10 En ciertas realizaciones de la invención, el éster de *L*-serina es éster metílico de *L*-serina. En otra realización, el éster de *L*-serina es éster etílico *L*-serina. En otra realización adicional, el éster de *L*-serina es éster butílico de *L*-serina.

15 En una realización de la invención, *D*-eritro-dihidroesfingosina se sintetiza utilizando el procedimiento mostrado en el esquema II. La relación comprende las siguientes etapas:



Esquema II

20 El compuesto If reacciona con un agente reductor para producir su correspondiente compuesto saturado, Compuesto IIa. La reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico, pero no se limita a, un alcohol primario o secundario, THF o 2-metil-THF, en presencia de H₂ y un catalizador, tal como, pero no está limitado a, un catalizador de paladio(0) sobre carbono o catalizador de rutenio(II), por ejemplo, Ru(OAc)₂(BINAP), [{RuCl(m-Cl)(h⁶-C₆Me₆)₂}], o Ru(OH)x/Al₂O₃.

25 En una realización particular, el Compuesto If reacciona con H₂ en alcohol isopropílico a aproximadamente 80°C en presencia de [{RuCl(m-Cl)(h⁶-C₆Me₆)₂}] a reflujo. La mezcla de reacción se detiene y se somete a tratamiento final, cuando no se detecta más alcohol alílico inicial, Compuesto If, utilizando el procedimiento bien conocido por el experto en la técnica, tal como, pero no se limita a, HPLC, cromatografía de capa fina, o IR. En una determinada realización, se añade H₂ como un gas y la reacción se lleva a cabo en un recipiente de hidrogenación bajo presión.

30 El compuesto IIa obtenido de este modo, bruto o purificado, se disuelve en metanol a aproximadamente 0°C, y se añade cloruro de acetilo durante aproximadamente 15 a 60 minutos, generando ácido clorhídrico metanólico. Cuando no se detecta más material inicial (o no hay más conversión) utilizando un procedimiento, tal como un procedimiento de cromatografía, la reacción se trata con una base, que puede ser una base orgánica, tal como, pero no se limita a, trietilamina o piridina, o una base inorgánica en solución acuosa, tal como bicarbonatos o carbonatos de sodio, potasio, calcio, magnesio y amonio. Además, la mezcla de reacción se extrae con un disolvente, como un disolvente clorado, acetato de etilo o un éter, tal como éter dietílico, THF, t-butil metil éter, éter isopropílico, etc. A continuación, se extrae el disolvente y la *D*-eritro-dihidroesfingosina se recupera como una base libre. Se puede tratar la base con ácido

clorhídrico para producir la correspondiente sal de clorhidrato.

D-eritro-esfingosina

5 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina, tal como se muestra en el Esquema III.

En otra realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina, que comprenden las etapas de:

- 10 a) permitir que la (1*R*, 2*R*, 5*R*)-(+)2-hidroxi-3-pinanova (Compuesto IIIa) reaccione con etilglicinato en condiciones efectivas para producir (1*R*, 2*R*, 5*R*)-Etil-((2-hidroxipinan-3-ileno)amino)acetato (Compuesto IIIb);
b) permitir que el (1*R*, 2*R*, 5*R*)-Etil-((2-hidroxipinan-3-ileno)amino)acetato (Compuesto IIIb) reaccione con 2-(*E*)-hexadecen-1-al en presencia de triisopropóxido de clorotitanio y trietilamina para producir uno o ambos de (2*S*,3*R*,*E*)-etil-3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato (Compuesto IIIc) y (2*S*,3*R*,*E*)-isopropil-3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato (Compuesto IIIc');
c) permitir que uno o ambos de (2*S*,3*R*,*E*)-etil-3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato (Compuesto IIIc) y (2*S*,3*R*,*E*)-isopropil-3-hidroxi-2-((*E*)-((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadec-4-enoato (Compuesto IIIc') reaccionen con ácido clorhídrico en condiciones efectivas para producir uno o ambos de 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*R*,*E*)-etilo (Compuesto IIId) y 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*R*,*E*)-isopropilo (Compuesto IIId);
d) permitir que uno o ambos de 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*R*,*E*)-etilo y 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2*R*,3*R*,*E*)-isopropilo reaccionen con borohidruro de sodio en condiciones efectivas para producir *D*-eritro-esfingosina (Compuesto A); y
25 e) hacer reaccionar *D*-eritro-esfingosina con ácido palmítico en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto E).

30

35

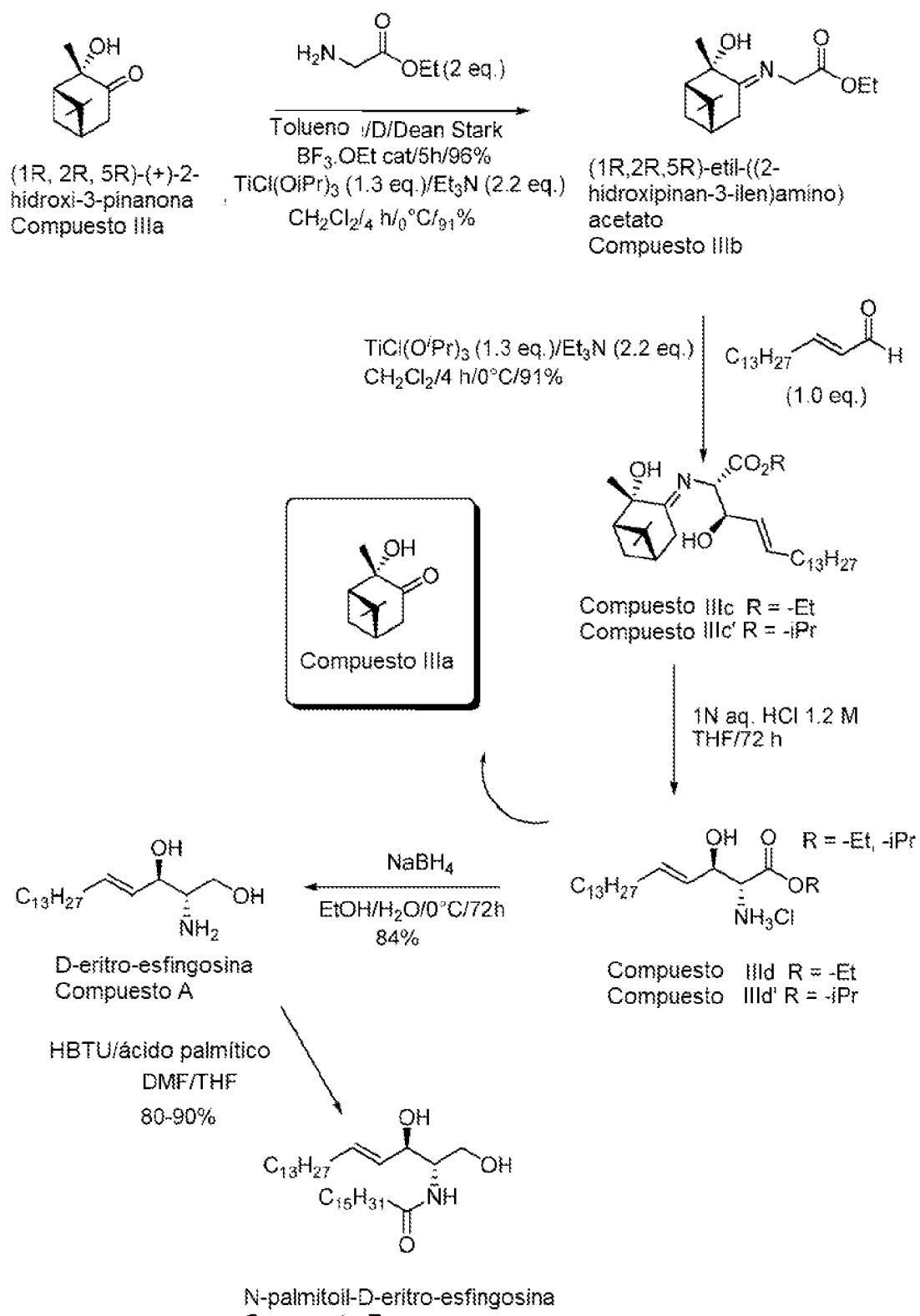
40

45

50

55

60



Esquema III

D-eritro-dihidroesfingosina

En otra realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D-eritro-dihidroesfingosina*, tal como se muestra en el Esquema IV y que comprenden las siguientes etapas:

- 5 a) permitir que (1*R*, 2*R*, 5*R*)(+)-2-hidroxi-3-pinanona (Compuesto IIIa) reaccione con etilglicinato en condiciones efectivas para producir (1*R*, 2*R*, 5*R*)-Etil-((2-hidroxipinan-3-ileno)amino)acetato (Compuesto IIIb);
- 10 b) permitir que (1*R*, 2*R*, 5*R*)-Etil-((2-hidroxipinan-3-ileno)amino)acetato (Compuesto IIIb) reaccione con hexadecanal en presencia de triisopropóxido de clorotitanio en condiciones efectivas para producir uno o ambos de 3-hidroxi-2-(((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbiciclo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadecanoato de (2*S*,3*R*,*E*)-etilo (Compuesto IVc) y 3-hidroxi-2-(((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbiciclo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadecanoato de (2*S*,3*R*,*E*)-isopropilo (Compuesto IVc');
- 15 c) permitir que uno o ambos de 3-hidroxi-2-(((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbiciclo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadecanoato de (2*S*,3*R*,*E*)-etilo (Compuesto IVc) y 3-hidroxi-2-(((1*S*,2*S*,5*S*)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbiciclo[3,1,1]heptan-3-ilideno)amino)octadecanoato de (2*S*,3*R*,*E*)-isopropilo (Compuesto IVc') reaccionen con ácido hidroclórico en condiciones efectivas para producir 2-amino-3-hidroxioctadecanoato de (2*R*,3*R*,*E*)-etilo (Compuesto IVd) y 2-amino-3-hidroxioctadecanoato de (2*R*,3*R*,*E*)-isopropilo (Compuesto IVd');
- 20 d) permitir que uno o ambos de 2-amino-3-hidroxioctadecanoato de (2*R*,3*R*,*E*)-etilo (Compuesto IVd) y 2-amino-3-hidroxioctadecanoato de (2*R*,3*R*,*E*)-isopropilo (Compuesto IVd') reaccionen con borohidruro de sodio en condiciones efectivas para producir *D-eritro-dihidroesfingosina* (Compuesto B);
- e) permitir que *D-eritro-dihidroesfingosina* (Compuesto B) reaccione con ácido palmítico en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D-eritro-dihidroesfingosina* (Compuesto F).

25

30

35

40

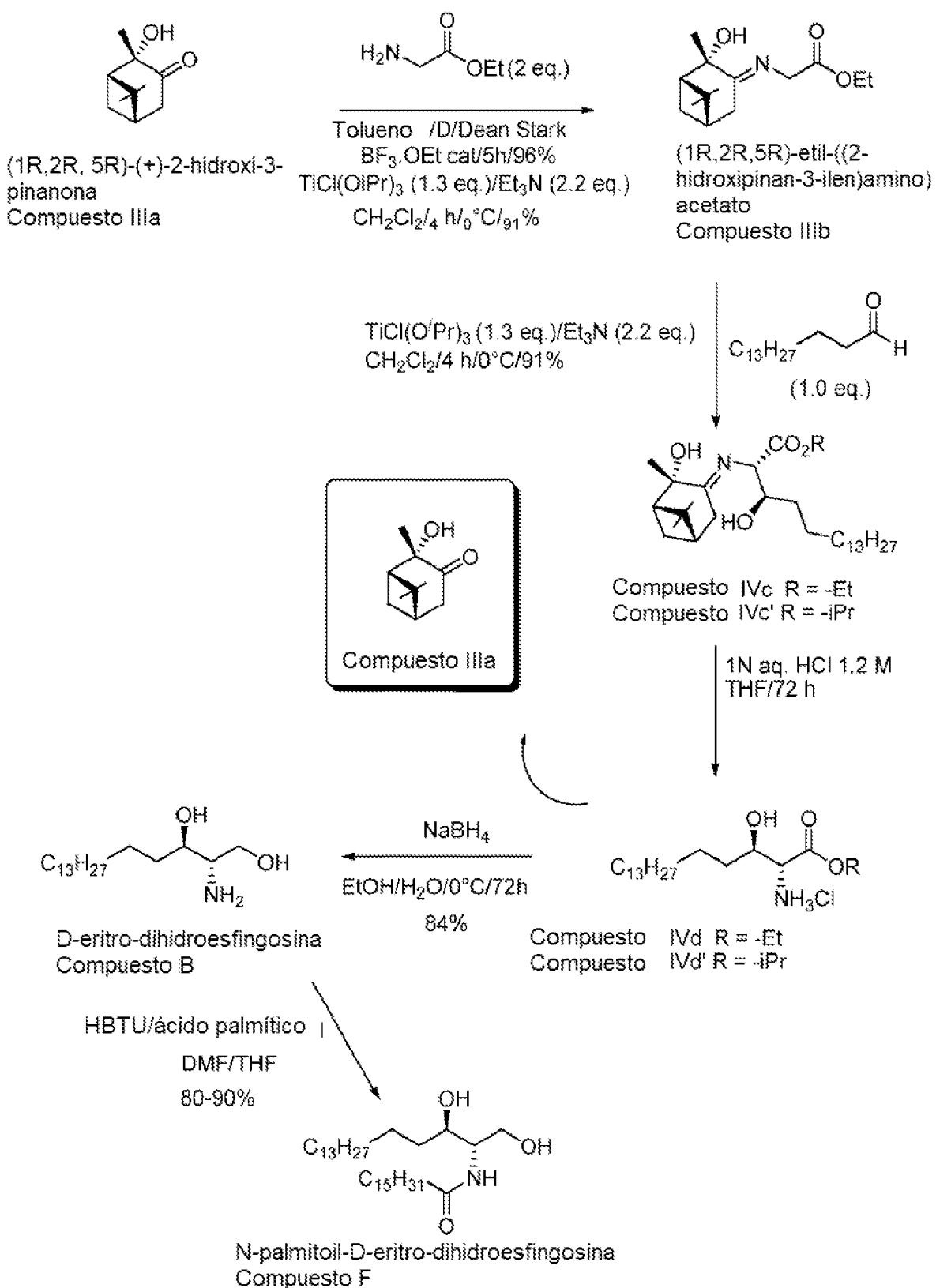
45

50

55

60

65



En una realización adicional, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina, tal como se muestra en el Esquema V que comprenden las etapas de:

- 5 a) permitir que *D*-eritro-esfingosina reaccione con un ácido graso (Compuesto Va) en condiciones efectivas para producir una *D*-eritro-ceramida (Compuesto Vb);
- b) proteger el grupo hidroxilo primario de la *D*-eritro-ceramida (Compuesto Vb) con un primer grupo protector para producir Compuesto Vc;
- c) proteger el grupo hidroxilo secundario del Compuesto Vc con un segundo grupo protector para producir el Compuesto Vd;
- 10 d) eliminar el primer grupo protector del Compuesto Vd para producir el Compuesto Ve;
- e) permitir que el Compuesto Ve reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CPP) en condiciones efectivas para producir el Compuesto Vf;
- f) permitir que el Compuesto Vf reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir el Compuesto Vg;
- 15 g) eliminar el segundo grupo protector del Compuesto Vg con metóxido de sodio para producir la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto Vh).

20

25

30

35

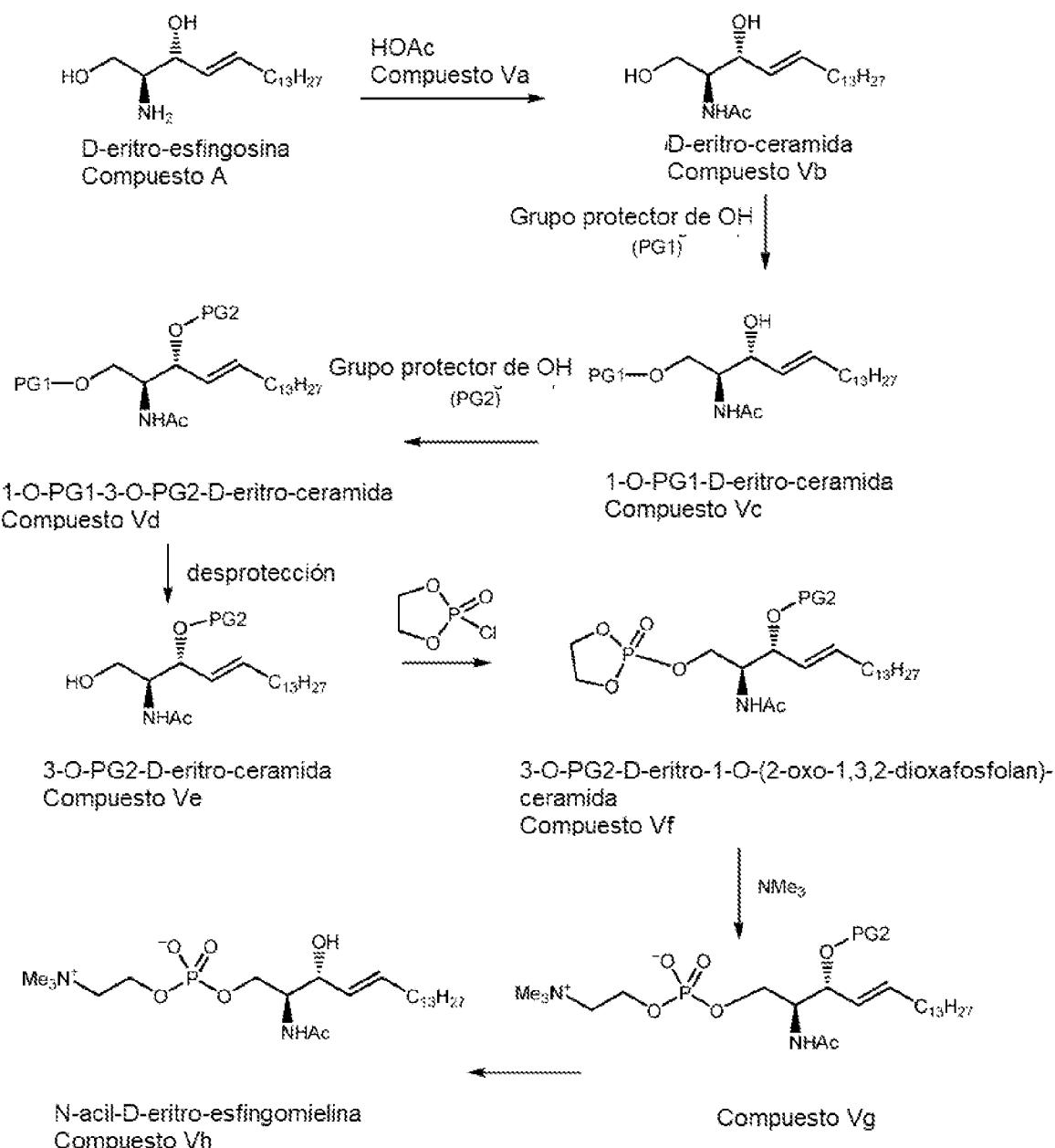
40

45

50

55

60



Esquema V

HOAc es un ácido graso

Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono.

5

PG1 y PG2 son cualquier grupo protector adecuado conocido en la técnica.

En determinadas realizaciones, PG1 es trifenilmetilo (Trit). En determinadas realizaciones PG2 es benzoílo (Bz)

10

Síntesis de N-aci-D-eritro-ceramida

En determinadas realizaciones de la invención, la N-aciación de la D-eritro-esfingosina con ácido graso para producir N-aci-D-eritro-ceramida comprende las etapas mostradas en el Esquema V. Las etapas son las siguientes: la D-eritro-esfingosina (Compuesto A), el ácido graso (Compuesto Va) y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos.

15

En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU).

5 Se añade una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, a la mezcla de *D*-eritro-esfingosina (Compuesto A), ácido graso (Compuesto Va) y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilforamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 minutos. A continuación, la mezcla se agita de 1 a 15 horas a una temperatura de aproximadamente 0-22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 22 °C. En otras realizaciones adicionales de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente temperatura ambiente.

10 10 Despues de agitar durante aproximadamente 1 a 15 horas, el producto, el Compuesto Vb, se precipita mediante la adición de un ácido. En determinadas realizaciones de la invención, el ácido es un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido acético o ácido oxálico. En la adición el ácido puede estar en una solución acuosa. Cuando se añade el ácido, la reacción puede estar a aproximadamente 22 °C. Se puede agitar la mezcla resultante durante 30 a 120 15 minutos a temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la suspensión se agita a aproximadamente 22°C.

20 20 Despues de la agitación, la suspensión se filtra. A continuación, se puede resuspender el producto resultante, el Compuesto Vb, en agua, despues de lo cual, el producto se puede filtrar y lavar. Se puede repetir la suspensión al menos una vez más. Se puede lavar el producto resultante, *D*-eritro-ceramida (Compuesto Vb), con agua, acetona o una mezcla de las mismas.

Síntesis de *D*-eritro-ceramida protegida

25 25 En determinadas realizaciones de la invención, el grupo hidroxilo primario de la *D*-eritro-ceramida se protege, seguido de la protección del hidroxilo secundario y, a continuación, la desprotección del hidroxilo primario. En otras realizaciones de la invención, las etapas de protección y desprotección continúan sin aislamiento o purificación de la *D*-eritro-ceramida protegida por hidroxilo primario.

30 30 En realizaciones particulares de la invención, el grupo hidroxilo primario se protege con un grupo tritilo mediante la reacción de la *D*-eritro-ceramida con un reactivo de tritilación, tal como, pero no limitado a, haluros de tritilo, tales como cloruro de tritilo y bromuro de tritilo. En determinadas realizaciones de la invención, el grupo hidroxilo secundario se protege con un grupo benzoílo mediante la reacción de la *D*-eritro-ceramida protegida en 1-O con un reactivo benzoilante que incluye, tales como, pero no se limita a, haluros de benzoílo, tales como cloruro de benzoílo y bromuro 35 35 de tritilo. En otras realizaciones de la invención, el grupo hidroxilo primario se protege con un grupo tritilo y el hidroxilo secundario se protege con un grupo benzoílo.

40 40 En determinadas realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario procede de la siguiente manera: *D*-eritro-ceramida (Compuesto Vb) y cloruro de tritilo se suspenden en un disolvente orgánico en presencia de una base. La reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 25-55 °C durante aproximadamente 10 a 60 horas para producir la *D*-eritro-ceramida protegida por tritilo (Compuesto Vc de 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida, donde PG1 = -Trt). El disolvente orgánico puede ser un disolvente no polar o polar. En una realización de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente no polar y es tolueno, benceno, hexano o las mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono. En otra realización, el disolvente orgánico aprótico es no clorado y es éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. La base es típicamente una base orgánica, tal como trietilamina o piridina.

50 50 En determinadas realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente 10 % molar de 1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-ceramida de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente 7 % molar de 1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-ceramida de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente el 5 % molar de 1,3-O,O-ditritil-55 55 *D*-eritro-ceramida de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente 1 % molar de 1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-ceramida de los productos brutos de reacción.

60 60 En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo secundario prosigue directamente de la siguiente manera: la mezcla de reacción mencionada anteriormente se enfria a aproximadamente 0-5 °C y se añade cloruro de benzoílo y una base. La reacción continúa a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C durante aproximadamente 1 a 16 horas. El producto de reacción, *D*-eritro-ceramida protegida con 3-benzoílo y 1-tritilo (Compuesto Vd; PG1= -Trt; PG2= -Bz) se puede extraer de la capa orgánica con un disolvente orgánico, que incluye, pero no se limita a, un disolvente orgánico aprótico descrito anteriormente. Despues se elimina el disolvente orgánico utilizando un procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, evaporación, por ejemplo, concentración al vacío. En realizaciones particulares, la base es una base orgánica, tal

como trietilamina o piridina.

En otras realizaciones de la invención, la desprotección del grupo hidroxilo primario prosigue directamente de la siguiente manera: el residuo de la reacción mencionada anteriormente se disuelve en un disolvente orgánico y se añade un ácido. La reacción continúa a una temperatura de aproximadamente 22 °C durante 1 a 16 horas. La mezcla de reacción se neutraliza al añadir una base. El disolvente orgánico puede ser un disolvente polar prótico, un disolvente polar aprótico o una mezcla de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar prótico y es metanol, etanol, *n*-propanol o isopropanol. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es clorado y es cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono. En otra realización, el disolvente orgánico aprótico es no clorado y es éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. El ácido puede ser cualquier ácido conocido por el experto en la técnica para ser adecuado para eliminar el grupo protector de trítilo, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido clorhídrico y ácido *p*-toluenosulfónico. En ciertas realizaciones de la invención, el ácido es ácido *p*-toluenosulfónico. En realizaciones particulares, la base es una base orgánica, tal como trietilamina o piridina.

En determinadas realizaciones de la invención se puede purificar el producto de desprotección mencionado anteriormente (Compuesto Ve; PG2= -Bz) mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

20 Fosforilación y aminación de *D*-eritro-ceramida protegida con 3-benzoílo para producir *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina protegida con benzoílo

En otras realizaciones de la invención, la *D*-eritro-ceramida protegida por 3-benzoílo, (Compuesto Ve; PG2 = -Bz), se fosforila de la siguiente manera: La *D*-eritro-ceramida protegida por 3-benzoílo se disuelve en un disolvente orgánico y se añade una base orgánica. Despues del enfriamiento hasta aproximadamente 4-9 °C, se añade una solución de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en un disolvente orgánico. La reacción sigue a una temperatura de aproximadamente 4-22 °C durante aproximadamente 2 a 6 horas para producir 3-O-Benzóil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-ceramida (Compuesto Vf, donde PG2 = Bz). En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 4-9 °C durante aproximadamente 15 minutos a 2 horas y despues se calienta hasta aproximadamente 22°C y sigue durante 2 a 4 horas adicionales. El disolvente orgánico puede ser un disolvente no polar, un disolvente polar o mezclas de los mismos. En una realización de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente no polar y es tolueno, benceno, hexano o mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico, tal como acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano o mezclas de los mismos. La base orgánica es típicamente tetrametiletilendiamina o trietilamina. En determinadas realizaciones de la invención, la base orgánica es tetrametiletilendiamina.

En determinadas realizaciones, la aminación de la 3-O-Benzóil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-ceramida (Compuesto Vf, PG2 =-Bz) tiene lugar sin purificación o aislamiento del material de partida de *D*-eritro-ceramida protegida por benzoílo fosforilado. Despues de proceder con la reacción mencionada anteriormente durante aproximadamente 2 a 6 horas, se añaden disolvente orgánico y trimetilamina adicionales, la mezcla de reacción se calienta hasta 60 - 70°C y se permite que continúe durante 10-16 horas para producir *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina protegida por 3-benzoílo (Compuesto Vg, PG2 =-Bz). El disolvente orgánico puede ser un disolvente no polar, un disolvente polar o mezclas de los mismos. En una realización de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente no polar y es tolueno, benceno, hexano o mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico, tal como acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, la trimetilamina se añade como un líquido. En otras realizaciones, la trimetilamina se añade en forma de gas. En realizaciones particulares, la trimetilamina líquida es anhidra. En determinadas realizaciones, la trimetilamina se enfria por debajo de su punto de ebullición y se añade un líquido. En determinadas realizaciones, la reacción se enfria hasta aproximadamente -10 °C a 0 °C antes de añadir trietilamina líquida. En otras realizaciones, la reacción se enfria hasta aproximadamente -10°C antes de añadir trietilamina líquida.

En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina protegida por 3-benzoílo mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

55 Desprotección de *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina protegida por 3-O-benzoílo para producir *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina

La eliminación del grupo protector de benzoílo de *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina protegida por 3-O-benzoílo prosigue de la siguiente manera: la esfingomielina protegida por 3-O-benzoílo se disuelve en un disolvente polar prótico y se añade una base. La reacción continúa durante 8 hasta 24 horas a aproximadamente 22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, se añaden un disolvente aprótico y agua a la mezcla de reacción y la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto Vh) se recupera de la capa orgánica. En una realización, el disolvente polar prótico es metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol o mezclas de los mismos. En otra realización adicional, la base es metóxido de sodio.

En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15% de su enantiómero opuesto correspondiente. En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de aproximadamente 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.
- 10 15 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprenden las etapas de:
- a) permitir que la *D*-eritro-esfingosina reaccione con un ácido graso en condiciones efectivas para producir una *D*-eritro-ceramida;
- 20 b) permitir que la *D*-eritro-ceramida reaccione con un reactivo de tritilación en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida;
- c) permitir que la 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida reaccione con un reactivo benzoilante en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-3-O-*D*-eritro-ceramida;
- 25 d) eliminar al grupo tritilo de 1-O-tritil-3-O-*D*-eritro-benzoil-ceramida para producir *D*-eritro-3-O-benzoil-ceramida;
- e) permitir que la 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CPP) en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida;
- 30 f) permitir que la 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)ceramida reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir la *N*-acil-*D*-eritro-3-O-benzoil-esfingomielina; y
- g) eliminar el grupo benzoilo de *N*-acil-*D*-eritro-3-O-benzoil-esfingomielina con metóxido de sodio para producir *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina.

Síntesis de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina

- En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprenden las etapas de:
- 35 a) permitir que la *D*-eritro-esfingomielina reaccione con ácido palmítico en presencia de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato y trietilamina en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina
- b) proteger *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina para reaccionar con un grupo tritilo para producir *N*-palmitoil-1-O-tritil-*D*-eritro-esfingosina;
- 40 c) proteger *N*-palmitoil-1-O-tritil-*D*-eritro-esfingosina con un grupo benzoilo para producir *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina;
- d) eliminar el grupo tritilo de *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina en presencia de ácido para-toluenosulfónico para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina;
- 45 e) permitir que *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CPP) en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)-esfingosina;
- f) permitir que *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)-esfingosina reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina; y
- 50 g) eliminar el grupo benzoilo de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina con metóxido de sodio para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina.
- En una realización particular de la invención, *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina se sintetiza, tal como se muestra en el Esquema VI:
- 55 Un equivalente de ácido palmítico, un equivalente de *D*-eritro-esfingosina (Compuesto A), y 1,10 equivalentes de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato (HBTU) se suspenden en tetrahidrofurano y dimetilformamida y se enfrián hasta aproximadamente 0-5°C. Se añaden de dos a tres equivalentes de trietilamina y la mezcla se agita durante aproximadamente una a doce horas a aproximadamente 0-5°C. La mezcla se calienta hasta aproximadamente 22 °C. Se añade una solución acuosa de ácido cítrico y la mezcla se agita durante 15 a 90 minutos a aproximadamente 22 °C. La suspensión resultante se filtra y la torta se suspende en agua a temperatura ambiente.
- 60 La suspensión se filtra y se lava con agua y acetona. A continuación, se puede secar el producto resultante, *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto E).

Para la primera protección de hidroxilo, se suspende un equivalente de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto E) en piridina y cloruro de metíleno. Se añade una solución de aproximadamente 1,05 equivalentes de cloruro de tritilo a cloruro de metíleno seguido de cloruro de metíleno adicional. La mezcla de reacción se agita a 25°C durante 50-60 horas.

- En determinadas realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario produce menos del 10 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario produce no más de aproximadamente 7 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario produce no más de aproximadamente el 5 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario produce no más de aproximadamente el 1 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción.
- Para la protección del segundo grupo hidroxilo, la mezcla de reacción que comprende el Compuesto VIa se enfriá hasta aproximadamente 2 °C. Se añaden aproximadamente 0,10 equivalentes de *N,N*-dimetilaminopiridina, aproximadamente 1,50 equivalentes de cloruro de benzoilo y cloruro de metileno adicional. Se permite que la reacción continúe a aproximadamente 2 °C con agitación hasta que el análisis de cromatografía de capa fina (CCF) muestre la presencia de material de partida de *N*-palmitoil-1-O-tritil-esfingosina de menos de aproximadamente 5 %. Se añaden acetato de etilo y un ácido cítrico acuoso y solución de cloruro de sodio a la mezcla de reacción, y se recupera *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto VIb) de la fase orgánica.
- Para eliminar el grupo protector de tritilo, *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto VIb) se disuelve en metanol y cloruro de metileno y se enfriá hasta 2°C. El pH se modifica a 2,5 con una solución de 0,57 equivalentes de ácido para-toluenosulfónico monohidratado en metanol. Se permite que la reacción continúe a aproximadamente 22°C con agitación hasta que el análisis de CCF muestre la presencia de material de partida de 1-O-tritil-3-O-benzoil-esfingosina de menos de 5 %. Se añade trietilamina para modificar el pH a aproximadamente 7,0. La mezcla de reacción se evapora hasta secarla y la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina resultante bruta se suspende en hexano a aproximadamente 40 °C. Despues de aproximadamente 30 a 60 minutos, el sólido se aísla mediante filtración y se lava con hexano. A continuación, se puede purificar el producto resultante, *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto VIc), utilizando un procedimiento adecuado, tal como cromatografía en gel de sílice.
- Un equivalente de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto VIc) se disuelve en tolueno, se añaden aproximadamente de 0,6 a 1 equivalentes de tetrametiletilendiamina (TMEDA) y la mezcla se enfriá hasta aproximadamente 4-9 °C. Se añaden aproximadamente de 1 a 2 equivalentes de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en acetonitrilo, seguido de acetonitrilo adicional. La reacción se calienta hasta aproximadamente 22°C y se agita de manera continua durante 1-3 horas. Se añade acetonitrilo adicional y la temperatura se disminuye hasta aproximadamente -10 a 0°C. Se enfriá trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición, y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60 - 70°C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto VIe). La reacción se enfriá hasta aproximadamente -30°C y la suspensión resultante se filtra. La *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina bruta se purifica adicionalmente utilizando cromatografía con gel de sílice.
- Un equivalente de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina se disuelve en metanol, se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metileno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto C) de la capa orgánica.
- En otras realizaciones de la invención, se puede purificar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.
- En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85% y contiene no más de aproximadamente 15% de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90% y contiene no más de aproximadamente 10% de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95% y contiene no más de aproximadamente 5% de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98% y contiene no más de aproximadamente 2% de su enantiómero opuesto correspondiente.
- Se ha encontrado que el uso de un grupo benzoilo para proteger el alcohol secundario (3-OH) en relación con los procedimientos de la presente invención proporciona un beneficio sorprendente y no esperado de minimizar el alcance de migración de grupo protector del alcohol secundario (3-OH) al alcohol primario (1-OH).
- La Figura 8 es una fotografía de una placa cromatográfica de capa fina de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina bruta (Compuesto VIc). La *N*-palmitoil-1-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina es inferior a aproximadamente 1% de peso de

5 *N*-palmitoil- 3-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina (Compuesto VIc) e inferior a aproximadamente 0,5% de peso de los
productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la proporción en peso de la *N*-palmitoil-1-O-
benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina con respecto a la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina obtenida a partir de los
procedimientos presentes es aproximadamente de 10:90. En otras realizaciones de la invención, la proporción de peso
10 de la *N*-palmitoil-1-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina con respecto a la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina
obtenida a partir de los presentes procedimientos es aproximadamente de 5:95. En otras realizaciones de la
invención, la proporción en peso de la *N*-palmitoil-1-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina con respecto a la *N*-palmitoil-3-O-
benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina obtenida a partir de los presentes procedimientos es aproximadamente de 2:98. En otras
realizaciones de la invención, la proporción en peso de la *N*-palmitoil-1-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina con respecto a
15 la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-*eritro*-esfingosina obtenida a partir de los presentes procedimientos es aproximadamente
de 1:99.

15 Las realizaciones adicionales de la invención permiten una síntesis a gran escala de una *N*-acil-*D*-*eritro*-esfingomielina,
20 en particular, *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingomielina. En determinadas realizaciones de la invención, los presentes
procedimientos permiten la síntesis de una *N*-acil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de aproximadamente 1
kilogramo. En determinadas realizaciones de la invención, los presentes procedimientos permiten la síntesis de una
25 *N*-acil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 kilogramos. En otras
realizaciones de la invención, los presentes procedimientos permiten la síntesis de una *N*-acil-*D*-*eritro*-esfingomielina
a una escala de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 kilogramos. En otras realizaciones de la invención, los
presentes procedimientos permiten la síntesis de *N*-acil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de aproximadamente 1 a
30 aproximadamente 50 kilogramos. En otras realizaciones de la invención, los presentes procedimientos permiten la
síntesis de *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de aproximadamente 1 kilogramo. En otras realizaciones de la
invención, los presentes procedimientos permiten la síntesis de *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de
35 aproximadamente 1 a aproximadamente 5 kilogramos. En otras realizaciones de la invención, los presentes procedimientos
permiten la síntesis de *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de aproximadamente 1 a
40 aproximadamente 10 kilogramos. En determinadas realizaciones de la invención, los presentes procedimientos
permiten la síntesis de *N*-palmitoil-*D*-*eritro*-esfingomielina a una escala de aproximadamente 1 a aproximadamente 50
45 kilogramos.

30

35

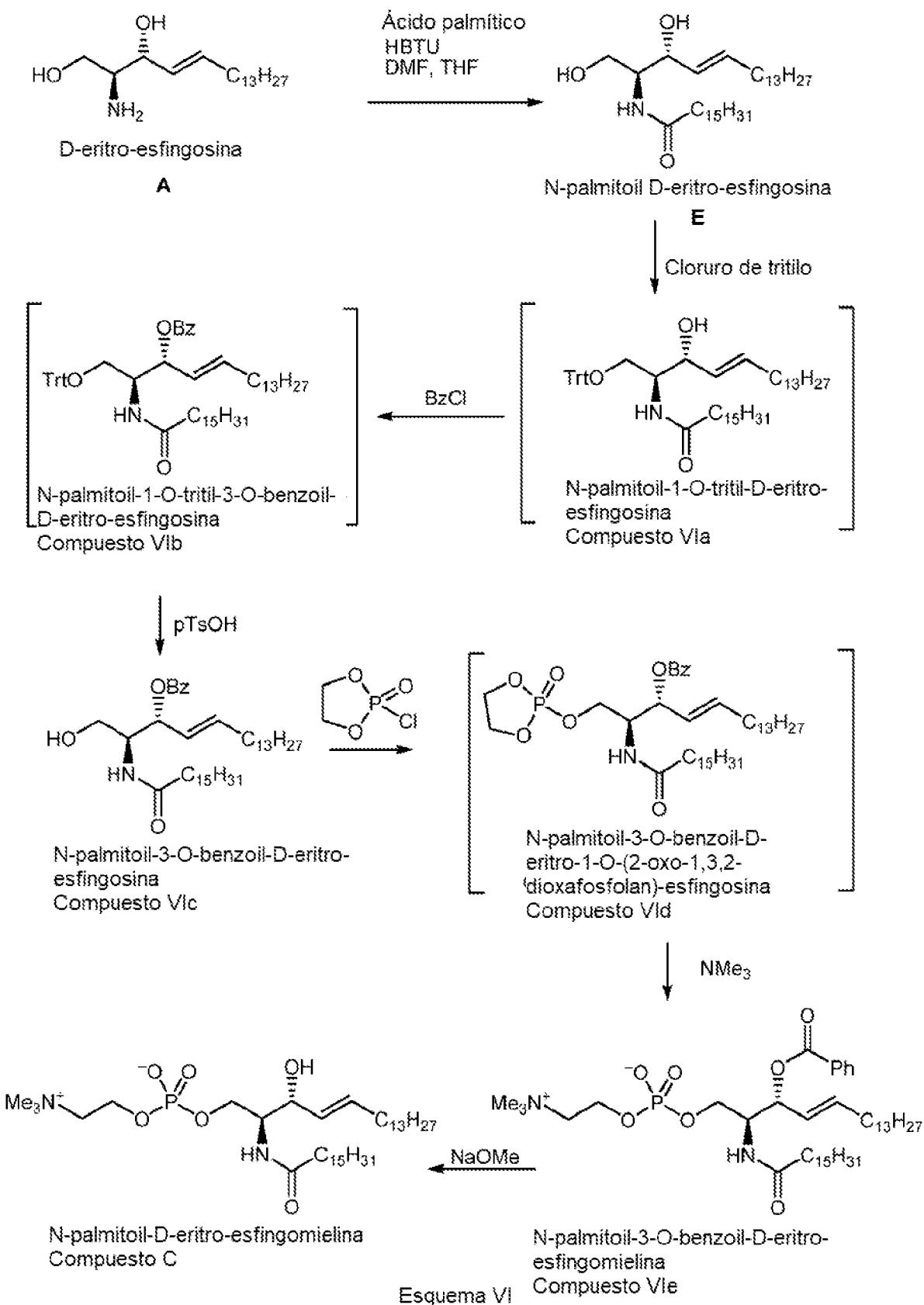
40

45

50

55

60



Síntesis de *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *D*-eritro-dihidroesfingomielina, tal como se muestra en el Esquema VII que comprenden las etapas de:

- 5 a) permitir que la *D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con un ácido graso (Compuesto VIIa) en condiciones efectivas para producir una *D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto VIIb);
- b) proteger el grupo hidroxilo primario de la *D*-eritro-dihidroceramida VIIb con un primer grupo protector para producir Compuesto VIIc;
- 10 c) proteger el grupo hidroxilo secundario de la *D*-eritro-dihidroceramida con un segundo grupo protector para producir Compuesto VIId;
- d) eliminar el primer grupo protector del Compuesto VIId para producir el Compuesto VIIe;
- e) permitir que el Compuesto VIIe reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en condiciones efectivas para producir el Compuesto VIIf;
- 15 f) permitir que el Compuesto VIIf reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir el Compuesto VIIg; y
- g) eliminar el segundo grupo protector del Compuesto VIIg con metóxido de sodio para producir la *D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto VIIh).

20

25

30

35

40

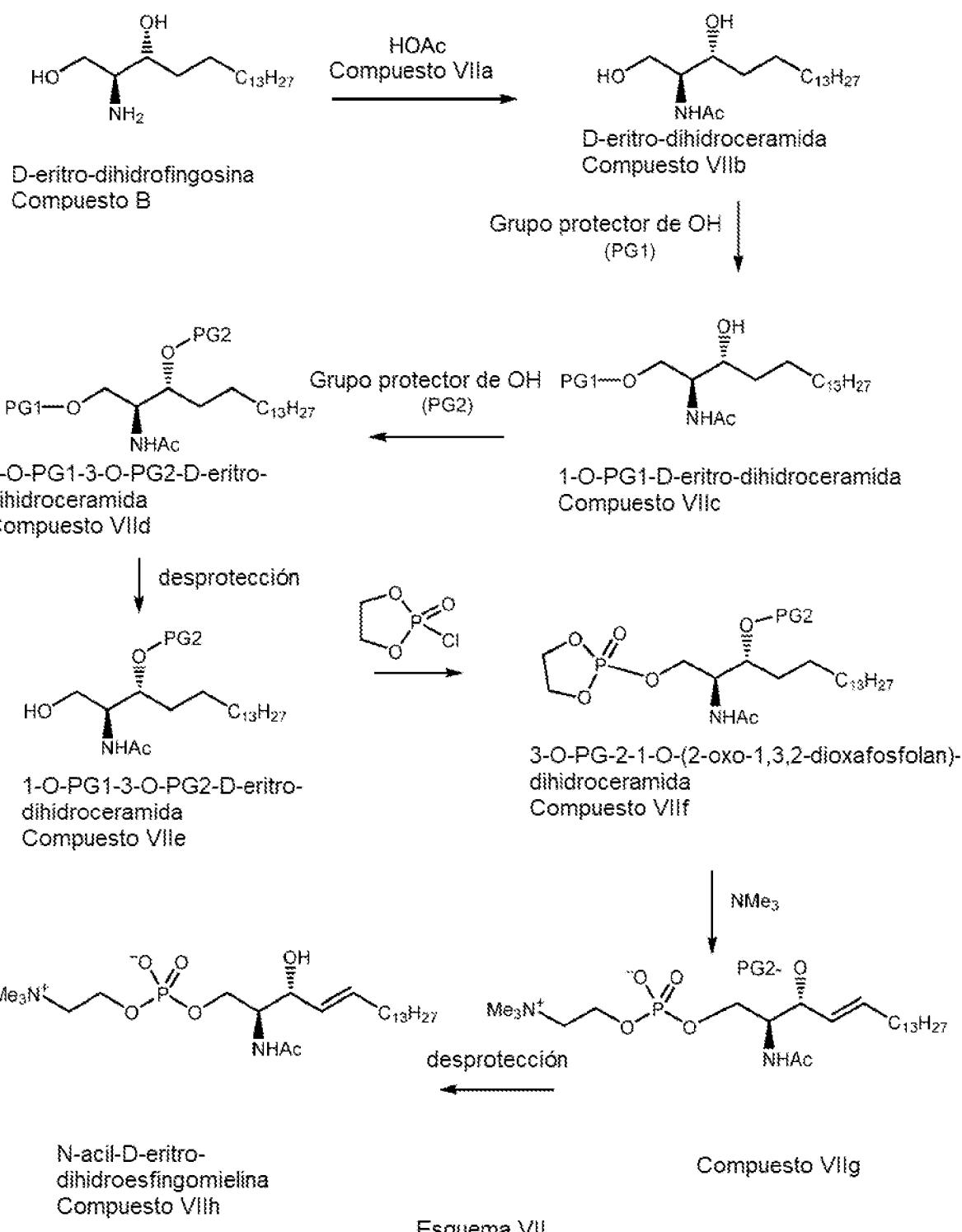
45

50

55

60

65



En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-acilación de la *D*-eritro-dihidroesfingosina con ácido graso para producir *D*-eritro-dihidroceramida procede, tal como se muestra en el Esquema VII. Las etapas son las siguientes: La *D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto B), el ácido graso (Compuesto Vila) y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá a una temperatura de aproximadamente 0-5°C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-Benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio--hexafluoro-fosfato (HBTU).

5 Se añade una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, a la mezcla de *D*-eritro-dihidroesfingosina, ácido graso y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 10 minutos. Después la mezcla, se agita durante 1 a 15 horas a temperatura de aproximadamente 0-22°C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a temperatura de aproximadamente 0-5°C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a 15 minutos. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a 22°C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a temperatura ambiente aproximadamente.

20 Despues de la agitación durante aproximadamente 1 a 15 horas, el producto, el Compuesto VIIb, se precipita mediante la adición de un ácido. En determinadas realizaciones de la invención, el ácido es un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido acético o ácido oxálico. Cuando se añade, el ácido puede estar en una solución acuosa. En el momento de adición del ácido, la reacción puede estar a aproximadamente 22°C. Se puede agitar la mezcla resultante durante 30 a 120 minutos a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la suspensión se agita a aproximadamente 25 25 22°C.

25 Despues de la agitación, la suspensión se filtra. A continuación, se puede resuspender el producto resultante, el Compuesto VIIb, en agua, despues de lo cual se puede filtrar y lavar. La resuspensión puede producirse al menos una vez más. Se puede lavar el producto resultante, *D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto VIIb), con agua, acetona o una mezcla de las mismas.

30 Síntesis de *D*-eritro-dihidroceramida protegida por benzoílo

En determinadas realizaciones de la invención, se protege el grupo hidroxilo primario de la *D*-eritro-ceramida, seguido de la protección del hidroxilo secundario y despues la desprotección del hidroxilo primario. En otras realizaciones de la invención, las etapas de protección y desprotección continúan sin aislamiento o purificación de la *N*-acil-*D*-eritro-ceramida protegida en hidroxilo primario.

40 En las realizaciones particulares de la invención, el grupo hidroxilo primario se protege con un grupo tritilo mediante la reacción de la *D*-eritro-dihidroceramida con un reactivo de tritilación, tal como, pero no limitado a, haluros de tritilo, tales como cloruro de tritilo y bromuro de tritilo. En determinadas realizaciones de la invención, el grupo hidroxilo secundario se protege con un grupo benzoílo mediante la reacción de la *D*-eritro-dihidroceramida protegida en 1-O con un reactivo benzoilante que incluye, tal como, pero no se limitan a, haluros de benzoílo, tales como cloruro de benzoílo y bromuro de tritilo. En otras realizaciones de la invención el grupo hidroxilo primario se protege con un grupo 45 tritilo y el hidroxilo secundario se protege con un grupo benzoílo.

45 En determinadas realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario procede de la siguiente manera: *D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto VIIb) y cloruro de tritilo se suspenden en un disolvente orgánico en presencia de una base. La reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 25-55 °C durante 50 aproximadamente 10 a 60 horas para producir la *D*-eritro-dihidroceramida protegida por tritilo (Compuesto Vc de 1-O-tritil-*D*-eritro-ceramida, donde PG1 = -Trt). El disolvente orgánico puede ser un disolvente no polar o polar. En una realización de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente no polar y es tolueno, benceno, hexano o las mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono. En otra realización, el disolvente orgánico aprótico es no clorado y es éter de dietilo, tetrahidrofurano o acetato de etilo. La base es 55 típicamente una base orgánica, tal como trietilamina o piridina.

60 En determinadas realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente 10 % molar de *N*-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente 7 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de 65 aproximadamente 5 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario, por ejemplo, utilizando cloruro de tritilo, produce no más de aproximadamente 1 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-esfingosina de los productos brutos de reacción.

En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo secundario prosigue directamente de la siguiente manera: la mezcla de reacción mencionada anteriormente se enfriá a aproximadamente 0-5 °C y se añaden cloruro de benzoílo y una base. La reacción continúa a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C durante aproximadamente 1 a 16 horas. El producto de reacción, 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto Vd; PG1= -Trt; PG2= -Bz) se puede extraer de la capa orgánica con un disolvente orgánico, que incluye, pero no se limita a, un disolvente orgánico aprótico descrito anteriormente. A continuación, se elimina el disolvente orgánico utilizando un procedimiento adecuado conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, evaporación, por ejemplo, concentración al vacío. En realizaciones particulares, la base es una base orgánica, tal como trietilamina o piridina.

En otras realizaciones de la invención, la desprotección del grupo hidroxilo primario prosigue directamente de la siguiente manera: el residuo de la reacción mencionada anteriormente se disuelve en un disolvente orgánico y se añade un ácido. La reacción continúa a una temperatura de aproximadamente 22°C durante 1 a 16 horas. La mezcla de reacción se neutraliza al añadir una base. El disolvente orgánico puede ser un disolvente polar prótico, un disolvente polar aprótico o una mezcla del mismo. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar prótico y es metanol, etanol, *n*-propanol o isopropanol. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es clorado y es cloruro de metileno, cloroformo o tetracloruro de carbono. En otra realización, el disolvente orgánico aprótico es no clorado y es éter dietílico, tetrahidrofurano o acetato de etilo. El ácido puede ser cualquier ácido conocido por el experto en la técnica para ser adecuado para eliminar el grupo protector de tritilo, por ejemplo, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido hidroclórico y ácido *p*-toluenosulfónico. En ciertas realizaciones de la invención, el ácido es ácido *p*-toluenosulfónico. En realizaciones particulares, la base es una base orgánica, tal como trietilamina o piridina.

En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar el producto de desprotección mencionado anteriormente (Compuesto Vile; PG2= -Bz) mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Fosforilación y aminación de *D*-eritro-dihidroceramida protegida por benzoílo para producir *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina protegida por benzoílo.

En otras realizaciones de la invención, la *D*-eritro-dihidroceramida protegida por 3-benzoílo, (Compuesto Vile; PG2 = -Bz), se fosforila de la siguiente manera: la *D*-eritro-dihidroceramida protegida por 3-benzoílo se disuelve en un disolvente orgánico y se añade una amina, después de enfriar hasta aproximadamente 4-9°C, se añade una solución de 2-Cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en un disolvente orgánico. La reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 4-22 °C durante aproximadamente 2 a 6 horas para producir 3-O-Benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-dihidroceramida (Compuesto VIIf, PG2 = - Bz). En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 4-9 °C durante aproximadamente 15 minutos a 2 horas y después se calienta hasta aproximadamente 22°C y sigue durante 2 a 4 horas adicionales. El disolvente orgánico puede ser un disolvente no polar, un disolvente polar o mezclas del mismo. En una realización de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente no polar y es tolueno, benceno, hexano o las mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico, tal como acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano o mezclas de los mismos. La amina es típicamente tetrametiletilendiamina o trietilamina. En determinadas realizaciones de la invención, la amina es tetrametiletilendiamina.

En determinadas realizaciones, la aminación de la 3-O-Benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-dihidroceramida (Compuesto VIIf, PG2 =-Bz) tiene lugar sin purificación o aislamiento de la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroceramida protegida por benzoílo fosforilado. Después de que la reacción mencionada anteriormente se haya desarrollado durante aproximadamente 2 a 6 horas, se añade disolvente orgánico adicional y la reacción se enfriá hasta aproximadamente -10 a 0 °C. Se enfriá trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición, y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60 – 70 °C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina protegida por benzoílo (Compuesto VIIe, PG2 = Bz). El disolvente orgánico puede ser un disolvente no polar, un disolvente polar o mezclas de los mismos. En una realización de la invención, el disolvente orgánico es un disolvente no polar y es tolueno, benceno, hexano o las mezclas de los mismos. En una realización, el disolvente orgánico es un disolvente polar aprótico, tal como acetonitrilo, acetato de etilo, tetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, la trimetilamina se añade como un líquido. En otras realizaciones, la trimetilamina se añade en forma de gas. En realizaciones particulares, la trimetilamina líquida es anhidra. En determinadas realizaciones la reacción se enfriá hasta aproximadamente -10 °C a 0 °C antes de añadir trietilamina líquida. En determinadas realizaciones, la reacción se enfriá hasta aproximadamente -10 °C antes de añadir trietilamina líquida.

En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina protegida por benzoílo mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Desprotección de *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina protegida por benzoílo para producir *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina

La eliminación del grupo protector de benzoilo de la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina protegida por benzoilo prosigue de la siguiente manera: la dihidroesfingomielina protegida por benzoilo se disuelve en un disolvente polar prótico y se añade una base. La reacción continúa durante 8 hasta 24 horas a aproximadamente 22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, se añaden un disolvente aprótico y agua a la mezcla de reacción y la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto VIIh) se recupera de la capa orgánica. En una realización, el disolvente polar prótico es metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol o mezclas de los mismos. En otra realización, la base es metóxido de sodio.

10 En determinadas realizaciones de la invención se puede purificar *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

15 En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de aproximadamente 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.

25 En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina que comprenden las etapas de:

- a) permitir que la *D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con un ácido graso en condiciones efectivas para producir una *D*-eritro-dihidroceramida;
- b) permitir que la *D*-eritro-dihidroceramida reaccione con un reactivo de tritilación en condiciones efectivas para producir una 1-O-tritil-*D*-eritro-dihidroceramida;
- c) permitir que la 1-O-tritil-*D*-eritro-dihidroceramida reaccione con un reactivo benzoilante en condiciones efectivas para producir 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida;
- d) eliminar al grupo tritilo de la 1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida para producir una 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida;
- e) permitir que la 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroceramida reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en condiciones efectivas para producir 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)-dihidroceramida;
- f) permitir que la 3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)-dihidroceramida reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir una *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina; y
- g) eliminar el grupo benzoilo de *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina con metóxido de sodio para producir *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina.

40 *Síntesis de N-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina*

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina que comprenden las etapas de:

45 a) permitir que la *D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con ácido palmítico en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina;

b) permitir que la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con un reactivo de tritilación en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-1-O-tritil-*D*-eritro-dihidroesfingosina;

50 c) permitir que la *N*-palmitoil-1-O-tritil-*D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con un reactivo benzoilante en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina;

d) eliminar el grupo tritilo de *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina;

e) permitir que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CPP) en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)-dihidroesfingosina;

f) permitir que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano)-dihidroesfingosina reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina; y

55 g) eliminar el grupo benzoilo de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina con metóxido de sodio para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina.

60 En una realización particular de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina se sintetiza tal como se muestra en el Esquema VIII.

65 Un equivalente de ácido palmítico, un equivalente de *D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto B), y 1,10 equivalentes de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluoro-fosfato (HBTU) se suspenden en tetrahidrofurano y dimetilformamida y se enfrián hasta aproximadamente 0-5 °C. Se añaden de dos a tres equivalentes de trietilamina y

la mezcla se agita durante aproximadamente una a doce horas a aproximadamente 0-5 °C. La mezcla se calienta hasta aproximadamente 22 °C. Se añade una solución acuosa de ácido cítrico y la mezcla se agita durante 15 a 90 minutos a aproximadamente 22 °C. La suspensión resultante se filtra y la torta se suspende en agua a temperatura ambiente. La suspensión se filtra y se lava con agua y acetona. A continuación, se puede secar al producto resultante, *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto F).

Para la protección del primer hidroxilo, se suspendió un equivalente de *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto F) en piridina y cloruro de metileno. Se añade una solución de aproximadamente 1,05 equivalentes de cloruro de trítilo en cloruro de metileno, seguido de cloruro de metileno adicional. La mezcla de reacción se agita a 25 °C durante 50-60 horas.

En determinadas realizaciones de la invención, la protección del hidroxilo primario produce menos de 10 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-dihidroesfingosina de los productos brutos de reacción. En determinadas realizaciones de la invención, la protección del hidroxilo primario produce menos del 7 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-dihidroesfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario produce menos del 5 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-dihidroesfingosina de los productos brutos de reacción. En otras realizaciones de la invención, la protección del grupo hidroxilo primario produce menos del 1 % molar de *N*-palmitoil-1,3-O,O-ditritil-*D*-eritro-dihidroesfingosina de los productos brutos de reacción.

Para la protección del segundo hidroxilo, la mezcla de reacción de la protección del primer hidroxilo que comprende *N*-palmitoil-1-O-trítil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto Villa) se enfriá hasta aproximadamente 2 °C, se añaden aproximadamente 0,10 equivalentes de *N,N*-Dimetilaminopiridina, aproximadamente 1,50 equivalentes de cloruro de benzoílo y cloruro de metileno adicional. Se permite que la reacción continúe a aproximadamente 2 °C con agitación hasta que el análisis de cromatografía de capa fina (CCF) muestre un contenido de material de partida de *N*-palmitoil-1-O-trítil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto VIIIa) de menos de aproximadamente 5%. Se añaden acetato de etilo y un ácido cítrico acuoso y solución de cloruro de sodio a la mezcla de reacción, y la *N*-palmitoil-1-O-Tritil-3-O-benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto VIIIb) se recupera de la fase orgánica.

Para eliminar el grupo protector de trítilo, la *N*-palmitoil-1-O-Tritil-3-O-benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto VIIIb) se disuelve en metanol y cloruro de metileno y se enfriá hasta 2 °C. El pH se modifica a 2,5 con una solución de 0,57 equivalentes de ácido para-toluenosulfónico monohidratado en metanol. Se permite que la reacción continúe a aproximadamente 22 °C con agitación hasta que el análisis de CCF muestre un contenido de material de partida de *N*-palmitoil-1-O-Tritil-3-O-benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto VIIIb) inferior al 5%. Se añade trietilamina para modificar el pH a aproximadamente 7,0. La mezcla de reacción se evapora a sequedad y la *N*-palmitoil-3-O-Benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingosina resultante bruta se suspende en hexano a aproximadamente 40 °C y se enfriá hasta aproximadamente 0 °C. Después de aproximadamente 30 a 60 minutos, el sólido se aísla mediante filtración y se lava con hexano. Se puede purificar al producto resultante utilizando un procedimiento adecuado, tal como cromatografía de gel sílice.

Un equivalente de *N*-palmitoil-3-O-Benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto VIIIc) se disuelve en tolueno y se añaden aproximadamente de 0,6 a 1 equivalentes de tetrametiletilendiamina y la mezcla se enfriá hasta aproximadamente 4-9 °C. Se añaden aproximadamente de 1 a 2 equivalentes de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en acetonitrilo, seguido de acetonitrilo adicional. La reacción se calienta hasta aproximadamente 22 °C y se agita de manera continua durante 1-3 horas. Se añade acetonitrilo adicional y la temperatura se disminuye hasta aproximadamente -10 a 0 °C. Se enfriá la trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60 - 70°C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto VIIIe). La reacción se enfriá hasta aproximadamente -30 °C y la suspensión resultante se filtra. La *N*-palmitoil-3-O-benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingomielina bruta se purifica adicionalmente utilizando cromatografía en gel de sílice.

Un equivalente de *N*-palmitoil-3-O-benzoíl-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto VIIIe) se disuelve en metanol y se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metileno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto D) de la capa orgánica.

En otras realizaciones de la invención, se puede purificar la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de

aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de 5

aproximadamente 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.

En realizaciones adicionales de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina se puede purificar mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

10 En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y no contiene más de aproximadamente 15 % de su correspondiente enantiómero opuesto. En realizaciones adicionales de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y no contiene más de 15

aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente el 95 % y no contiene más de 20

aproximadamente el 5 % de su correspondiente enantiómero opuesto. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente el 98 % y no contiene más de aproximadamente el 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.

20

25

30

35

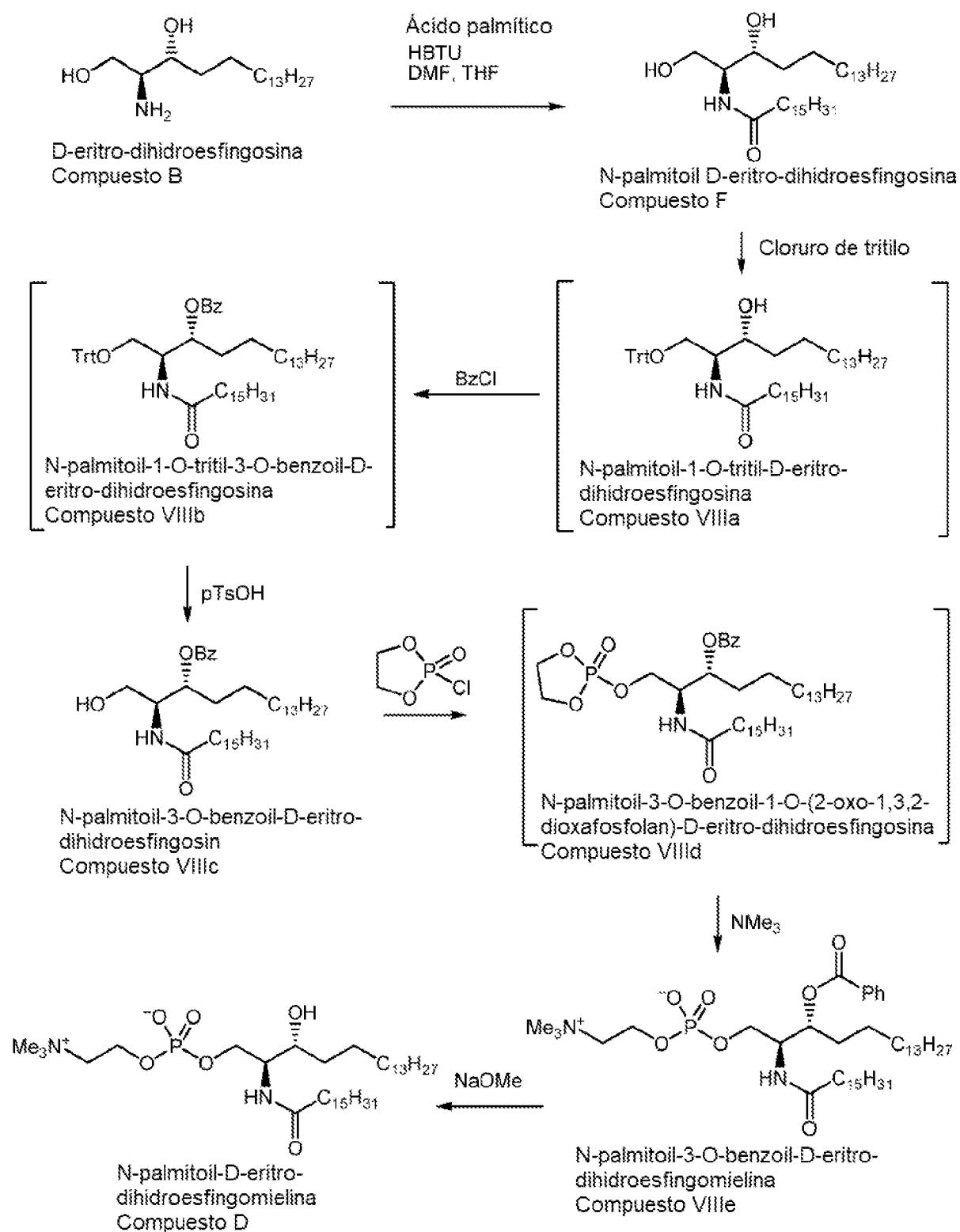
40

45

50

55

60



Esquema VIII

Protección de (2S, 3R, 4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto If)

- 5 En otra realización de la invención, el grupo hidroxilo secundario de (2S, 3R, 4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto If en el Esquema I) está protegido y la síntesis de la esfingomielina procede como se muestra en el Esquema IX.
- 10 En una realización particular de la invención, el grupo hidroxilo secundario de (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto If) se protege con un grupo benzoílo para producir (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-benzoil-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto IXa), tal como se muestra en el Esquema IX. La (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-benzoil-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina se disuelve después en metanol y de 2 a 3 equivalentes de cloruro de acetilo, generando ácido clorhídrico y eliminando el grupo protector terc-butoxicarbonilo (Boc), que da como resultado 3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (Compuesto IXb).
- 15 En determinadas realizaciones de la invención, la N-aciilación de 3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina con ácido palmítico para producir N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (Compuesto IXc) tiene lugar, tal como se muestra en el Esquema IX. Las etapas son las siguientes: 3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (Compuesto IXb), el ácido palmítico y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU).
- 20 Se añade una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, a la mezcla de 3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina, ácido palmítico y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 minutos. A continuación, la mezcla se agita de 1 a 15 horas a una temperatura de aproximadamente 0-22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 22 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente temperatura ambiente.
- 25 Despues de la agitación durante aproximadamente 1 a 15 horas, el producto se precipita añadiendo un ácido. En determinadas realizaciones de la invención, el ácido es un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido acético o ácido oxálico. Cuando se añade el ácido puede estar en una solución acuosa. En el momento de adición del ácido, la reacción puede estar a aproximadamente 22 °C. Se puede agitar la suspensión resultante durante 30 a 120 minutos a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la suspensión se agita a aproximadamente 22 °C.
- 30 35 40 45 50 55 60 65
- Despues de la agitación, la suspensión se filtra. A continuación, se puede resuspender el producto resultante en agua, después de lo cual, el producto se puede filtrar y lavar. La resuspensión puede producirse al menos una vez más. Se puede lavar el producto resultante, N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (Compuesto IXc), con agua, acetona o una mezcla de las mismas.
- En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina o uno o más de sus intermedios mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.
- Un equivalente de N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (Compuesto IXc) se disuelve en tolueno, se añaden aproximadamente de 0,6 a 1 equivalentes de tetrametiletendiamina (TMEDA) y la mezcla se enfriá hasta aproximadamente 4-9 °C. Se añaden aproximadamente de 1 a 2 equivalentes de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en acetonitrilo, seguido de acetonitrilo adicional. La reacción se calienta hasta aproximadamente 22 °C y se agita de manera continua durante 1-3 horas. Se añade acetonitrilo adicional y la temperatura se disminuye hasta aproximadamente -10 a 0 °C. Se enfriá trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60 – 70 °C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina (Compuesto IXe). La reacción se enfriá hasta aproximadamente -30 °C y la suspensión resultante se filtra. La N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina bruta (Compuesto IXe) se purifica adicionalmente utilizando cromatografía en gel de sílice.
- Un equivalente de N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina (Compuesto IXe) se disuelve en metanol y se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metileno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera la N-palmitoil-D-eritro-esfingomielina (Compuesto C) de la capa orgánica.
- En otras realizaciones de la invención se puede purificar la N-palmitoil-D-eritro-esfingomielina (Compuesto C)

mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

5 En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones más *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones más *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de aproximadamente 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.

15

20

25

30

35

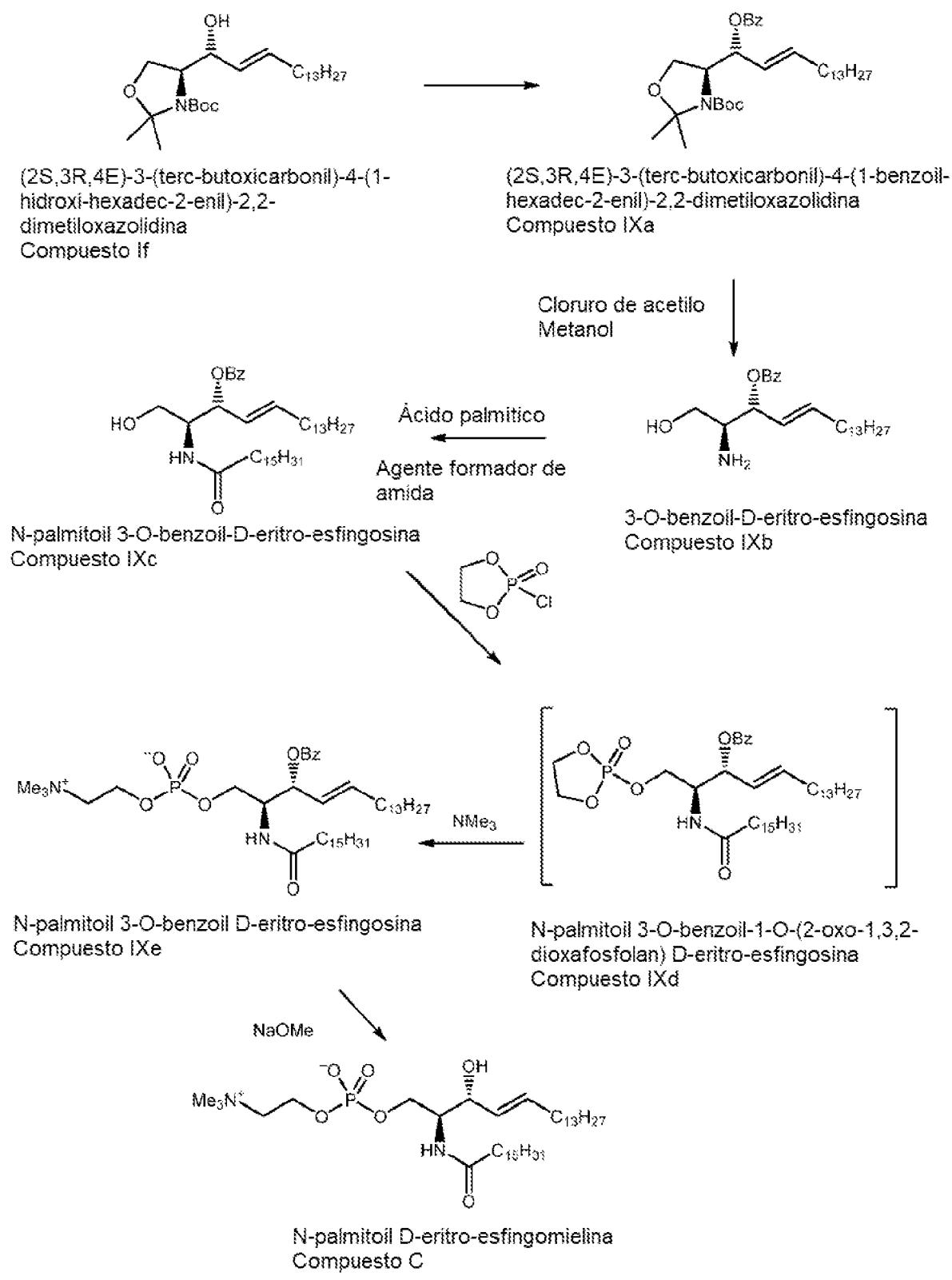
40

45

50

55

60



Esquema IX

describe a continuación.

En un aspecto de la invención, el grupo hidroxilo secundario de (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto If) se puede proteger con un grupo protector, tal como, pero no limitado a, un éster o un éter. En determinadas realizaciones de la invención, el grupo protector es un éster, tal como, pero no limitado a, éster de benzoílo o éster de fluorenilmetiloxicarbonilo. En otras realizaciones de la invención, el grupo protector es un éter, tal como, pero no limitado a, *t*-butildifenilsilil éter.

En una realización particular de la invención, el grupo hidroxilo secundario de (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto If) se protege con un grupo benzoílo para producir (2S,3R,4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-benzoil-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina (Compuesto Xa), tal como se muestra en el Esquema X. A continuación, el Compuesto Xa se disuelve en metanol y de 2 a 3 equivalentes de cloruro de acetilo, generando ácido clorhídrico y eliminando el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc), que da como resultado 3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto Xb). La 3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina a continuación se puede *N*-acilar mediante la adición de un ácido graso adecuado y un agente formador de amida. Las etapas son las siguientes: 3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto Xb), un ácido graso y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá hasta una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio--hexafluoro-fosfato (HBTU).

Se añade una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, a la mezcla de 3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (Compuesto Xb), ácido graso y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 minutos. A continuación, la mezcla se agita durante 1 a 15 horas a una temperatura de aproximadamente 0-22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 22 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente temperatura ambiente.

Después de la agitación durante aproximadamente 1 a 15 horas, el producto (Compuesto Xc) se precipita mediante la adición de un ácido. En determinadas realizaciones de la invención, el ácido es un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido acético o ácido oxálico. Cuando se añade el ácido puede estar en una solución acuosa. En el momento de adición del ácido, la reacción puede estar a aproximadamente 22 °C. Se puede agitar la suspensión resultante durante 30 a 120 minutos a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la suspensión se agita a aproximadamente 22 °C.

Después de la agitación, la suspensión se filtra. A continuación, se puede resuspender el producto resultante en agua, después de lo cual, el producto se puede filtrar y lavar. La resuspensión puede producirse al menos una vez más. Se puede lavar el producto resultante, 3-O-benzoil-*D*-eritro-ceramida (Compuesto Xc), con agua, acetona o una mezcla de las mismas.

En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar el Compuesto Xc o uno o más de sus intermedios mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

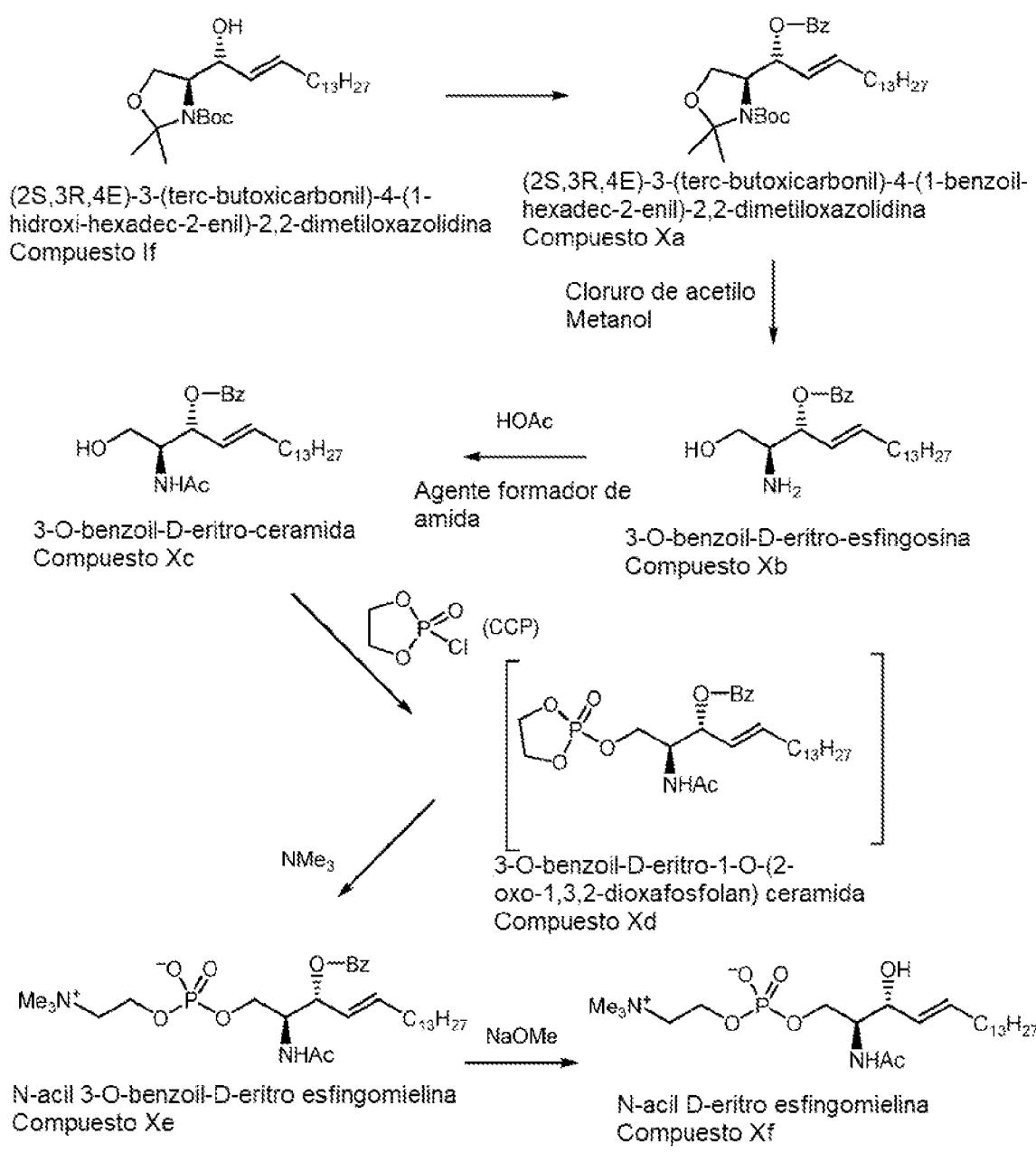
Se disuelve un equivalente del Compuesto Xc en tolueno, se añaden aproximadamente de 0,6 a 1 equivalentes de tetrametiletilendiamina (TMEDA) y la mezcla se enfriá hasta aproximadamente 4-9 °C. Se añaden aproximadamente de 1 a 2 equivalentes de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en acetonitrilo, seguido de acetonitrilo adicional. La reacción se calienta hasta aproximadamente 22 °C y se agita de manera continua durante 1-3 horas. Se añade acetonitrilo adicional y la temperatura se disminuye hasta aproximadamente -10 a 0 °C. Se enfriá trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición, y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60-70 °C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir *N*-acil-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto Xe). La reacción se enfriá hasta aproximadamente -30 °C y la suspensión resultante se filtra. La *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina bruta (Compuesto Xe) se purifica adicionalmente utilizando cromatografía en gel de sílice.

Se disuelve un equivalente de *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto Xe) en metanol, se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metíleno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto Xf) de la capa orgánica.

En otras realizaciones de la invención, se puede purificar *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina (Compuesto Xf) mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

5

En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingosina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente.



Esquema X

10

15

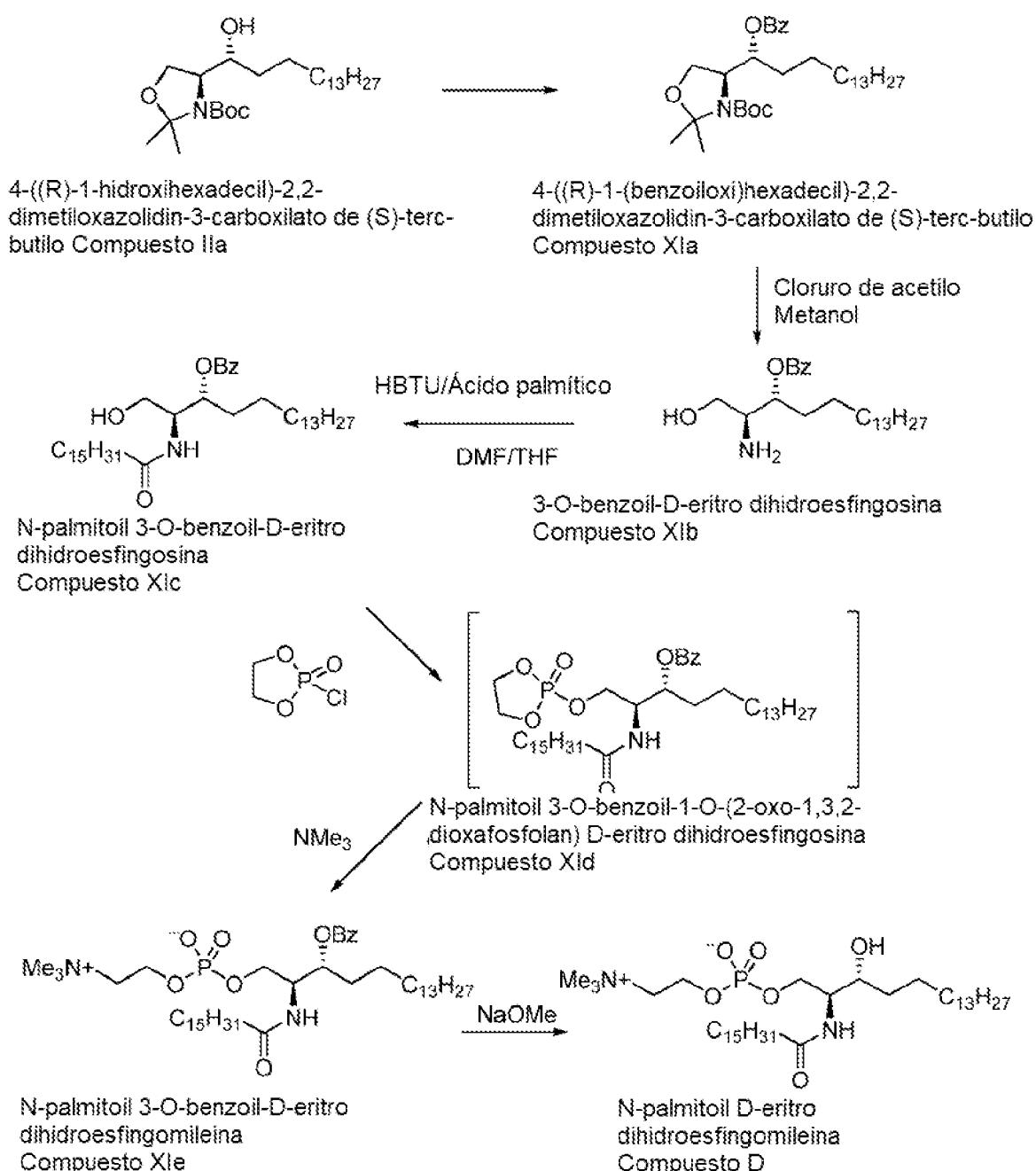
HOAc es un ácido graso. Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono.

Protección de 4-((R)-1-hidroxihexadecil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de (S)-terc-butilo (Compuesto IIa)

- 5 En otra realización de la invención, el hidroxilo secundario del precursor de esfingosina de 4-((R)-1-hidroxihexadecil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de (S)-terc-butilo (el Compuesto IIa en el Esquema II) se protege y la síntesis de la dihidroesfingomielina transcurre tal como se muestra en el Esquema XI.
- 10 En una realización particular de la invención, el grupo hidroxilo secundario de 4-((R)-1-hidroxihexadecil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de (S)-terc-butilo (Compuesto IIa) se protege con un grupo benzoilo para producir 4-((R)-1-(benzoiloxi)hexadecil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de (S)-terc-butilo (Compuesto XIa), tal como se muestra en el Esquema XI. A continuación, el Compuesto XIa se disuelve en metanol y de 2 a 3 equivalentes de cloruro de acetilo, generando ácido clorhídrico y eliminando el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc), que da como resultado 3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIb).
- 15 En determinadas realizaciones de la invención, la N-aciación de 3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina con ácido palmítico para producir N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIc) transcurre de la siguiente manera: 3-O benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIb), ácido palmítico y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá hasta una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HB-TU).
- 20 Se añade una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, a la mezcla de 3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina, ácido palmítico y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 minutos. A continuación, la mezcla se agita durante 1 a 15 horas a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 22 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente temperatura ambiente.
- 25 Despues de la agitación durante aproximadamente 1 a 15 horas, el producto se precipita mediante la adición de un ácido. En determinadas realizaciones de la invención, el ácido es un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido acético o ácido oxálico. Cuando se añade, el ácido puede estar en una solución acuosa. En el momento de adición del ácido, la reacción puede estar a aproximadamente 22 °C. Se puede agitar la suspensión resultante durante 30 a 120 minutos a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la suspensión se agita a aproximadamente 22 °C.
- 30 Despues de la agitación, la suspensión se filtra. A continuación, se puede resuspender el producto resultante en agua, después de lo cual, el producto se puede filtrar y lavar. La resuspensión puede producirse al menos una vez más. Se puede lavar el producto resultante, N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIc), con agua, acetona o una mezcla de las mismas.
- 35 En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar la N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina o uno o más de sus intermedios mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.
- 40 Un equivalente de N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIc) se disuelve en tolueno, se añaden aproximadamente de 0,6 a 1 equivalentes de tetrametiletilendiamina (TMEDA) y la mezcla se enfriá hasta aproximadamente 4-9 °C. Se añaden aproximadamente de 1 a 2 equivalentes de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en acetonitrilo, seguido de acetonitrilo adicional. La reacción se calienta hasta aproximadamente 22 °C y se agita de manera continua durante 1-3 horas. Se añade acetonitrilo adicional y la temperatura se disminuye hasta aproximadamente -10 a 0 °C. Se enfriá trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición, y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60-70°C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIe). La reacción se enfriá hasta aproximadamente -30 °C y la suspensión resultante se filtra. La N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingomielina bruta (Compuesto XIe) se purifica adicionalmente utilizando cromatografía en gel de sílice.
- 45 Un equivalente de N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIe) se disuelve en metanol y se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metileno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera N-palmitoil-D-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto D) de la capa orgánica.
- 50 En otras realizaciones de la invención se puede purificar N-palmitoil-D-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto D)
- 55
- 60
- 65

mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

- 5 En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de aproximadamente 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.
- 10

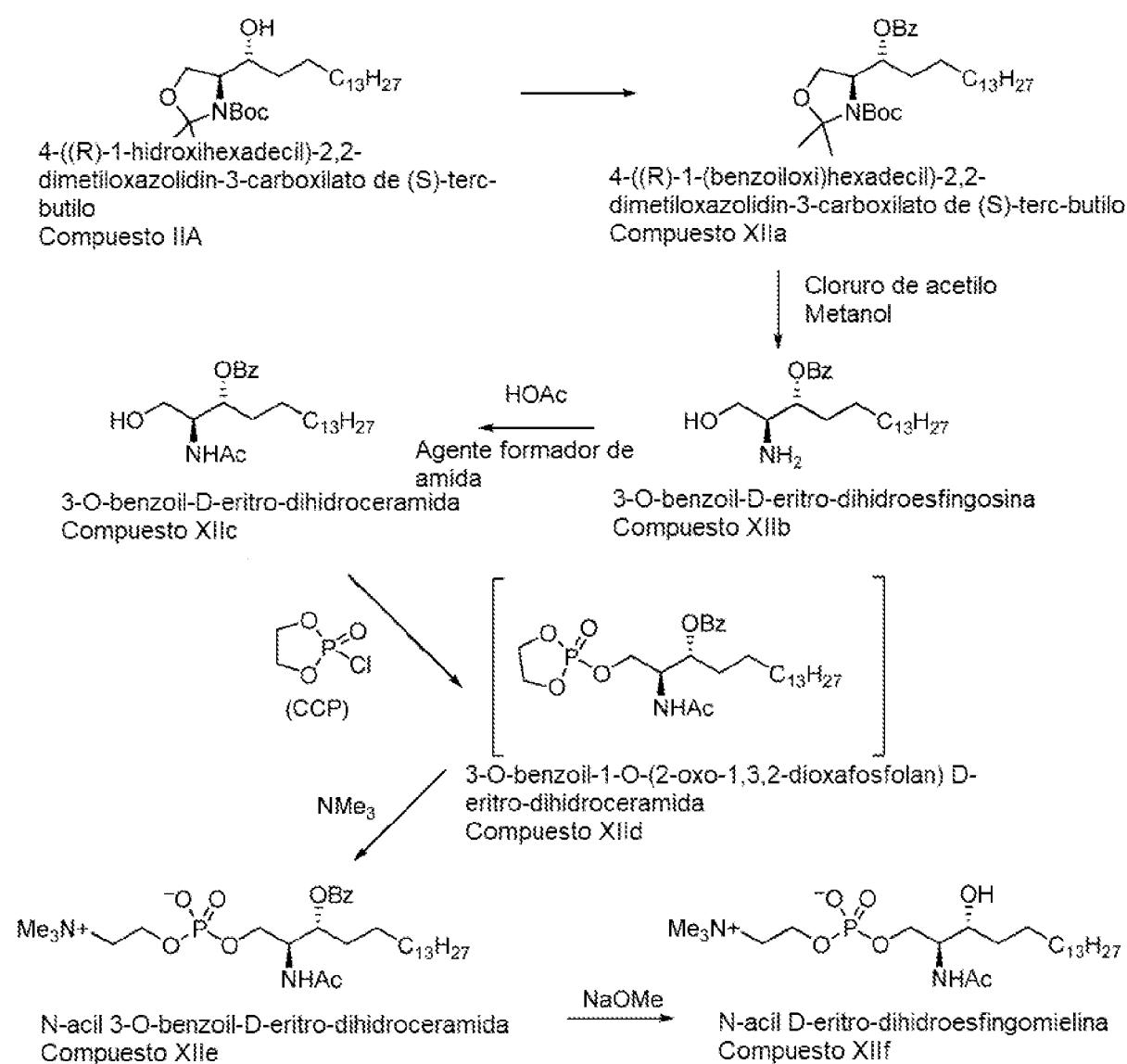


Esquema XI

- En determinadas realizaciones de la invención, una *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina se prepara de la manera que se describe a continuación.
- 5 En un aspecto de la invención, el grupo hidroxilo secundario de 4((*R*)-1-hidroxihexadecil)-2,2-dimetiloxazolidina-3-carboxilato de (*S*)-terc-butilo (Compuesto IIa) se puede proteger con un grupo protector, tal como, pero no limitado a, un éster o un éter. En determinadas realizaciones de la invención, el grupo protector es un éster, tal como, pero no limitado a, éster de benzoílo o éster de fluorenilmetiloxicarbonilo. En otras realizaciones de la invención, el grupo protector es un éter, tal como, pero no limitado a, *t*-butildifenilsilil éter.
- 10 En una realización particular de la invención, el grupo hidroxilo secundario del Compuesto IIa se protege con un grupo benzoílo para producir el Compuesto XIIa, tal como se muestra en el Esquema XII. A continuación, el Compuesto XIIa se disuelve en metanol y de 2 a 3 equivalentes de cloruro de acetilo, generando ácido clorhídrico y eliminando el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc), que da como resultado 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb). La 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina a continuación se puede *N*-acilar mediante la adición de un ácido graso adecuado y un agente formador de amida. Las etapas son las siguientes: la 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb), un ácido graso y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU).
- 15 En una realización particular de la invención, el grupo hidroxilo secundario del Compuesto IIa se protege con un grupo benzoílo para producir el Compuesto XIIa, tal como se muestra en el Esquema XII. A continuación, el Compuesto XIIa se disuelve en metanol y de 2 a 3 equivalentes de cloruro de acetilo, generando ácido clorhídrico y eliminando el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc), que da como resultado 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb). La 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina a continuación se puede *N*-acilar mediante la adición de un ácido graso adecuado y un agente formador de amida. Las etapas son las siguientes: la 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb), un ácido graso y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU).
- 20 En una realización particular de la invención, el grupo hidroxilo secundario del Compuesto IIa se protege con un grupo benzoílo para producir el Compuesto XIIa, tal como se muestra en el Esquema XII. A continuación, el Compuesto XIIa se disuelve en metanol y de 2 a 3 equivalentes de cloruro de acetilo, generando ácido clorhídrico y eliminando el grupo protector de terc-butoxicarbonilo (Boc), que da como resultado 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb). La 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina a continuación se puede *N*-acilar mediante la adición de un ácido graso adecuado y un agente formador de amida. Las etapas son las siguientes: la 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb), un ácido graso y un agente formador de amida se suspenden en un disolvente orgánico aprótico y la mezcla se enfriá a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En una realización, el disolvente orgánico aprótico es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la invención, el agente formador de amida es O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (HBTU).
- 25 Una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, se añade a la mezcla de 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb), ácido graso y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 minutos. A continuación, la mezcla se agita durante 1 a 15 horas a una temperatura de aproximadamente 0-22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 22 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente temperatura ambiente.
- 30 Una base orgánica, tal como, pero no limitada a, trietilamina o piridina, se añade a la mezcla de 3-O-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina (Compuesto XIIb), ácido graso y agente formador de amida. En determinadas realizaciones, la base orgánica es un disolvente orgánico aprótico y es tetrahidrofurano, dimetilformamida, 2-metiltetrahidrofurano o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la invención, la base orgánica se añade en el transcurso de aproximadamente 15 a 90 minutos. A continuación, la mezcla se agita durante 1 a 15 horas a una temperatura de aproximadamente 0-22 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la reacción prosigue a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente 22 °C. En otras realizaciones de la invención, la reacción prosigue a aproximadamente temperatura ambiente.
- 35 Despues de la agitación durante aproximadamente 1 a 15 horas, el producto (Compuesto XIIc) se precipita mediante la adición de un ácido. En determinadas realizaciones de la invención, el ácido es un ácido orgánico, tal como ácido cítrico, ácido acético o ácido oxálico. Cuando se añade, el ácido puede estar en una solución acuosa. En el momento de adición del ácido, la reacción puede estar a aproximadamente 22 °C. Se puede agitar la suspensión resultante durante 30 a 120 minutos a una temperatura de aproximadamente 0-5 °C. En determinadas realizaciones de la invención, la suspensión se agita a aproximadamente 22 °C.
- 40 Despues de la agitación, la suspensión se filtra. A continuación, se puede resuspender el producto resultante en agua, despues de lo cual, el producto se puede filtrar y lavar. La resuspensión puede producirse al menos una vez más. El producto resultante, 3-O-benzoil- 20 *D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto XIIc), se puede lavar con agua, acetona o una mezcla de las mismas.
- 45 En determinadas realizaciones de la invención, se puede purificar el Compuesto XIIc o uno o más de sus intermedios mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.
- 50 Un equivalente del Compuesto XIIc se disuelve en tolueno, se añaden aproximadamente de 0,6 a 1 equivalentes de tetrametiletendiamina (TMEDA) y la mezcla se enfriá hasta aproximadamente 4-9°C. Se añaden aproximadamente de 1 a 2 equivalentes de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) en acetonitrilo, seguido de acetonitrilo adicional. La reacción se calienta hasta aproximadamente 22 °C y se agita de manera continua durante 1-3 horas. Se añade acetonitrilo adicional y la temperatura se disminuye hasta aproximadamente -10 a 0 °C. Se enfriá trietilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición, y se añaden aproximadamente de 40 a 60 equivalentes de dicha trietilamina líquida. La mezcla de reacción se calienta hasta aproximadamente 60-70 °C y prosigue durante 10 a 16 horas para producir *N*-acil-*O*-benzoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIIe). La reacción se enfriá hasta aproximadamente -30 °C y la suspensión resultante se filtra. La *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina bruta (Compuesto XIIe) se purifica adicionalmente utilizando cromatografía en gel de sílice.
- 55 Un equivalente de *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIIe) se disuelve en metanol, se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metileno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIIf) de la capa orgánica.
- 60 Un equivalente de *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIIe) se disuelve en metanol, se añaden aproximadamente 0,2 equivalentes de metóxido de sodio y la mezcla se agita durante 20-26 horas a aproximadamente 22 °C. Se añaden cloruro de metileno y agua y se modifica el pH hasta aproximadamente 7 con la adición de ácido clorhídrico. Se recupera *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIIf) de la capa orgánica.
- 65 En otras realizaciones de la invención, se puede purificar *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto XIIf) mediante recristalización, cromatografía en gel de sílice, cromatografía líquida de alta resolución u otros

procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

En determinadas realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingosina resultante tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 85 % y contiene no más de aproximadamente 15 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 90 % y contiene no más de aproximadamente 10 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 95 % y contiene no más de aproximadamente 5 % de su enantiómero opuesto correspondiente. En otras realizaciones, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina tiene una pureza enantiomérica de al menos aproximadamente 98 % y contiene no más de aproximadamente 2 % de su enantiómero opuesto correspondiente.

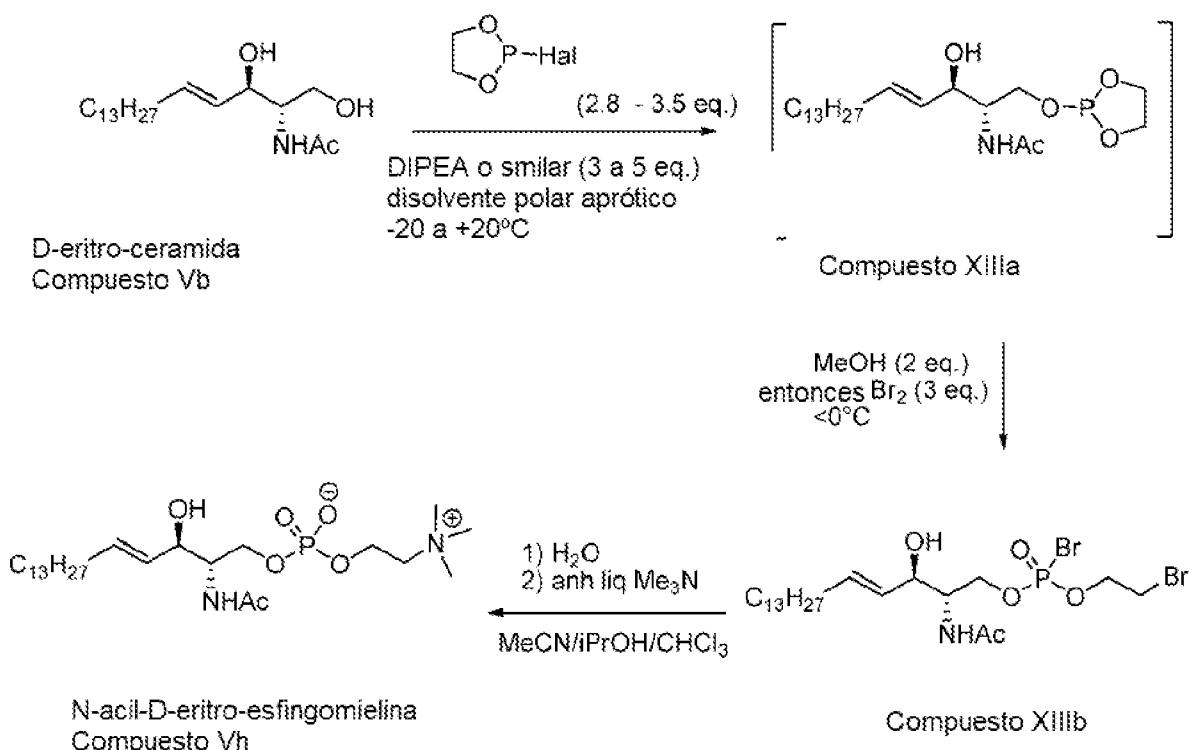


Esquema XII

HOAc es un ácido graso. Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono.

Síntesis de una N-aci-D-eritro-esfingomielina sin protección del grupo hidroxilo secundario

- 5 En determinadas realizaciones de la invención, una *D*-eritro-ceramida (Compuesto Vb) se fosforila directamente con halofosfito de etileno, tal como se muestra en el Esquema XIII. La reacción prosigue en presencia de aproximadamente 2,5-3,5 equivalentes de halofosfito de etileno en presencia de aproximadamente 4-10 equivalentes de una base en un disolvente polar aprótico que tiene una constante dieléctrica grande (>20) y un momento dipolar grande. En determinadas realizaciones, la reacción transcurre a aproximadamente -20 a +20 °C. En determinadas realizaciones, el disolvente polar aprótico tiene una constante dieléctrica superior a 20. En determinadas realizaciones, el disolvente polar aprótico es cloroformo, nitrometano, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el halofosfito es clorofosfito. En otras realizaciones, la reacción prosigue con 3 equivalentes de clorofosfito de etileno. En otras realizaciones, la base es *N,N*-diisopropiletilamina. En otras realizaciones, la reacción transcurre con 5 equivalentes de *N,N*-diisopropiletilamina.
- 10 15 Sin estar ligado a ningún mecanismo particular, se cree que dicho disolvente dificulta, por ejemplo, mediante solvatación de las fracciones de hidroxilo, la unión de hidrógeno intramolecular en la ceramida. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a: cloroformo, nitrometano, acetonitrilo, acetona o dimetilsulfóxido.
- 20 25 Despues de inactivar el halofosfito de etileno que no ha reaccionado con un alcohol, el fosfato cíclico (Compuesto XIIIa) se oxida y el anillo se abre en presencia de bromo a temperaturas entre aproximadamente -50 a 10 °C, en una realización de aproximadamente -20 °C, para producir un derivado de ceramida-bromo (Compuesto XIIIb), cuyo enlace P-Br se hidroliza mediante la adición de agua. En realizaciones particulares de la invención, el alcohol es metanol o etanol. El Compuesto XIIIb se cuaterniza con trietilamina líquida anhidra para producir *N*-aci-D-eritro-esfingomielina (Compuesto Vh). En otras realizaciones de la invención, la *N*-aci-D-eritro-esfingomielina es *N*-palmitoil-D-eritro-esfingomielina.



- 30 Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono.

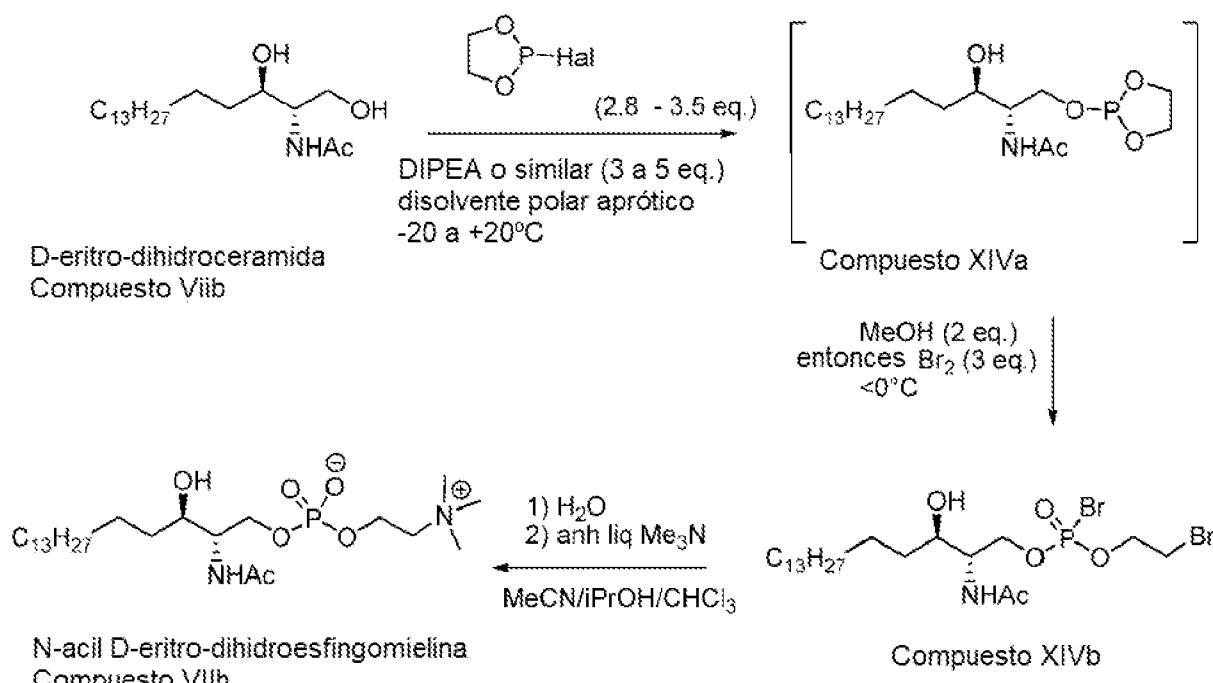
En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-D-eritro-esfingomielina, que comprenden las etapas de:

a) permitir que *N*-palmitoil-D-eritro-esfingosina reaccione con clorofosfito de etileno en condiciones efectivas para

- producir *N*-(2*S*,3*R*,*E*)-1-((1,3,2-dioxafosfolano-2-il)oxi)-3-hidroxiocitadec-4-en-2-il)palmitoilamida;
- b) permitir que *N*-(2*S*,3*R*,*E*)-1-((1,3,2-dioxafosfolan-2-il)oxi)-3-hidroxiocitadec-4-en-2-il)palmitoilamida reaccione con bromo en condiciones efectivas para producir ((2*S*,3*R*,*E*)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadec-4-en-1-il)fosforobromidato de 2-bromoetilo; y
- 5 c) permitir que ((2*S*,3*R*,*E*)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadec-4-en-1-il)fosforobromidato de 2-bromoetilo reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina.

Síntesis de *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina sin protección del grupo hidroxilo secundario

- 10 En determinadas realizaciones de la invención, la *D*-eritro-dihidroceramida (Compuesto VIIb) se fosforila directamente con halofosfato de etileno, tal como se muestra en el Esquema XIV. La reacción prosigue en presencia de aproximadamente 2,5-3,5 equivalentes de halofosfato de etileno en presencia de aproximadamente 4-10 equivalentes de una base en un disolvente polar aprótico que tiene una constante dieléctrica grande (>20) y un momento dipolar grande. En determinadas realizaciones, la reacción transcurre a aproximadamente de -20 a +20 °C. En determinadas realizaciones, el disolvente polar aprótico tiene una constante dieléctrica superior a 20. En determinadas realizaciones, el disolvente polar aprótico es cloroformo, nitrometano, acetonitrilo, acetona, dimetilsulfóxido o mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el halofosfato es clorofosfato de etileno. En otras realizaciones, la reacción prosigue con 3 equivalentes de clorofosfato de etileno. En otras realizaciones, la base es *N,N*-diisopropiletilamina. En otras realizaciones, la reacción transcurre con 5 equivalentes de *N,N*-diisopropiletilamina.
- 15 20 Sin estar ligado a ningún mecanismo particular, se cree que dicho disolvente dificulta, mediante solvatación de las fracciones de hidroxilo, la unión de hidrógeno intramolecular en la acil dihidroceramida. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a: cloroformo, nitrometano, acetonitrilo, acetona o dimetilsulfóxido.
- 25 30 Despues de inactivar el halofosfato de etileno que no ha reaccionado con un alcohol, el fosfato cíclico (Compuesto XIVa) se oxida simultáneamente y el anillo se abre en presencia de bromo a temperaturas entre aproximadamente -50 a 10 °C (preferiblemente aproximadamente -20 °C) para producir un derivado de bromo de dihidroceramida (Compuesto XIVb), cuyo enlace P-Br se hidroliza mediante la adición de agua. En realizaciones particulares de la invención el alcohol es metanol o etanol. El Compuesto XIVb se cuaterniza con trietilamina líquida anhidra para conseguir la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina (Compuesto VIIh). En otras realizaciones de la invención, la *N*-acil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina es *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina.



Esquema XIV

35 Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces de carbono-carbono.

En otra realización, la presente invención proporciona procedimientos para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina que comprenden las etapas de:

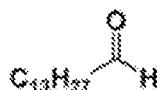
- a) permitir que *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingosina reaccione con clorofosfato de etileno en condiciones efectivas para producir *N*-(2S,3R)-1-((1,3,2-dioxafosfolano-2-il)oxi)-3-hidroxioctadecan-2-il)palmitamida;
 b) permitir que *N*-(2S,3R)-1-((1,3,2-dioxafosfolano-2-il)oxi)-3-hidroxioctadecan-2-il)palmitamida reaccione con bromo en condiciones efectivas para producir ((2S,3R)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadecil)fosforobromidato de 2-bromoetilo;
 5 y
 c) permitir que el ((2S,3R)-3-hidroxi-2-palmitamidoctadecil) fosforobromidato de 2-bromoetilo reaccione con trimetilamina en condiciones efectivas para producir la *N*-palmitoil-*D*-eritro-dihidroesfingomielina.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1: Síntesis de *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina**

15 **Etapa 1: Síntesis de 2-(E)-Hexadecenal**

15 **Etapa 1.1: 1-tetradecanal**



20 A una solución de 1-tetradecanol (110,0 g; 0,513 mol) y ácido tricloroisocianúrico (178,1 g; 0,77 mol) en cloruro de metileno (1500 ml) a -30 °C se añadió (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo (TEMPO) (300 mg; 0,051 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a 0 °C y se filtró sobre celite. La fase orgánica recogida se lavó a continuación con una solución saturada de Na₂CO₃ (800 ml), seguida de HCl 1 N (800 ml). Después se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a vacío para dar lugar al compuesto del título, 1-tetradecanal, como un sólido blanco (99,6 g; 91%).

25 **Etapa 1.2: 2-hexadecenoato de etilo**



30 A una suspensión de NaH (2,4 g, 0,059 mol) en tetrahidrofurano anhídrico (40 ml), se añadió fosfonoacetato de trietilo (9,4 ml, 0,047 mol), gota a gota, a 0 °C. Despues de agitar durante 30 minutos a 0 °C, se añadió una solución de tetradecanal (10,0 g, 0,047 mol) en tetrahidrofurano (40 ml) y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3 h adicionales. A continuación, se añadió una solución saturada de NaCl (50 ml) y la capa acuosa se extrajo con Et₂O (3 x 200 ml). Las capas orgánicas se juntaron, se secaron sobre MgSO₄ y se filtraron y se evaporaron los disolventes. El producto resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de silice (heptano-acetato de etilo: 95/5) para dar el compuesto del título, 2-hexadecenoato de etilo, como un líquido incoloro (12,3 g; 92%).

35 R_f = 0,24 (Hexano/Et₂O: 95/5).

CG: tr = 13,13 min (etriethylfosfonoacetato); tr = 15,80 min (1-tetradecanal); tr = 20,60 min (acetato de 2-hexadecenoato);
 40 ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 0,87 (t, 3H, CH₃); 1,25 (ancho, 20 H); 1,28 (t, 3H, CH₃); 1,44 (m, 2 H, CH₂); 2,18 (qd, 2H, CH₂, ³J = 6,5 Hz, ⁴J = 1,5 Hz); 4,18 (q, 2H, CH₂); 5,80 (dt, 1 H, ³J = 15,5 Hz, ⁴J = 1,5 Hz); 6,96 (dt, 1H, CH₂, ³J = 15,5 Hz, ⁴J = 6,5 Hz).

45 **Etapa 1.3: 2-(E)-Hexadecen-1-ol**



50 Se añadió hidruro de diisobutilaluminio (54,5 ml, 1 M en ciclohexano, 0,054 mol), gota a gota a 0°C, a una solución de 2-hexadecenoato de etilo (6,4 g, 0,023 mol) en tetrahidrofurano (20 ml). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C hasta que se consumió por completo el material de partida según se controló por CCF. Se añadieron sucesivamente Et₂O (50 ml) y una solución saturada de tartrato de sodio (50 ml) mientras se agitaba hasta que eran claramente visibles 2 capas separadas. La capa acuosa se extrajo con Et₂O (2 x 50 ml). Las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre MgSO₄ y los disolventes se eliminaron al vacío para dar el compuesto del título, 2-(E)-hexadecen-1-ol, como un sólido ceroso blanco (5,3 g; 97%).

55 R_f = 0,31 (hexano/Et₂O: 1/1).

CG: tr = 19,1 min
¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): 0,87 (t, 3H, CH₃); 1,25 (ancho, 22 H); 2,03 (q, 2H, CH₂, ³J = 6,0 Hz); 4,09 (d, 1 H, ³J = 5 Hz); 5,66 (m, 2 H).

Etapa 1.4: 2-(E)-Hexadecen-1-ol

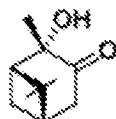
- 5 A una solución de 2-(E)-Hexadecen-1-ol (5,2 g; 0,022 mol) en cloruro de metileno (30 ml) bajo argón a 0 °C, se añadió una suspensión de clorocromato de piridinio (PCC) (16,3 g; 0,043 mol) en cloruro de metileno (30 ml) seguido de celite (20 g). Después de agitar durante 3 h a 0 °C, la mezcla de reacción se diluyó con 20 ml de éter dietílico y se filtró sobre un lecho de sílice (heptano-acetato de etilo: 95/5) para dar el compuesto del título, 2-(E)-hexadecen-1-ol, como un sólido blanco (2,2 g; 43%).
 10 $R_f = 0,14$ (hexano/Et₂O: 95/5)
 CG: $tr = 18,9$ min
¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): 0,88 (t, 3H, CH₃); 1,26 (ancho, 20 H); 1,50 (m, 2H, CH₂); 2,35 (qd, 2H, ³J = 7 Hz, ⁴J = 1,5 Hz); 6,1 (ddt, 1H, ³J = 15,5 Hz, ³J = 8 Hz, ⁴J = 1,5 Hz); 6,85 (td, 1H, ³J = 15,5 Hz, ³J = 7 Hz); 9,5 (d, 1H, ³J = 8 Hz).
- 15

Etapa 2: Síntesis de (1R, 2R, 5R)-(+)-2-Hidroxi-3-PinanonaEtapa 2.1: (1R, 2R, 3S, 5R)-(-)-Pinanodiol

20



- 25 Se combinaron S-(-)- α -pineno (24,3 g; 0,18 mol), osmato de potasio dihidratado (0,13 g), *N*-metilmorfolina-*N*-óxido (60% en agua; 0,21 mol; 41,7 g) disueltos en 17,3 ml de piridina, 107 ml de acetona y 11,9 ml de agua desionizada en un matraz de tres bocas de 250 ml. La mezcla de reacción se calentó a refljo durante 60 horas y, a continuación, se diluyó con metil terc-butil éter (MTBE) (300 ml) y hexano (60 ml). A continuación, se añadió agua (200 ml) y la capa orgánica se decantó, se lavó sucesivamente con ácido cítrico al 10% (3 x 100 ml), una solución saturada de NaHCO₃ (100 ml), salmuera (100 ml) y, a continuación, se secó sobre MgSO₄ y se filtró. Los disolventes se eliminaron al vacío para dar el compuesto del título, 1R, 2R, 3S, 5R)-(-)-pinanodiol, como un aceite naranja oscuro (24,5 g).
 30 CG: $tr = 12,0$ min (diol); $tr = 10,9$ min (1R, 2R, SR)-(+)-2-hidroxi-3-pinanona; (5 - 10%)

Etapa 2.2: (1R, 2R, 5R)-(+)-2-hidroxi-3-pinanona

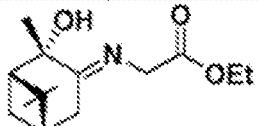
35

- Se añadió trietilamina (Et₃N) (80,2 ml; 0,58 mol) a una solución de (1R, 2R, 3S, 5R)-(-)-pinanodiol (24,5 g; 143,9 mmol) en una mezcla de disolventes de sulfóxido de dimetilo/cloruro de metileno (154 ml; 1/1) a 10 °C. A continuación, se añadió SO₃ · piridina (68,7 g; 0,43 mol) en porciones durante 30 minutos mientras la temperatura se mantenía por debajo de 20 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a 10 °C y, a continuación, se diluyó con acetato de etilo (300 ml). La capa orgánica se lavó con HCl 0,5 N (2 x 50 ml), salmuera (150 ml) y, a continuación, se secó sobre MgSO₄ y se filtró. Los disolventes se eliminaron al vacío para dar un aceite marrón. El producto bruto se purificó mediante chromatografía ultrarrápida en gel de sílice (metilciclohexano-acetato de etilo: 9/1) para dar el compuesto del título, (1R, 2R, 5R)-(+)-2-hidroxi-3-pinanona, como aceite (19,2 g; 63% en dos etapas).
 CG: $tr = 10,9$ min;

- 45 Destilación: p. eb. = 100-104 °C (3-4 mmHg) (donde 1 mm Hg = 133,322 Pa))
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 0,90 (s, 3H); 1,30 (s, 3H); 1,40 (s, 3H); 1,70 (d, 1H, J = 12,0 Hz); 2,10 (m, 2H); 2,30 (s, 1H); 2,50 (m, 1H); 2,60 (s ancho, 2H).

Etapa 3: clorhidrato de D-eritro-esfingosina

50

Etapa 3.1: (1R, 2R, 5R)-etil-((2-hidroxipinan-3-ileno) amino) acetato

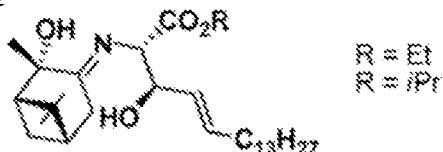
Se burbujeó NH_3 gaseoso a través de una suspensión de clorhidrato de etilglicinato (16,6 g; 0,13 mol) en tolueno (100 ml) durante 1 h. El cloruro de amonio formado se separó por filtración y se añadió (1R, 2R, 5R)-(+)-2-hidroxi-3-pinanova (Etapa 2.2) (10,0 g; 0,59 mol) a la solución de etilglicinato de base libre con unas gotas de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. A continuación, la mezcla de reacción se calentó a refluo durante 5 horas con un aparato Dean-Stark. Una vez completada la reacción, se evaporaron los disolventes. El producto resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice impregnado con Et_3N (5 % en éter) y el compuesto del título, (1R, 2R, 5R)-etil-(2-hidroxipinan-3-ilien)amino)acetato, , se eluyó con Et_2O .

10 $R_f = 0,35$ (ciclohexano - acetato de etilo: 1/1)

15 $^1\text{H RMN (CDCl}_3)$: 0,88 (s, 3H, CH_3); 1,30 (t, 3H, CH_3 , $J = 7,0$ Hz); 1,34 (s, 3H, CH_3); 1,53 (s, 3H, CH_3); 1,57 (d, 1H, $J = 10,0$ Hz); 2,07 (m, 2H); 2,36 (tdt, 1H, $J = 10,0$ Hz; $J = 6,0$ Hz; $J = 1,5$ Hz); 2,50 (d, 2H, $J = 1,5$ Hz; $J = 1,0$ Hz); 2,61 (s, 1H, OH); 4,17 (s, 2H, = $N\text{-CH}_2$); 4,23 (q, 2H, CH_2CH_3 , $J = 7,0$ Hz).

20 $^1\text{H RMN (CDCl}_3)$: 180,0 (éster cuat. C-1); 170,2 (amida cuat. C-1'); 76,5 (C-2' cuaternario); 60,9 (CH_2CH_3); 52,6 (C-2); 50,4 (C-3'); 38,6 (C quat); 38,3 (C-5); 33,7 (C-6); 28,2 (CH_3); 28,1 (C-4); 27,3 (CH_3); 22,8 (CH_3); 14,2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

25 Etapa 3.2 3-hidroxi-2-((E)-((1S, 2S, 5S)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo [3.1.1] heptan-3-iliden)amino)octadec-4-enoato de (2S, 3R, E)-etilo y 3-hidroxi-2-((E)-((1S, 2S, 5S)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo [3.1.1] heptan-3-iliden)amino)octadec-4-enoato de (2S, 3R, E)-isopropilo

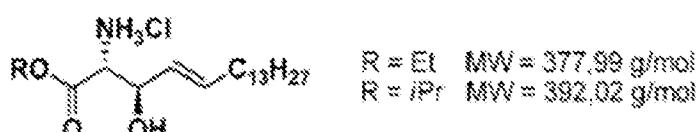


30 Una solución de triisopropoxido de clorotitanio (5,2 g; 0,02 mol) en cloruro de metileno (15 ml), una solución de 2-(E)-Hexadecen-1-al (4,35 g; 0,0018) en cloruro de metileno (8 ml) y trietilamina (6,1 ml; 0,044 mol) se añadieron a una solución de (1R, 2R, 5R)-etil-(2-hidroxipinan-3-ilien)amino)acetato (5,0 g; 0,020 mol) en cloruro de metileno (9,6 ml) bajo argón a 0 °C. Después de agitar la mezcla de reacción durante 4 h a 0 °C, a continuación se inactivó con salmuera (25 ml). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo y se secó sobre MgSO_4 ; los disolventes se eliminaron al vacío para dar lugar a un aceite de color amarillo anaranjado (9,7 g), mezcla de los ésteres isopropílico y etílico 73/27, 3-hidroxi-2-((E)-((1S, 2S, 5S)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo [3.1.1] heptan-3-iliden)amino)octadec-4-enoato de (2S, 3R, E)-Etilo y 3-hidroxi-2-((E)-((1S, 2S, 5S)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo [3.1.1] heptan-3-iliden)amino)octadec-4-enoato de (2S, 3R, E)-isopropilo.

35 $R_f = 0,7$ (ciclohexano - acetato de etilo: 1/1)

40 $^1\text{H RMN (CDCl}_3)$: 0,88 (t, 3H, $J = 6,5$ Hz); 1,50-1,10 (m, 28H, $(\text{CH}_2)_{12} + 2\text{CH}_3$); 1,50 (s, 3H, CH_3); 1,53 (d, 1H); 2,13 (q, 2H); 2,18-1,95 (m, 2H); 2,34 (tdt, 1H); 2,51 (m, 1H); 3,25 (s, 1H); 3,75 (s, 1H); 4,15 (d, 1H, $J = 6,7$ Hz); 4,20 (dt, 1H, $J = 7,0$ Hz; $J = 4,0$ Hz); 4,55 (t, 1H, $J = 6,7$ Hz); 5,05 (hept, 1H, $J = 6,3$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 5,55 (dd, 1H, $J = 15,4$ Hz; $J = 7,1$ Hz); 5,70 (dt, 1H, $J = 15,4$ Hz; $J = 6,5$ Hz).

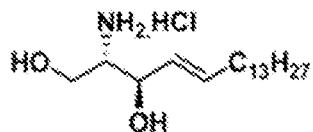
45 Etapa 3.3: 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2R, 3R, E)-etilo y 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2R, 3R, E)-isopropilo



50 Se añadió gota a gota HCl 1,2 M (203 ml) a la mezcla bruta de los ésteres isopropílico y etílico, 3-hidroxi-2-((E)-((1S, 2S, 5S)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo [3.1.1] heptan-3-iliden)amino)octadec-4-enoato de (2S, 3R, E)-Etilo y 3-hidroxi-2-((E)-((1S, 2S, 5S)-2-hidroxi-2,6,6-trimetilbicielo [3.1.1] heptan-3-iliden)amino)octadec-4-enoato de (2S, 3R, E)-isopropilo, de la etapa anterior (14,8 g; 0,030 mol) en tetrahidrofurano (51 ml). A continuación, la mezcla se agitó durante 72 h a temperatura ambiente. Se evaporó el tetrahidrofurano y, a continuación, se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo. La capa orgánica contenía, después de la eliminación de los disolventes, y (+)-2-hidroxi-3-pinanova (6,8 g). La capa acuosa se secó para dar lugar a 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2R, 3R, E)-etilo y 2-amino-3-hidroxioctadec-4-enoato de (2R, 3R, E)-isopropilo como sus sales de clorhidrato (5,7 g).

55 $R_f = 0,45$ ($\text{Et}_2\text{O-MeOH}$: 96/4)

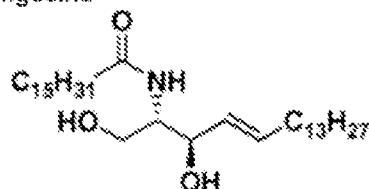
55 Etapa 3.4: clorhidrato de D-eritro-esfingosina



Se añadió borohidruro de sodio (4,40 g; 0,12 mol) a una suspensión del clorhidrato de aminoéster de la etapa anterior (2,2 g; 0,0058 moles) en 40 ml de una mezcla de disolventes de EtOH/H₂O (3/1). La mezcla se agitó durante 72 h a 0 °C antes de agregar una solución saturada de NH₄Cl (40 ml). La capa acuosa se extrajo con cloruro de metileno (4 x 100 ml), se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se filtró. Los disolventes se eliminaron al vacío para dar lugar al compuesto del título, clorhidrato de *D*-eritro-esfingosina, como un sólido blanco (1,5 g; 86%).

5 R_f = 0,3 (CHCl₃-MeOH-H₂O: 13/6/1)
10 ¹H RMN (CDCl₃) δ (ppm) 0,90 (t, 3H, J = 6,5 Hz); 1,50-1,20 (m, 22H, (CH₂)₁₂); 2,00 (q, 2H, J = 7,8 Hz); 3,15 (s, 1H, OH); 3,70 (m, 4H); 4,30 (s, 1H, OH); 5,40 (dd, 1H, J = 15,5 Hz; J = 6,3 Hz); 5,80 (dt, 1H, J = 15,5 Hz; J = 7,8 Hz); 8,46 (s ancho, 3H).

Etapa 4: *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingosina



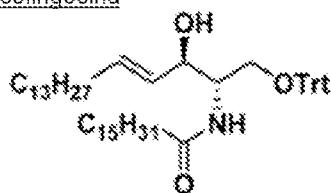
15 Se añadieron sucesivamente ácido palmítico (1,9 g; 0,074 mol) y una solución de *D*-eritro-esfingosina (2,2 g; 0,074 mol) en tetrahidrofurano (99 ml) a una suspensión de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-hexafluorofosfato de tetrametiluronio (3,1 g; 8,1 mmol) en dimetilformamida (15 ml). La suspensión blanca obtenida se enfrió a 0 °C y se añadió trietilamina (2,5 ml; 0,018 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h a temperatura ambiente. A continuación, se añadió una solución de ácido cítrico al 5 % (400 ml) y se filtró la suspensión. El sólido blanco se mezcló con agua (60 ml) a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con agua. A continuación, se secó al vacío a 40 °C para dar el compuesto del título, *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (3,5 g; 80%).

20 ¹H RMN (CDCl₃): 0,97 (6H, t); 1,10-1,40 (m, 46H); 1,62 (2H, m); 2,04 (2H, m, CH₂.CH); 2,21 (t, 2H, J = 8,2 Hz, CH₂CONH); 2,71 (m, 2H); 3,69 (m, 1H); 3,80-4,00 (m, 2H); 4,28 (m, 1H, CH(OH)CH); 5,52 (ddt, 1H, J = 15,4 Hz; J = 6,4 Hz; J = 1,0 Hz, CH(OH)CH); 5,77 (dtd, 1H, J = 15,4 Hz; J = 6,7 Hz; J = 1,1 Hz, CH₂CH); 6,22 (d, 1H, J = 6,8 Hz, NH).

25

30 **Etapa 5: *N*-Palmitoil-3-O-benzoyl-*D*-eritro-esfingosina**

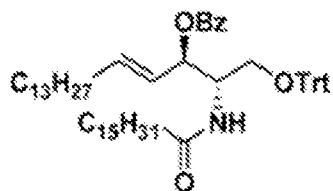
Etapa 5.1: *N*-Palmitoil-1-O-trityl-*D*-eritro-esfingosina



35 Se calentó una suspensión de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (0,58 g, 1,08 mmol), trietilamina (1,2 ml), 4-dimetilaminopiridina (5 mg) y cloruro de tritilo (0,45 g, 1,62 mmol) en cloruro de metileno (14 ml) a reflujo durante 60 h. Los materiales volátiles se evaporaron, el residuo se volvió a disolver en acetato de etilo y la mezcla se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico 1 M, NaHCO₃ ac. y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ y se evaporó. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice en heptano/acetato de etilo (7: 3) para producir *N*-palmitoil-1-O-trityl-*D*-eritro-esfingosina (0,39 g, 46 %) como un sólido ceroso.

40 R_f = 0,49 (CH₂Cl₂/acetato de etilo/Et₃N: 97/3/0,1)
45 ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,88 (6H, t), 1,40-1,15 (46H, m), 1,64 (2H, m), 1,91 (2H, m), 2,20 (2H, t, J = 8,2 Hz), 3,28 (1H, dd, J = 9,6 Hz, J = 4,0 Hz), 3,40-3,35 (2H, m), 4,04 (1H, m), 4,17 (1H, m), 5,24 (1H, dd, J = 15,4 Hz, J = 6,2 Hz), 5,62 (1H, dt, J = 15,4 Hz, J = 6,6 Hz), 6,06 (1H, d, J = 7,5 Hz, NH), 7,35-7,20 (9H, m), 7,35-7,45 (6H, m).

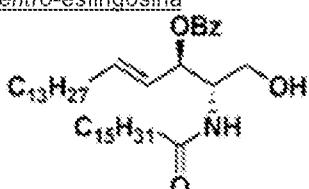
Etapa 5.2: *N*-Palmitoil-1-O-trityl-3-O-benzoyl-*D*-eritro-esfingosina



Se añadieron 4-dimetilaminopiridina (10 mg) y cloruro de benzoilo (0,1 ml, 0,85 mmol) a una solución de *N*-Palmitoil-1-O-trityl-*D*-eritro-esfingosina (0,39 g, 0,50 mmol) en piridina (5 ml) bajo nitrógeno y la mezcla se agitó durante 20 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se repartió entre NaHCO₃ ac. y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y se evaporó y el residuo se cromatógrafió en gel de sílice en heptano/acetato de etilo-hexano (85:15 a 1:1) para dar el compuesto del título, *N*-palmitoil-1-O-trityl-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (207 mg, 60%), como un sólido ceroso.

¹H RMN (CDCl₃) δ 0,88 (6H, t), 1,31-1,23 (46H, m), 1,56 (2H, m), 1,99 (2H, m), 2,08 (2H, t), 3,17 (1H, dd, J = 7,4 Hz, J = 3,9 Hz, CH(H')OH), 3,43 (1H, dd, J = 9,7 Hz, 3,9 Hz, CH(H')OH), 4,47 (1H, m, CH-(NHCOR)), 5,43 [1H, dd, J = 15,3 Hz, J = 7,3 Hz, CH(OCOPh)CH=], 5,75-5,60 [2H, m, NH, CH(OCOPh)], 5,86 (1H, dt, J = 15,3 Hz, J = 7,9 Hz, CH₂CH=), 7,25-7,10 (9H, m), 7,40-7,30 (8H, m), 7,54 (1H, t, J = 7,5 Hz), 7,92 (2H, d, J = 7,3 Hz).

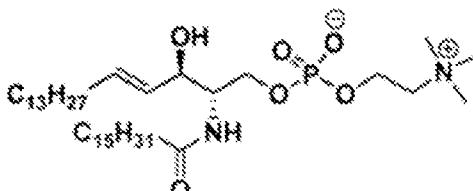
Etapa 5.3: *N*-Palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina



Se agitó una solución de *N*-palmitoil-1-O-trityl-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (1,10 g, 1,24 mmol) y monohidrato de ácido tolueno-p-sulfónico (0,23 g, 1,36 mmol) en cloruro de metileno (18 ml) y metanol (18 ml) bajo nitrógeno durante 3 h. El disolvente se evaporó y el residuo se repartió entre NaHCO₃ ac. y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se evaporó hasta sequedad. El residuo se cromatógrafió sobre gel de sílice y se eluyó con heptano/acetato de etilo (1:1) para dar el compuesto del título, *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (0,64 g; 80%).

¹H RMN (CDCl₃/CD₃OD) δ 0,87 (6H, t), 1,30-1,10 (46H, m), 1,54 (2H, m), 1,96 (2H, m), 2,14 (2H, m), 2,77 (2H, s ancho), 3,71 (2H, m, CH₂O), 4,24 (1H, m, CHN), 5,60-5,40 [2H, m, CH(OCOPh)CH=], 5,79 (1H, dt, J = 15,0 Hz, J = 6,8 Hz, CH₂CH=), 6,18 (1H, d, J = 9,6 Hz, NH), 7,38 (2H, dd, J = 7,6 Hz, J = 7,2 Hz), 7,52 (1H, dd, J = 7,6, J = 7,6 Hz), 7,96 (1H, d, J = 7,2 Hz).

Etapa 6: *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina



Se enfrió una solución de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (0,2 g, 0,31 mmol) y tetrametiletilendiamina (TMEDA) (51 µl, 0,53 mmol) en tolueno seco (5 ml) a aproximadamente 8 °C. A esta solución se le añadió gota a gota 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (82 mg, 0,57 mmol) en 0,1 ml de acetonitrilo. A continuación, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 4 h. Se añadió acetonitrilo (5 ml), seguido de trimetilamina anhidra. El matraz se calentó a 65-70 °C durante 14 horas. A continuación, el sistema se enfrió hasta temperatura ambiente y se abrió el matraz. Los disolventes se extrajeron a presión reducida.

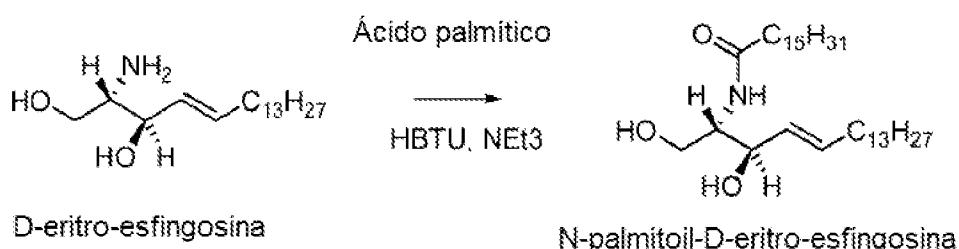
El producto resultante, *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina, se disolvió en metanol (1,5 ml). Se añadió metóxido de sodio (al 30% en metanol, 15 µl) a la solución. Despues de agitar durante la noche, se añadieron cloruro de metileno y agua. Se ajustó el pH y se evaporó la capa orgánica hasta sequedad. El material crudo se purificó mediante cromatografía en columna para dar el compuesto del título, *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina (66 mg, 30 % en 3 etapas).

¹H RMN (CDCl₃/CD₃OD) δ: 0,90 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 1,26 (m, 46H), 1,56 (m, (C=O)CH₂CH₂, 2H), 1,99 (m, CH=CHCH₂, 2H), 2,14 (t, (C=O)CH₂, 2H), 3,24 (s, N(CH₃)₃, 9H), 3,68 (m, POCH₂CH₂N, 2H), 3,91 (m, POCH₂CH, 2H), 4,04 (t, CHO, 4H, J = 7,7 Hz), 4,14 (m, CHN, 2H), 4,28 (m, POCH₂CH₂N, 2H), 5,44 (ddt, 15,4 Hz, J = 7,6 Hz, J = 1,5 Hz, 2H), 5,71 ddt, 15,4 Hz, J = 6,6 Hz, J = 0,5 Hz, 1H).

Ejemplo 2: Síntesis a escala de laboratorio de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina

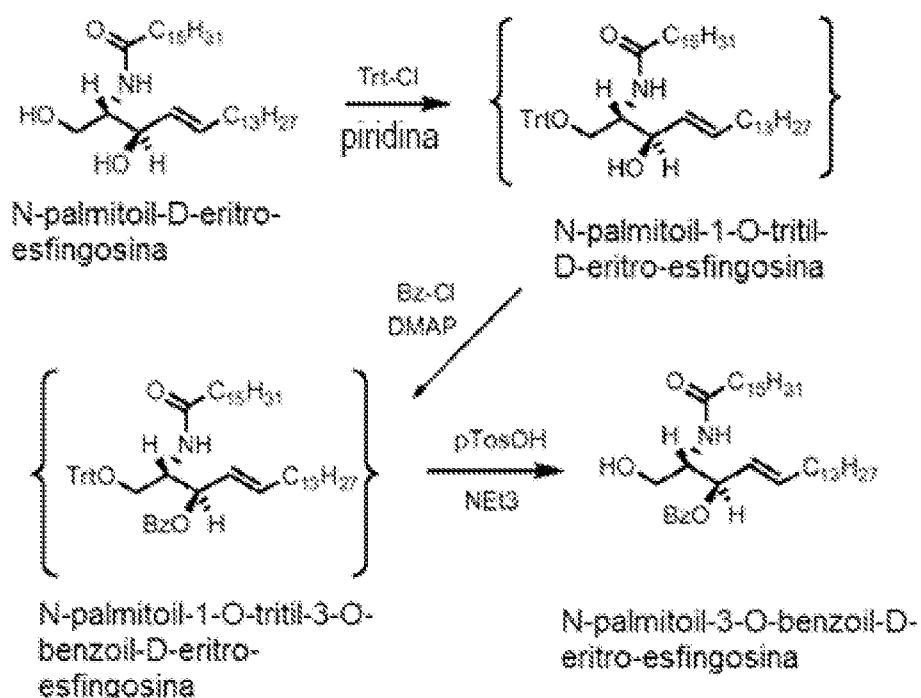
Etapa 1: N-palmitoil-D-eritro-esfingosina

5



10 Se añadieron ácido palmitíco (17,12 g, 66,8 mmol) y *D*-eritro-esfingosina (20 g, 66,8 mmol) en tetrahidrofurano (890 ml) a una suspensión de O-Benzotriazol-N, N, N',N'-tetrametiluronio-hexafluorofosfato (27,84 g, 73,4 mmol) en 140 ml de dimetilformamida. La suspensión blanca obtenida se enfrió a 0-5 °C, se añadieron 22,5 ml (160,7 mmol) de trietilamina en el transcurso de 30-60 min y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Después de este tiempo, el análisis de cromatografía en capa fina (CCF) indicó una conversión > 99% en *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina. Se añadió ácido cítrico al 5 % (400 ml), la mezcla se agitó durante 30 min a 0-5 °C y la suspensión obtenida se filtró. La torta blanca se suspendió en agua (600 ml) a temperatura ambiente. La suspensión se filtró y se lavó con agua. El secado durante 12 horas a presión reducida a 40 °C dio 32,4 g (rendimiento del 90 %) de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina. La pureza mediante HPLC fue del 98,1 % y mediante HPTLC del 99,2 %.
15 ¹H RMN (ppm δ, CDCl₃): 0,97 (6H, t), 1,1-1,4 (46H, m), 1,62 (2H, m), 2,04 (2H, m, CH₂CH), 2,21 (2H, t, J 8,2 Hz, CH₂CONH), 2,71 (2H, m), 3,69 (1H, m), 3,8-4,0 (2H, m), 4,28 (1H, m, CH(OH)CH), 5,52 (1H, ddt, J 15,4, 6,4, 1,0 Hz, CH(OH)CH)). 5,77 (1H, dtd, J 15,4, 6,7, 1,1 Hz, CH₂CH), 6,22 (1H, d, J 6,8 Hz, NH).

Etapa 2: *N*-Palmitoil-3-O-Benzoyl-D-eritro-esfingosina



25

Etapa 2.1 N-palmitoil-1-O-tritil-D-eritro-esfingosina

Una suspensión de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (16,30 g, 30,3 mmol), piridina (250 ml), y cloruro de tritilo (10,15 g, 36,4 mmol) en tolueno (150 ml) se calentó a 52 °C durante 12 h. El análisis de CCF después de las 12 horas indicó una conversión superior al 90 % en *N*-palmitoil-1-O-tritil-*D*-eritro-esfingosina, con aproximadamente un 5 % de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina sin reaccionar y aproximadamente un 2-5 % *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-tritil-*D*-eritro-esfingosina. La suspensión se enfrió a 0-5 °C y se filtró para eliminar algunas sales.

5 Etapa 2.2: *N*-Palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina

10 Se añadió 4-dimetilaminopiridina (560 mg, 4,54 mmol) y cloruro de benzoilo (5,8 ml, 50 mmol) a una solución de los productos de reacción en bruto de la etapa anterior y la mezcla se agitó a 0-5 °C durante 15 h. Después de 15 horas, el análisis de CCF indicó una conversión superior al 97% en *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina. La mezcla de reacción se repartió entre agua (130 ml) y acetato de etilo (530 ml). La fase orgánica se lavó 4 veces con agua (160 ml) para alcanzar pH 7. La fase orgánica se evaporó a presión reducida y el residuo amarillo aceitoso resultante (34 g) se disolvió en cloruro de metileno (300 ml) y metanol (300 ml) a 5 °C y se utilizó directamente para la siguiente etapa de destilación.

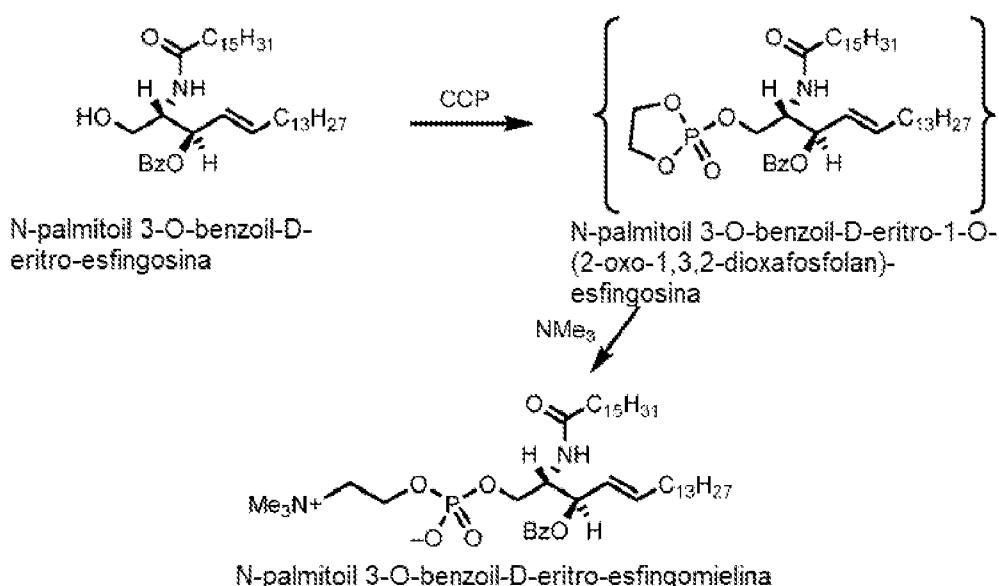
15 Etapa 2.3: *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina

20 Se añadió ácido tolueno-p-sulfónico monohidratado (2,88 g, 15,15 mmol) a la solución anterior de *N*-palmitoil-1-O-tritil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina en cloruro de metileno/metanol. La mezcla se agitó a 18-22 °C durante 3 h. Después de 3 horas, el análisis de CCF indicó una conversión superior al 97 % en *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina. La mezcla de reacción se neutralizó a 0-5 °C con 2,58 ml de trietilamina y el cloruro de metileno se evaporó (40 °C/340 mbar). El residuo obtenido se agitó a 0-5 °C durante 1 h. La suspensión se separó por filtración, se lavó con metanol y se secó a 35 °C durante 12 h, dando 21,9 g (113%) de producto bruto (*N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina).

25 La recristalización se realizó con metanol (500 ml) y cloruro de metileno (5 ml) a 42 °C, la solución se agitó a 20-22 °C durante 1 hora y, a continuación, se enfrió a 0-5 °C durante 1 hora. Después de la filtración, la torta resultante se lavó con metanol (2 x 50 ml) y se secó durante 12 h a 35 °C a presión reducida produciendo 13,6 g de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina contaminada con 13 % de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina desprotegida. El material cristalizado se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna en 185 g de gel de sílice. Se eluyó con 2,2 litros de hexano/acetato de etilo 5/1, 2,2 litros de hexano/acetato de etilo 3/1 y finalmente 4,4 litros de hexano/acetato de etilo 2/1. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron hasta sequedad a 40 °C dando como resultado 12,1 g (rendimiento del 62%) de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina. La pureza mediante HPLC fue del 97,7 % y mediante HPTLC del 99.

30 ^1H RMN (ppm δ , CDCl_3): 0,87 (6H, t), 1,1-1,3 (46H, m), 1,54 (2H, m), 1,96 (2H, m), 2,14 (2H, m), 2,77 (2H, s ancho), 3,71 (2H, m, CH_2O), 4,24 (1H, m, CHN), 5,4-5,6 (2H, m, $\text{CH}(\text{OCOPh})\text{CH}=\text{}$), 5,79 (1H, dt, J 15,0, 6,8 Hz, $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$), 6,18 (1H, d, J 9,6 Hz, NH), 7,38 (2H, dd, J 7,6, 7,2 Hz), 7,52 (1H, dd, J 7,6, 7,6 Hz), 7,96 (1H, d, J 7,2 Hz).

35 40 Etapa 3: *N*-Palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina



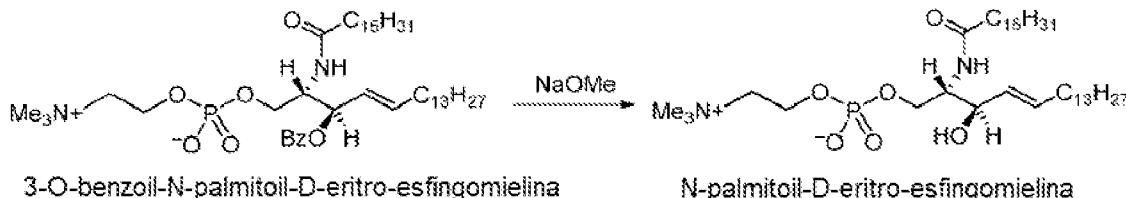
Etapa 3.1: *N*-Palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-esfingosina

Se disolvió casi completamente *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina (9,49 g, 14,8 mmol) en tolueno (200 ml) y se cargó en un reactor a presión. Se añadió tetrametiletilendiamina (2,4 ml, 15,8 mmol) a la mezcla. La mezcla se enfrió a 7 °C seguido de la adición de una solución de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) (3,90 g, 27,3 mmol) en acetonitrilo (5 ml). Despues de dos horas a 7 °C, la reacción se calentó a 21 °C durante dos horas. El análisis de CCF indicó una conversión superior al 97 % de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina al intermedio *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-esfingosina.

Etapa 3.2: *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina

Se introdujo acetonitrilo (200 ml) en el reactor seguido de trimetilamina gaseosa hasta que se alcanzó una presión constante de 0,6 - 0,7 bar. Durante el calentamiento a 67 °C, la presión se elevó a 1,8 - 2,0 bar. Despues de 14 horas, el análisis de CCF indicó una reacción casi completa del intermedio *N*-Palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-esfingosina. Despues de enfriar a -5 °C, se filtró la suspensión. La 3-O-benzoil-*N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina bruta se secó a 35 °C, produciendo 9,1 g (76%). El material bruto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre 90 g de gel de sílice. Se eluyó con 1,1 litros de cloruro de metileno/metanol 6/1; 1,1 litros de cloruro de metileno/metanol 4/1; y finalmente 4,3 litros de cloruro de metileno/metanol 3/1. Las fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporaron hasta sequedad a 35 °C dando como resultado 8,0 g (rendimiento del 88 %) de 3-O-Benzilo-*N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina. La pureza por HPLC fue del 94,8 %.

Etapa 4: *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina



Se disolvió 3-O-benzoil-*N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina (8,0 g, 9,9 mmol) en metanol (40 ml). Se añadió metóxido de sodio (al 30 % en metanol, 5,4 M, 367 µl, 2,0 mmol) a la solución para dar como resultado un pH de 11. Despues de agitar durante la noche, el análisis por CCF indicó una reacción casi completa del éster de benzolio. Se añadió cloruro de metileno (80 ml) seguido de 38 ml de agua y el pH se ajustó a 6-7 con 1,8 ml de ácido clorhídrico 1M. La capa inferior se evaporó hasta sequedad a 35 °C y el residuo se recogió en 8,5 ml de metanol y 8,5 ml de cloruro de metileno. Se añadió acetona (95 ml) a la solución transparente. La suspensión se agitó a 0 °C durante algunas horas y se filtró. El residuo resultante se secó a 30 °C, dando 4,3 g del producto del título, *N*-Palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina, (62%). La pureza por HPLC fue del 98,9%.

¹H RMN (δ ppm, CDCl₃/CD₃OD): 0,88 (6H, t, 2 x CH₃), 1,25 (46H, m, 23 x CH₂), 1,56 (2H, m, (C=O)CH₂CH₂), 1,99 (2H, m, CH=CHCH₂), 2,14 (2H, t, (C=O)CH₂), 3,24 (9H, s ancho, N(CH₃)₃), 3,68 (2H, m, POCH₂CH₂N), 3,91 (2H, m, POCH₂CH), 4,04 (1H, t, CHO, J 7,7 Hz), 4,14 (1H, m, CHN), 4,28 (2H, m, POCH₂CH₂N), 5,42-5,46 (2H, dd, CHCH=CHCH₂, J 15,3, 7,4 Hz), 5,65-5,70 (1H, dt, CHCH=CHCH₂, J 14,6, 7,2 Hz)

Ejemplo 3: Síntesis a escala piloto de palmitoil esfingomielina

Etapa 1: Boc-L-Ser-OMe

Se suspendieron 32,2 kg L-Ser-OMe • HCl (206,97 mol) en 288 kg de acetato de etilo en un recipiente de 630 litros y se enfrió a 2 °C. Se añadió trietilamina líquida a aproximadamente 2 °C (24,1 kg, 238,17 mol, 1,15 eq.) seguido de una solución de Boc₂O (51,9 kg, 237,80 mol, 1,15 eq.) en 24 kg de acetato de etilo. La mezcla de reacción se calentó a 22 °C y se agitó durante la noche. El análisis de CCF mostró un contenido de L-Ser-OMe • HCl de menos del 1 %. Se añadieron 114 litros de agua purificada y se separaron las fases. El lavado se repitió dos veces con 114 litros de agua purificada. Las tres fases acuosas se combinaron y extrajeron con 102 kg de acetato de etilo. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en la fase acuosa. Las dos fases orgánicas se combinaron y se evaporaron hasta sequedad a 60 °C. Se añadieron 88 kg de tolueno al residuo y se destiló a 60 °C. Este procedimiento se repitió. La pureza del Boc-L-Ser-OMe crudo fue del 95-97 % mediante análisis de CCF.

Etapa 2: Éster metílico del ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidinocarboxílico

Se disolvió Boc-L-Ser-OMe crudo (aproximadamente 45,4 kg, 206,97 mol) en 256 kg de tetrahidrofurano a 22 °C en un recipiente de 630 litros. Se añadieron 71,8 kg de 2,2-dimetoxipropano (689,39 mol, 3,33 eq.) seguido de una solución de 3,3 kg de ácido bencenosulfónico (20,86 mol, 0,10 eq.) en 20 kg de tetrahidrofurano y se lavó con 20 kg de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se calentó a reflujo, se separaron por destilación 210 litros de

tetrahidrofurano en tres horas. El análisis de CCF mostró un contenido de Boc-L-Ser-OMe del 1-2%. La neutralización a pH 6,5 se realizó con 1,0 kg de trietilamina (9,88 mol, 0,05 eq) a 22°C. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad a 60 °C, seguido de la adición de 82 kg de hexano y 26 litros de agua purificada a 25 °C. La fase orgánica se lavó con 45 litros de agua purificada. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en las fases acuosas. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad a 60 °C. Se añadió tolueno (88 kg) al residuo y se destiló a 60 °C dos veces. El producto, éster metílico del ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico, (48,89 kg, 188,55 mol, 91% de rendimiento de L-Ser-OMe + HCl), se aisló como un líquido amarillo. Se encontró que la pureza fue del 97% mediante análisis de CCF. La pérdida por secado fue del 4,2 % y el contenido de agua del 0,1 %. La identidad fue confirmada por MS y 1H RMS.

10 Etapa 3: (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etil)-2,2-dimetiloxazolidina

Se acondicionó un recipiente de 100 litros con 15 kg de tetrahidrofurano y se secó al vacío a 50 °C. Se introdujo metilfosfonato de dimetilo (4,6 kg, 37,07 mol, 2,00 eq) en el recipiente y se disolvió en 29 kg de tetrahidrofurano. La mezcla se enfrió a -75 °C y se añadieron 9,4 kg de una solución de n-butil litio al 25 % en heptano (2,34 kg de n-butil litio, 36,58 mol, 1,98 eq) durante dos horas mientras la mezcla se mantenía de -70 °C a -75 °C, seguido de lavado con 5 litros de heptano. Despues de agitar durante una hora, se añadió una solución de 4,8 kg de éster metílico del ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico bruto (18,51 mol) en 4 kg de tetrahidrofurano durante una hora mientras se agitaba durante una hora. La mezcla se mantuvo de -70 a -75 °C, seguido de lavado con 5 litros de tetrahidrofurano. La mezcla de reacción se calentó a 0 °C durante 40 minutos y se agitó durante 30 minutos.

El análisis por CCF mostró un contenido de éster metílico del ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-2,2-dimetil-4-oxazolidincarboxílico del 10-15 %. El enfriamiento se realizó con una solución de 600 ml de agua purificada en 4,8 kg de tetrahidrofurano por debajo de 20 °C. El pH se ajustó a 6-7 con 13 litros de una solución de ácido cítrico monohidratado al 20 % en agua purificada por debajo de 20 °C. Despues de la adición de 10 litros de acetato de etilo, se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con 13 kg de acetato de etilo. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en la fase acuosa. Las dos fases orgánicas se combinaron y se evaporaron hasta un volumen de 20 litros a 60 °C. El secado final en un evaporador rotatorio a 40 °C produjo 7,2 kg (20,49 mol, 111 %) del compuesto del título, (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etil)-2,2-dimetiloxazolidina, como un aceite amarillo. La pureza fue aproximadamente del 70 % por análisis de CCF. La pérdida por desecación fue del 14,4 % y el contenido de agua del 1,4 %. La identidad fue confirmada por MS.

Etapa 4: (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina

35 Se añaden (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(2-(dimetoxifosforil)-1-oxo-etil)-2,2-dimetiloxazolidina (21,6 kg, 61,48 mol) y 17,0 kg de carbonato de potasio (123,0 mol, 2,00 eq.) a 239 kg de acetonitrilo a 22 °C en un recipiente de 250 litros, mientras se agita. Se añadieron 1-tetradecanal (6,53 kg, 30,75 mol, 0,50 eq) y 3,1 litros de agua purificada para dar un pH de 9,0. Despues de dejar que la reacción prosiguiera durante la noche, el análisis de CCF mostró un contenido de 1-tetradecanal del 5 al 10 % y de fosfonato del 2 %. Las sales se filtraron y se lavaron con 270 litros de hexano en porciones. Las fases orgánicas combinadas se evaporaron hasta sequedad a 60 °C. El residuo se disolvió en 48 kg de hexano y se lavó dos veces con una solución de 0,9 kg de cloruro de sodio en 18 litros de agua purificada. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en las fases acuosas. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad a 60 °C y se disolvió en 75 kg de hexano. El secado final en un evaporador rotatorio a 40 °C produjo 16,9 kg (38,61 mol, 63 % basado en fosfonato) del compuesto del título, (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina, como un aceite marrón. La pureza fue aproximadamente del 50-86 % mediante CCF dependiendo del procedimiento de detección y 81 % por análisis de HPLC. La pérdida por secado fue del 2,2 % y el contenido de agua del 0,05 %. La identidad fue confirmada por MS.

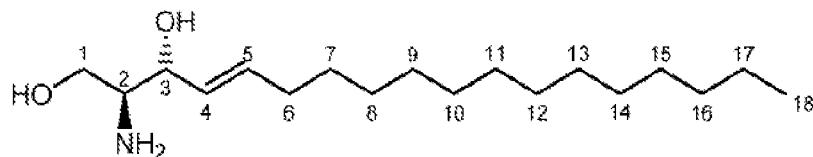
Etapa 5: (2S, 3R, 4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina

50 Se agitaron (S)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-oxo-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina en bruto (16,9 kg, 38,61 mol) y 15,8 kg de cloruro de cerio heptahidratado (42,49 mol, 1,10 eq.) en 305 kg de metanol en un recipiente de 1000 litros y se enfriaron a -18 °C. Se enfrió una solución de 2,19 kg de borohidruro de sodio (57,89 mol, 1,50 eq.) y 58 g de sosa cáustica al 30% (0,44 mol) en 8,8 litros de agua purificada (que da como resultado sosa cáustica al 0,2 %) se enfrió a 0 °C y, a continuación, se añadió a la cetona durante cinco horas. Despues de 30 minutos adicionales de agitación, el análisis de CCF mostró un contenido de cetona de menos del 1 %. El exceso de borohidruro de sodio se desactivó calentando la mezcla de reacción a 22 °C durante dos horas, seguido de agitación durante una hora. Se destiló metanol (320 litros) a 60 °C. Las sales precipitadas se filtraron y lavaron con 44 kg de tolueno en dos porciones. El filtrado se separó en dos fases y la fase acuosa se extrajo dos veces con 33 kg de tolueno. El análisis de CCF indicó la ausencia de producto en la fase acuosa y el residuo del filtro. Las fases orgánicas combinadas se diluyeron con 77 litros de acetato de etilo y se lavaron con una mezcla de 39 litros de agua purificada, 3,9 kg de EDTA y 1,9 litros de sosa cáustica al 30 %, seguido de 1,9 kg de cloruro de sodio en 39 litros de agua purificada. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en las fases acuosas. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad a 60 °C y se disolvió en 18 kg de tolueno. El secado final en un evaporador rotatorio a 60 °C produjo 15,95 kg (36,28 mol, 94 %) del compuesto del título, (2S, 3R, 4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina, como un aceite amarillo. La pureza fue aproximadamente del 70-90 % mediante CCF dependiendo del procedimiento de detección y

del 90 % mediante análisis de HPLC. La pérdida por secado fue del 5,2 % y el contenido de agua del 0,05 %. La identidad fue confirmada por MS.

Etapa 6: D-eritro-esfingosina

5



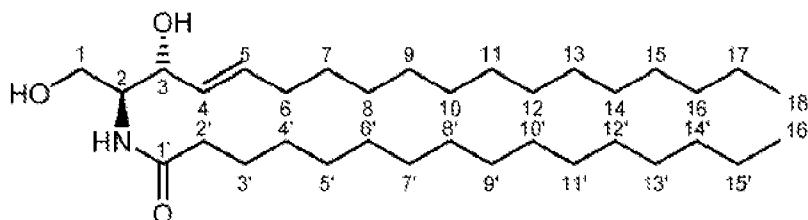
D-eritro-esfingosina

En un recipiente de 60 litros se enfriaron 24 kg de metanol a 0 °C. En el transcurso de 30 minutos se introdujeron 5,69 kg de cloruro de acetilo (72,48 mol, 2,00 eq.). A esto le siguió el calentamiento a 22 °C para producir una solución de

10 clorhidrato metanólico. Se disolvió (2S, 3R, 4E)-3-(terc-butoxicarbonil)-4-(1-hidroxi-hexadec-2-enil)-2,2-dimetiloxazolidina bruta (15,95 kg, 36,28 mol) en 31 kg de metanol en un recipiente de 160 litros a 22 °C. La solución de clorhidrato metanólico se añadió durante 30 minutos. Después de siete horas, el análisis de CCF mostró menos del 1 % del material de partida. La reacción se neutralizó con una solución de 7,34 kg de trietilamina (72,54 mol, 2,00 eq.) en 10 kg de metanol. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad a 60 °C y se disolvió en 105 kg de cloruro de metileno, 31 kg de 2-propanol y 40 litros de agua purificada. Después de la separación de fases, la fase orgánica se lavó con 40 litros de agua purificada y posteriormente con 40 litros de agua desmineralizada y 7 kg de 2-propanol. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en las dos primeras fases acuosas, pero producto en la tercera fase acuosa. El producto se extrajo con 40 litros de cloruro de metileno. Las fases orgánicas combinadas se evaporaron hasta sequedad a 60 °C. El residuo se suspendió en 33 kg de acetato de etilo y de nuevo se evaporó a sequedad. La cristalización se realizó a partir de una mezcla de 36 litros de acetato de etilo y 7,2 litros de hexano a -20 °C. El sólido resultante se filtró y se lavó en porciones con una mezcla de 7,2 litros de acetato de etilo y 1,4 litros de hexano seguido de 7,2 litros de acetato de etilo puro. Después de secar a 30 °C, los 6,45 kg resultantes se recristalizaron en una mezcla de 24 litros de acetato de etilo y 8 litros de hexano a -20 °C. El sólido se filtró y se lavó en porciones con una mezcla de 4,8 litros de acetato de etilo y 1,6 litros de hexano, seguido de 6,4 litros de acetato de etilo puro. Después de secar a 30 °C, los 5,90 kg resultantes se recristalizaron de nuevo en una mezcla de 16 litros de acetato de etilo y 16 litros de hexano a -20 °C. El sólido se filtró y se lavó en porciones con una mezcla de 3,2 litros de acetato de etilo y 3,2 litros de hexano, seguido de 6,4 litros de acetato de etilo puro. El secado final a 30 °C produjo 5,60 kg (18,71 mol, 52 %) del compuesto del título, *D*-eritro-esfingosina, como un sólido marrón. La pureza fue del 89,2 % por HPLC y del 95,6 % por análisis de HPLC con L-treo-esfingosina al 0,61%. La pérdida por secado fue del 0,4 % y el contenido de agua del 0,6 %. La identidad fue confirmada por MS y 1H RMN.

¹H RMN (600 MHz, ppm δ, CDCl₃), posición: 0,88 (3H, t) 18, 1,2 a 1,3 (20H, m) 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17; 1,37 (2H, m) 7; 2,04 (2H, m, CH₂CH) 6; 3,17 (1H, m, CHNH₂) 2; 3,77 (2H, m, CH₂OH) 1; 4,34 (1H, m, CH(OH)CH) 3; 5,46 (1H, dd, J 15,4, 6,4, 1,0 Hz, CH(OH)CH)) 4; 5,79 (1H, dtd, J 15,4, 6,7, 1,1 Hz, CH₂CH) 5.

35 Etapa 7: N-Palmitoil-D-eritro-esfingosina



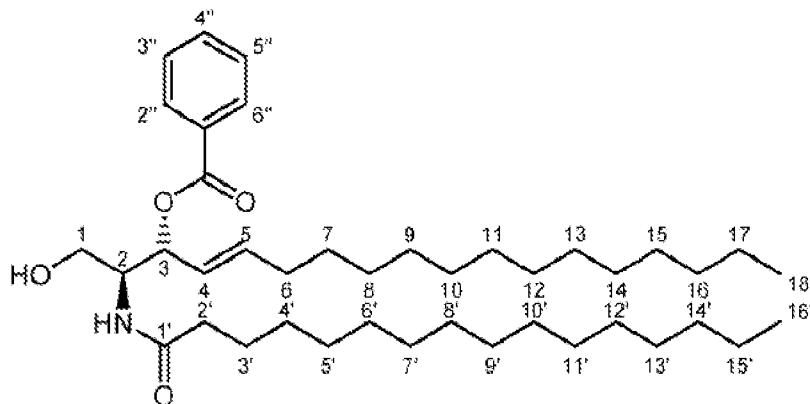
N-palmitoyl-D-eritro-esphingosina

Se suspendieron 5,50 kg de *D*-eritro-esfingosina (18,36 mol), 4,71 kg de ácido palmitico (18,37 mol, 1,00 eq.) y 7,66 kg de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio-hexafluorofosfato (20,20 mol, 1,10 eq.) en 36 kg de dimetilformamida y 118 kg de tetrahidrofurano en un recipiente de 250 litros y se enfrió a 2 °C. Se añadió trietilamina (5,06 kg, 50,00 mol, 2,72 eq.) en 5 litros de tetrahidrofurano dando como resultado un pH de 9,0. Despues de 90 minutos, el análisis por CCF mostró un contenido de *D*-eritro-esfingosina de menos del 1 % y un contenido de ácido palmitico de menos del 1,5 %. La mezcla de reacción se calentó a 22 °C. El producto se precipitó mediante la adición de una solución de

4,7 kg de ácido cítrico en 89 kg de agua purificada. Después de una hora a 22 °C, se filtró la mezcla de reacción. El producto crudo se suspendió en 154 litros de agua purificada durante una hora a 22 °C. La filtración fue seguida por lavado con tres veces 28 litros de agua purificada y tres veces 28 litros de acetona. Se repitió la suspensión en 122 kg de acetona, lavando tres veces con 28 litros de acetona. El secado final a 35 °C produjo 6,08 kg (11,31 mol, 62%) del compuesto del título, *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina, como un sólido ligeramente amarillo. La pureza fue del 96,2% por HPTLC y del 99,2% por análisis de HPLC. La pérdida por secado fue del 0,2% y el contenido de agua del 0,3%. La identidad fue confirmada por MS y 1H RMN.

5 ¹H RMN (600 MHz, ppm δ, CDCl₃): 0,88 (6H, t) 18, 16'; 1,2-1,4 (44H, m) 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13', 14', 15'; 1,37 (2 H, m) 7; 1,64 (2 H, m) 3'; 2,04 (2 H, m, CH₂CH) 6; 2,23 (2H, t, CH₂CO) 2'; 10 3,71 (1H, dd, CHNH₂) 2; 3,93 (2H, m, CH₂OH) 1; 4,31 (1 H, m, CH(OH)CH) 3; 5,53 (1H, ddt, J 15,4, 6,4, 1,0 Hz, CH(OH)CH) 4; 5,79 (1H, dtd, J 15,4, 6,7, 1,1 Hz, CH₂CH) 5; 6,25 (1H, d) NH.

Etapa 8: *N*-Palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina



N-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina

15 Para la primera protección, 6,08 kg de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina (11,31 mol) se suspendieron en 11,91 kg de piridina y 2,5 kg de cloruro de metileno en un recipiente de 60 litros. Se añadió una solución de cloruro de trítilo (3,31 kg, 11,87 mol, 1,05 eq.) en 9,5 kg de cloruro de metileno seguido de 2,5 kg de cloruro de metileno. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 56 horas. El análisis de CCF mostró un contenido de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingosina del 3-5 %.

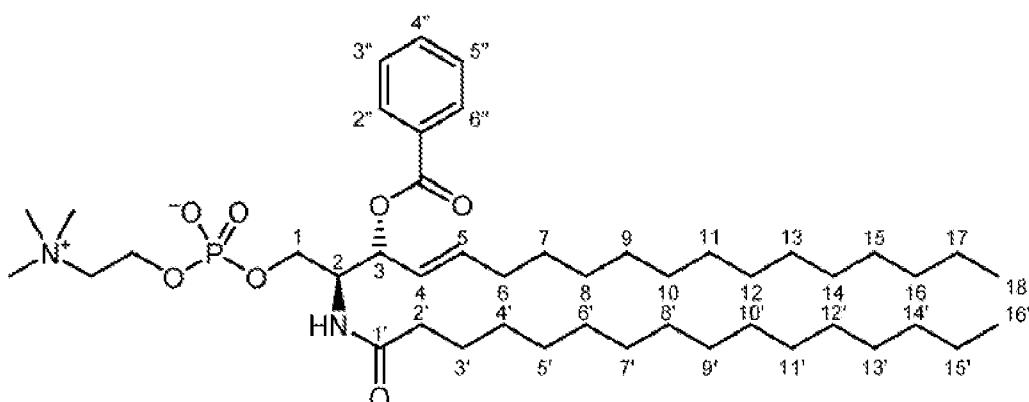
20 Para la segunda etapa, la mezcla de reacción se enfrió a 2 °C. Se añadieron a la mezcla *N*, *N*-dimetilaminopiridina (0,139 kg, 1,14 mol, 0,10 eq.) y 2,38 kg de cloruro de benzoilo (16,93 mol, 1,50 eq.), seguido de 5 kg de cloruro de metileno. Después de 90 minutos a 2 °C, el análisis de CCF mostró un contenido de intermedio *N*-palmitoil-1-O-trítil *D*-eritro-esfingosina de menos del 1 %. El tratamiento final se realizó con 55 kg de acetato de etilo y una solución de 1,7 kg de ácido cítrico y 3,0 kg de cloruro de sodio en 33 litros de agua purificada. La fase orgánica se lavó de nuevo con una solución de 1,7 kg de ácido cítrico y 3,0 kg de cloruro de sodio en 33 litros de agua purificada y dos veces con una solución de 3,5 kg de cloruro de sodio en 30 litros de agua purificada. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en las fases acuosas. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad a 50 °C. El residuo que contenía el producto, *N*-palmitoil-1-O-trítil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina, se disolvió en 27 kg de tolueno y posteriormente se evaporó hasta sequedad a 50 °C. Este procedimiento se repitió dos veces.

25 Para la tercera etapa, el residuo de la reacción anterior se disolvió en 67 kg de metanol y 161 kg de cloruro de metileno y se enfrió a 2 °C. El pH se ajustó a 2,5 con una solución de ácido para-toluenosulfónico monohidratado (6,41 mol, 0,57 eq.) en 23 kg de metanol. Después de calentar a 22°C y agitar durante 14 horas, el análisis de CCF mostró un contenido de intermedio *N*-palmitoil-1-O-trítil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina de menos del 1 %. La adición de 969 g de trietilamina (9,58 mol, 0,85 eq.) elevó el pH a 7,0. La mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad a 50 °C. Se suspendió *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina en bruto en 69 kg de hexano a 40 °C y se enfrió hasta 0 °C. Después de 40 minutos, el sólido se aisló por filtración y se lavó con 20 kg de hexano. El secado a 35 °C produjo 5,40 kg que se disolvieron en 38 kg de cloruro de metileno. Esta solución se purificó mediante chromatografía en 76 kg de gel de sílice que se acondicionó con una mezcla de 175 kg de hexano y 49 kg de acetato de etilo. Se realizó la elución con 12 kg de cloruro de metileno, una mezcla de 502 kg de hexano y 137 kg de acetato de etilo y una mezcla de 482 kg de hexano y 647 kg de acetato de etilo. Las fracciones recogidas no contenían producto. El producto se eluyó con una mezcla de 451 kg de hexano y 205 kg de acetato de etilo y una mezcla de 802 kg de hexano y 547 kg de acetato de etilo. Los disolventes se extrajeron por destilación a 50 °C. El residuo resultante se suspendió en 24 litros de hexano a 40 °C y se enfrió a 0 °C. Después de 45 minutos, el producto del título, *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-

eritro-esfingosina, se aisló como un sólido por filtración y se lavó con 4,8 litros de hexano en porciones. El secado a 35 °C produjo 3,15 kg (4,91 mol, 43%) del compuesto del título como un sólido blanco. La pureza fue del 100,0 % mediante HPTLC y del 96,3% mediante análisis de HPLC. La pérdida por secado fue del 0,05 % y el contenido de agua del 0,2 %. La identidad fue confirmada por MS y 1H RMN.

5 ¹H RMN (600 MHz, ppm δ, CDCl₃): 0,88 (6H, t) 18, 16'; 1,2-1,4 (44H, m) 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13', 14', 15'; 1,35 (2H, m) 7; 1,61 (2H, m) 3'; 2,05 (2H, m, CH₂CH) 6; 2,19 (2H, m, CH₂CO) 2'; 3,71 (2H, m, CH₂OH) 1; 4,27 (1H, m, CHNH) 2; 5,54 (1H, t, CH (OCOPh)CH) 3; 5,62 (1H, ddt, J 15,4, 6,4, 1,0 Hz, CH(OCOPh)CH) 4; 5,85 (1H, dtd, J 15,4, 6,7, 1,1 Hz, CH₂CH) 5; 6,05 (1H, d) NH; 7,46 (2H, dd, J 7,6, 7,2 Hz) 3", 5"; 7,59 (1H, dd, J 7,6, 7,6 Hz) 4"; 8,04 (2H, d, J 7,2 Hz) 2", 6".

10 **Etapa 9: N-Palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina**

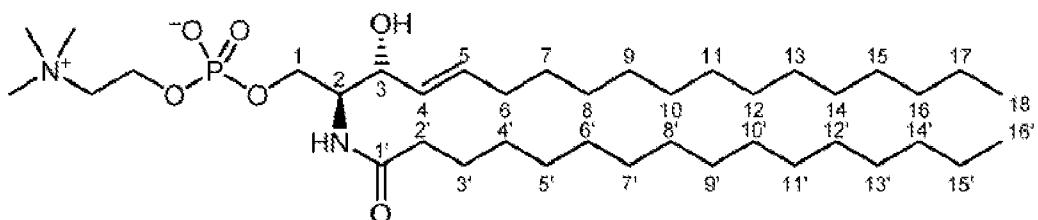


N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina

30 Se disolvieron 1,60 kg de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (2,50 mol) y 0,20 kg de tetrametiletilendiamina (TMEDA) (1,73 mol, 0,69 eq.) en 38 litros de tolueno en un recipiente de 100 litros a 35 °C. Después de enfriar a 6 °C, se añadió una solución de 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano (CCP) (0,47 kg, 3,30 mol, 1,32 eq.) en 1 litro de acetonitrilo durante 15 minutos, seguido de 3 litros de acetonitrilo. La mezcla de reacción se calentó a 22 °C. Se continuó agitando durante dos horas. El análisis por CCF mostró un contenido de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina de menos del 0,5 %. Después de la adición de 32 litros de acetonitrilo, la temperatura se redujo a -10 °C. Se enfrió trimetilamina gaseosa por debajo de su punto de ebullición y se introdujo la trimetilamina líquida resultante (7,42 kg, 126,53 mol, 50,21 eq.). La siguiente etapa de reacción se inició calentando a 65 °C durante 15 horas. El análisis por CCF mostró un contenido de anillo intermedio de menos del 0,5 %. El producto se cristalizó enfriando a -30 °C y se aisló por filtración con lavado posterior con 13 litros de acetonitrilo. Secando a 35 °C se obtuvieron 1,85 kg de un sólido blanquecino. La reacción se repitió con 1,58 kg de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina (2,45 moles) produciendo otros 1,82 kg de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina en bruto. Ambos materiales en bruto se combinaron y disolvieron en 29 litros de cloruro de metileno y 14,5 litros de metanol. Esta solución se purificó mediante cromatografía en 72 kg de gel de sílice que se acondicionó con una mezcla de 337 kg de cloruro de metileno y 33 kg de metanol. Se realizó una elución con una mezcla de 966 kg de cloruro de metileno y 95 kg de metanol, una mezcla de 1866 kg de cloruro de metileno y 223 kg de metanol, una mezcla de 328 kg de cloruro de metileno y 82 kg de metanol, una mezcla de 1345 kg de cloruro de metileno y 268 kg de metanol, una mezcla de 530 kg de cloruro de metileno y 158 kg de metanol y una mezcla de 371 kg de cloruro de metileno y 221 kg de metanol. El volumen de las fracciones recogidas fue de 140 litros. Los disolventes de las fracciones 17-38 se destilaron a 50 °C. El secado final en un evaporador rotatorio a 40 °C produjo 3,36 kg (2,92 kg en base seca, 3,61 mol, 73 %) del compuesto del título, *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina, como un sólido ligeramente amarillo. La pureza fue del 99,5% por HPTLC y del 98,7% mediante análisis de HPLC. La pérdida por secado fue del 11,5 % y el contenido de agua del 1,7 %. La identidad fue confirmada por MS y 1H RMN.

55 ¹H RMN (600 MHz, ppm δ, CDCl₃): 0,88 (6H, t) 18, 16'; 1,2 a 1,3 (46H, m) 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13', 14', 15'; 1,56 (2H, m) 3'; 1,99 (2H, m, CH₂CH) 6; 2,16 (2H, m, CH₂CO) 2'; 3,21 (9H, s, N(CH₃)₃, N(CH₃)₃; 3,65 (2H, m, POCH₂CH₂N(CH₃)₃) CH₂N; 3,97 (2H, m, CH₂OP) 1; 4,21 (2H, s ancho, POCH₂CH₂N(CH₃)₃) POCH₂; 4,45 (1H, m, CHNH) 2; 5,50 (1H, m, CH(OCOPh)CH) 3; 5,54 (1H, m, CH(OCOPh)CH) 4; 5,82 (1H, dt, CH₂CH) 5; 7,39 (1H, d) NH; 7,43 (2H, t, J 7,2 Hz) 3", 5"; 7,55 (1H, t, J 7,2 Hz) 4"; 7,99 (2H, d, J 7,2 Hz) 2", 6".

60 **Etapa 10: N-Palmitoil-D-eritro-esfingomielina**



N-palmitoil-D-eritro-esfingomielina

5 Se disolvieron 3,36 kg de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina (2,92 kg en base seca, 3,61 mol) en 10 litros de metanol en un evaporador rotatorio a 22 °C y se transfirieron a un recipiente de 70 litros con 5 litros de metanol. Se usaron 138 ml de una solución de metóxido de sodio en metanol (30 %, 0,75 mol, 0,21 eq.) para ajustar el pH a 11,5. Se continuó la agitación durante 23 horas a 22 °C. El análisis por CCF mostró un contenido de *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina de menos del 0,5 %. La separación de fases se produjo después de la introducción de 31 litros de cloruro de metileno y 13 litros de agua purificada. La fase orgánica se neutralizó a pH 7,0 con 8 litros de metanol, 8 litros de agua purificada y 55 ml de ácido clorhídrico 1M. El análisis de CCF indicó ausencia de producto en las fases acuosas. La fase orgánica se evaporó hasta sequedad a 35 °C. El residuo se coevaporó dos veces con 6 litros de 2-propanol y dos veces con 12 litros de cloruro de metileno. El producto crudo se disolvió en 2,6 litros de metanol y 2,6 litros de cloruro de metileno y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm lavando con 1,2 litros de metanol y 1,2 litros de cloruro de metileno. La cristalización se indujo mediante la adición de 42 litros de acetona y el enfriamiento a 0 °C. Después de 15 horas, se aisló el precipitado y se lavó con 24 litros de acetona en cuatro porciones. El producto húmedo se suspendió en 19 litros de acetona a 22 °C durante 2,5 horas. Después del aislamiento y lavado con 12 litros de acetona en cuatro porciones, el proceso se finalizó secando a 30 °C durante 46 horas. Se obtuvieron 2,29 kg (3,25 moles, 90 %) de *N*-palmitoil-D-eritro-esfingomielina como un polvo blanco. La pureza fue del 99,2 % mediante HPTLC y del 99,0 % mediante análisis de HPLC. El contenido de agua fue del 0,7 %. La identidad fue confirmada por MS y 1H RMN.

20 ¹H RMN (600 MHz, ppm δ, CDCl₃): 0,88 (6H, t) 18, 16'; 1,2-1,3 (46H, m) 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 4', 5', 6', 7', 8', 9', 10', 11', 12', 13', 14', 15'; 1,57 (2 H, m) 3'; 1,99 (2 H, m, CH₂CH) 6; 2,15 (2H, m, CH₂CO) 2'; 3,23 (9H, s, N(CH₃)₃ N(CH₃)₃; 3,65 (2H, m, POCH₂CH₂N(CH₃)₃) CH₂N; 3,91 (2 H, m, CH₂OP) 1; 4,05 (1 H, t, J 7,7 Hz, CH(OH)CH) 3; 4,15 (1 H, m, CHNH) 2; 4,26 (2 H, m, POCH₂CH₂N(CH₃)₃) POCH₂; 5,45 (1H, dd, J 15,3 Hz, 7,4 Hz, CH(OH)CH) 4; 5,69 (1 H, dt, J 14,6 Hz, 7,2 Hz, CH₂CH) 5.

25 La tabla 1 muestra los rendimientos y las características del intermedio/producto a una escala de 120 g (Ejemplo 2). La Tabla 2 muestra los resultados para una escala de 2 kg (Ejemplo 3).

Tabla 1

Material de partida de reacción	Producto de reacción	Rendimiento	HPLC	HPTLC	LoD	KF
D-eritro-esfingosina	<i>N</i> -palmitoil-D-eritro-esfingosina	91,6 %	98,4 %	99,0 %	0,1 %	0,2 %
N-palmitoil-D-eritro-esfingosina	<i>N</i> -palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina	57,9 %	97,1 %	-	0,2 %	0,2 %
N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina	<i>N</i> -palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina	14,2 %	99,0 %	98,8 %	3,2 %	2,8 %
N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina	<i>N</i> -palmitoil-D-eritro-esfingomielina	63,5 %	98,6 %	99,4 %	-	4,4 %

LoD = pérdida al secarse, KF = contenido de agua

Tabla 2

Material de partida de reacción	Producto de reacción	Rendimiento	HPLC	HPTLC	LoD	KF
D-eritro-esfingosina	N-palmitoil-D-eritro-esfingosina	61,6 %	99,2 %	96,2 %	0,2 %	0,3 %
N-palmitoil-D-eritro-esfingosina	N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina	43,4 %	96,3 %	100,0 %	0,05 %	0,2 %
N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingosina	N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina	72,7 %	99,0 %	99,5 %	11,5 %	1,7 %
N-palmitoil-3-O-benzoil-D-eritro-esfingomielina	N-palmitoil-D-eritro-esfingomielina	90,1 %	99,0 %	99,2 %	> 250 ppm	0,7 %

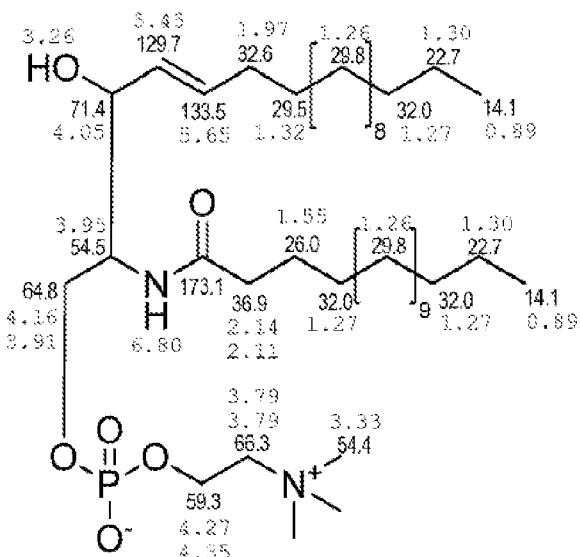
LoD = pérdida al secarse, KF = contenido de agua

Ejemplo 4: Confirmación de pureza óptica, identidad con esfingomielina de huevo de producto natural y configuración absoluta

- 5 Los espectros de RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro Varian Inova, operando a 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C, equipado con una sonda de resonancia triple de 5 mm y gradientes de eje z. El disolvente fue cloroformo-d y la temperatura de 25 °C. Los desplazamientos químicos para ¹H y ¹³C fueron referencia para la señal de disolvente residual, 7,27 ppm para ¹H y 77 ppm para ¹³C, en la escala de tetrametilsilano.
- 10 El espectro de protón fue tomado en 4 transitorios, con un pulso de 90°, en una ventana espectral 18 a -1 ppm. El tiempo de adquisición fue de 5 s y el retardo de relajación de 5 s. 94842 puntos en el FID se transformaron en 131072 puntos en el espectro, sin apodización.
- 15 El espectro ¹H-¹³C gHMBCAD fue adquirido con la secuencia de pulsos estándar de Varian, usando un pulso adiabático en ¹³C, y se optimizó para una constante de acoplamiento de 8 Hz. En la dimensión protónica se adquirieron 4096 puntos sobre una ventana espectral de 3755 Hz, de 1,24 a 8,74 ppm y se transformaron en el mismo número de puntos en el espectro, ponderando con una función gaussiana desplazada (gf = 0,277, gfs = 0,126). En la dimensión de carbono se tomaron 2 * 512 incrementos en un transitorio cada uno, sobre una ventana espectral de 10 a 190 ppm y se transformaron en 4096 puntos, usando una función gaussiana desplazada (gf = 0,019, gfs = 0,005). El retardo de relajación fue de 1 s.

Asignación de desplazamientos químicos en N-palmitoil-D-eritro-esfingomielina.

- 25 La asignación de los desplazamientos químicos se basó en los acoplamientos ¹H-¹H observados en los espectros DQCOY y los acoplamientos ¹H-¹³C, un enlace y largo alcance observados en los espectros ¹H-¹³C gHSQC y gHMBC. Las asignaciones se presentan en el esquema XV.



Esquema XV. Asignación de desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C en *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina en cloroformo-d a 25 °C

5 La asignación comenzó con el protón a 6,80, unido a ninguna de carbono, que tiene que ser el protón amida. El espectro de gDQCOSY reveló la secuencia 6,80 - 3,95 - 4,05 - 5,45 - 5,65 - 1,97, del esqueleto de esfingosina. De los tres grupos metíleno observados en el espectro de gHSQC, uno tiene un carbono en 66,3 que se acopla con los protones trimetilamino en 3,33. Sus protones, en 3,79, se acoplan con los protones en 4,27 y 4,53. Uno de los protones 10 del grupo metíleno restante, 4,18, muestra de hecho un acoplamiento con 3,95. El carbono amida muestra un pico cruzado con los protones en 2,14 y 2,11.

Comparación de la esfingomielina de huevo y sintética.

15 Con el fin de maximizar la precisión de las integrales, los espectros de protones para las tres muestras se tomaron en 64 transitorios, con un pulso de 45 °, en una ventana espectral 14 a -1 ppm. El tiempo de adquisición fue de 5 s y el retardo de relajación de 15 s. 79872 puntos en el FID se transformaron en 131072 puntos en el espectro, sin anodización.

20 Los espectros de ^1H para *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielinas de huevo y sintetizadas por procedimientos de la presente invención se presentan en las Figs. 1-3, correspondientemente. La integral hacia referencia a la señal del grupo trimetilamonio a 3,33 ppm (9H). La señal en 2,58 en la Fig. 1 y 3,00 en las Figs. 2 y 3 es agua. Las dos muestras sintéticas son idénticas, dentro de la precisión de la integral, alrededor del 1 %. La muestra natural tiene una cadena de alquilo promedio más corta y algunas impurezas son notables para las señales de NH y alqueno.

25 El esqueleto de la esfingosina tiene dos carbonos quirales, de ahí la posibilidad de 4 estereoisómeros. Las muestras sintéticas no muestran la duplicación de las señales esperadas para una mezcla de diastereómeros. No se puede hacer tal evaluación para la esfingomielina del huevo, ya que es una mezcla. Para confirmar la pureza enantiomérica, las muestras de *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielinas de huevo y sintetizadas por los procedimientos de la invención se 30 trataron en un tubo con un exceso de ácido R-metoxifenilacético (R-MPA), dícclohexilcarbodiímida (DCC) y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y se examinó la región 5,20 - 5,95 ppm y se presentan en las Figs. 4-6, correspondientemente. El triplete en 5,42 (Fig. 5) es H3 (véase la Tabla 3), el doblete de dobletes en 5,49 es H4 y el doblete de tripletes en 5,73 es H5. La figura 4 muestra el crecimiento de un doblete en 5,53 a medida que madura la 35 mezcla de reacción, y este doblete también es visible en la Fig. 6. Otras de estas señales, se determinó que no hay señales por encima del 5% de las señales del éster, por lo tanto, se determinó que la pureza enantiomérica de la muestra parecía ser al menos del 95 %, es decir, que la muestra no contiene más de aproximadamente el 5 % de su correspondiente enantiómero opuesto. La configuración absoluta de las tres muestras es la misma, ya que las señales de H3-H5 en sus ésteres de R-MPA tienen los mismos desplazamientos químicos.

40 Determinación de la configuración absoluta.

Con el fin de verificar la configuración absoluta, un equivalente de esfingomielina palmitoil de huevo fue tratado en el tubo de RMN con 1,2 equivalentes de una mezcla racémica de ácido R-(*l*)- α -metoxifenilacético (R-MPA) y ácido S-(*d*)- α -metoxifenilacético (S-MPA), 1,2 equivalentes de dícclohexilcarbodiímidá (DCC) y una cantidad catalítica de 4-

dimetilaminopiridina (DMAP). La Fig. 7 (abajo) muestra el espectro de RMN de ^1H de esta mezcla de reacción. La figura 7 también muestra los espectros 1D-TOCSY (espectroscopía de correlación total 1 dimensional) que muestran la excitación selectiva del pico de hidrógeno H2 en los ésteres R-MPA (arriba) y S-MPA (medio) en la parte superior. Las DdRS medidas en los espectros 1D-TOCSY se indican en la Tabla 3.

5

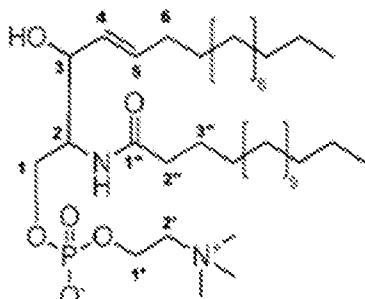


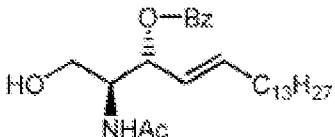
Tabla 3. DdRS en esfingomielina de huevo

posición	1a	1b	2	3	4	5	6	NH
alcohol	4,16	3,91	3,95	4,05	5,45	5,65	1,97	6,8
R-MPA	3,85	3,45	4,21	5,39	5,47	5,73	1,97	7,54
S-MPA	3,97	3,97	4,3	5,39	5,26	5,44	1,82	7,4
DdRS	-0,12	-0,52	-0,09	0	0,21	0,29	0,15	0,14

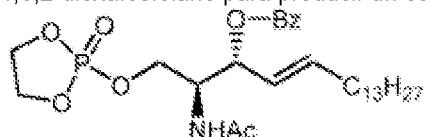
- 10 La DdRS positiva para H4-H6 y la DdRS negativa para H1a, H1b y H2 indican que la configuración absoluta en C3 es R.

REIVINDICACIONES

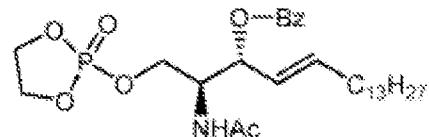
1. Procedimiento para sintetizar una *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprende permitir que el compuesto que tiene la fórmula



en la que Ac es un residuo de ácido graso que tiene de 3 a 36 carbonos y de cero a seis dobles enlaces carbono-carbono, reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano para producir un compuesto que tiene la fórmula

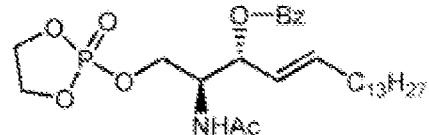


y permitir que el compuesto que tiene la fórmula



15 reaccione con trimetilamina en condiciones eficaces para producir la *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina, en la que el acilo es Ac;

en el que el compuesto que tiene la fórmula



20 no se purifica ni se aísla.

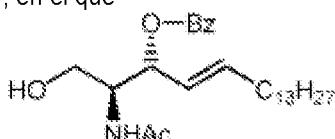
25 2. Procedimiento para sintetizar una *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprende realizar el procedimiento, según la reivindicación 1, y eliminar el grupo benzoilo de la *N*-acil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingomielina en condiciones que sean eficaces para producir la *N*-acil-*D*-eritro-esfingomielina.

30 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que acilo es palmitoílo.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la trimetilamina se añade como un líquido.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la trimetilamina se añade en forma gaseosa.

35 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que



se permite reaccionar con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en presencia de tetrametiletilendiamina.

40 7. Procedimiento para sintetizar *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina, que comprende:

(a) permitir que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-*D*-eritro-esfingosina reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en condiciones eficaces para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-*D*-eritro-ceramida;

(b) permitir que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-*D*-eritro-ceramida reaccione con trimetilamina en condiciones eficaces para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-3-O-benzoil-esfingomielina; y

(c) permitir que *N*-palmitoil-*D*-eritro-3-O-benzoil-esfingomielina reaccione con metóxido de sodio en condiciones eficaces para producir *N*-palmitoil-*D*-eritro-esfingomielina; en el que *N*-palmitoil-3-O-benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-*D*-eritro-ceramida no se purifica ni se aísla.

45 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la trimetilamina se añade como un líquido.

9. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la trimetilamina se añade en forma gaseosa.
10. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la etapa (c) se realiza en una escala de kilogramos.
- 5 11. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que se permite que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-*eritro*-esfingosina reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en presencia de tetrametiletilendiamina.
- 10 12. Procedimiento para sintetizar *N*-palmitoil-D-*eritro*-3-O-benzoil-esfingomielina, que comprende: permitir que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-*eritro*-esfingosina reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en condiciones eficaces para producir *N*-palmitoil-3-O-benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-D-*eritro*-ceramida; y permitir que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-D-*eritro*-ceramida reaccione con trimetilamina en condiciones eficaces para producir *N*-palmitoil-D-*eritro*-3-O-benzoil-esfingomielina; en el que *N*-palmitoil-3-O-benzoil-1-O-(2-oxo-1,3,2-dioxafosfolan)-D-*eritro*-ceramida no se purifica ni se aísla.
- 15 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la trimetilamina se añade como un líquido.
14. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la trimetilamina se añade en forma gaseosa.
- 20 15. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que se permite que la *N*-palmitoil-3-O-benzoil-D-*eritro*-esfingosina reaccione con 2-cloro-2-oxo-1,3,2-dioxafosfolano en presencia de tetrametiletilendiamina.

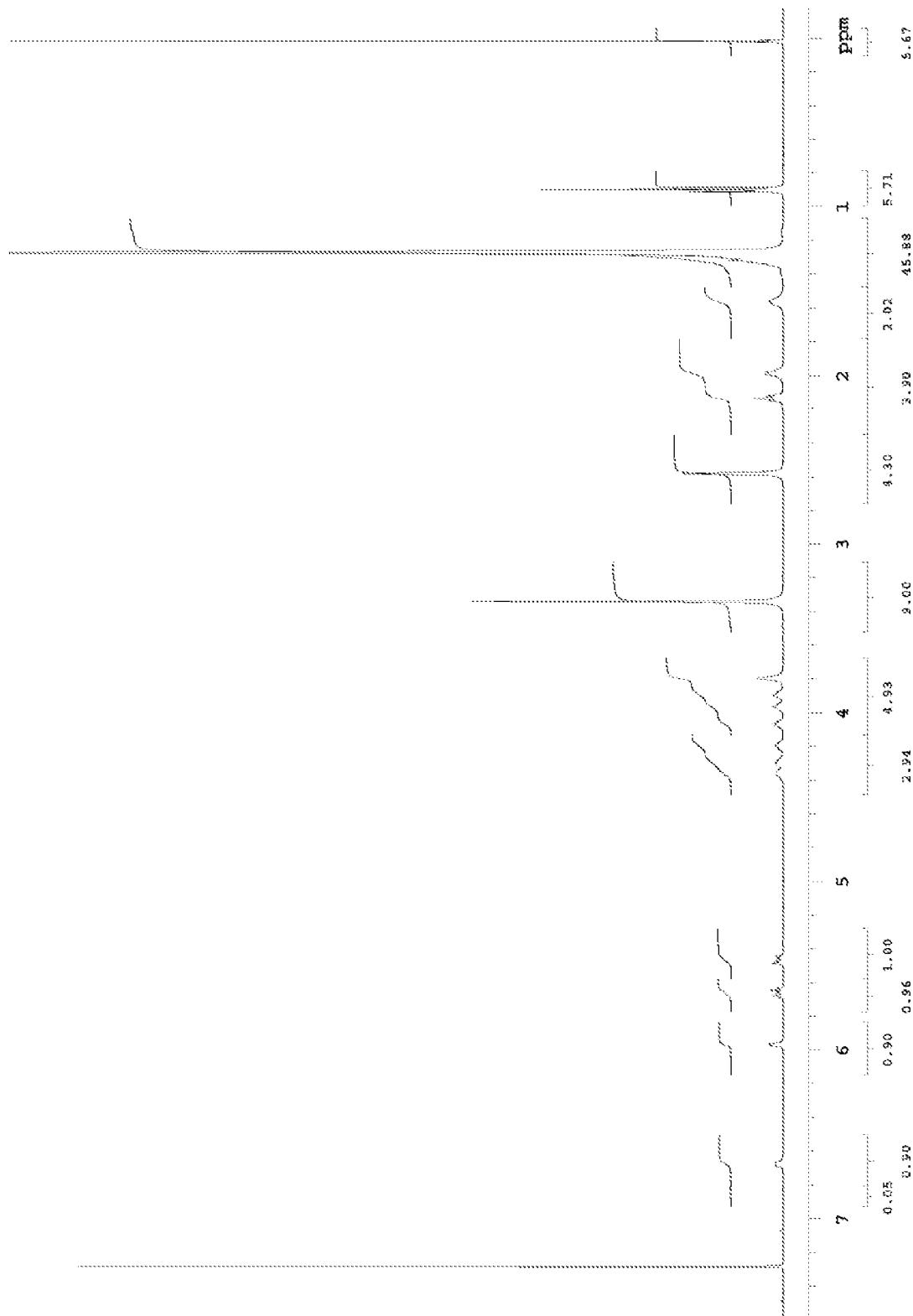


FIG. 1

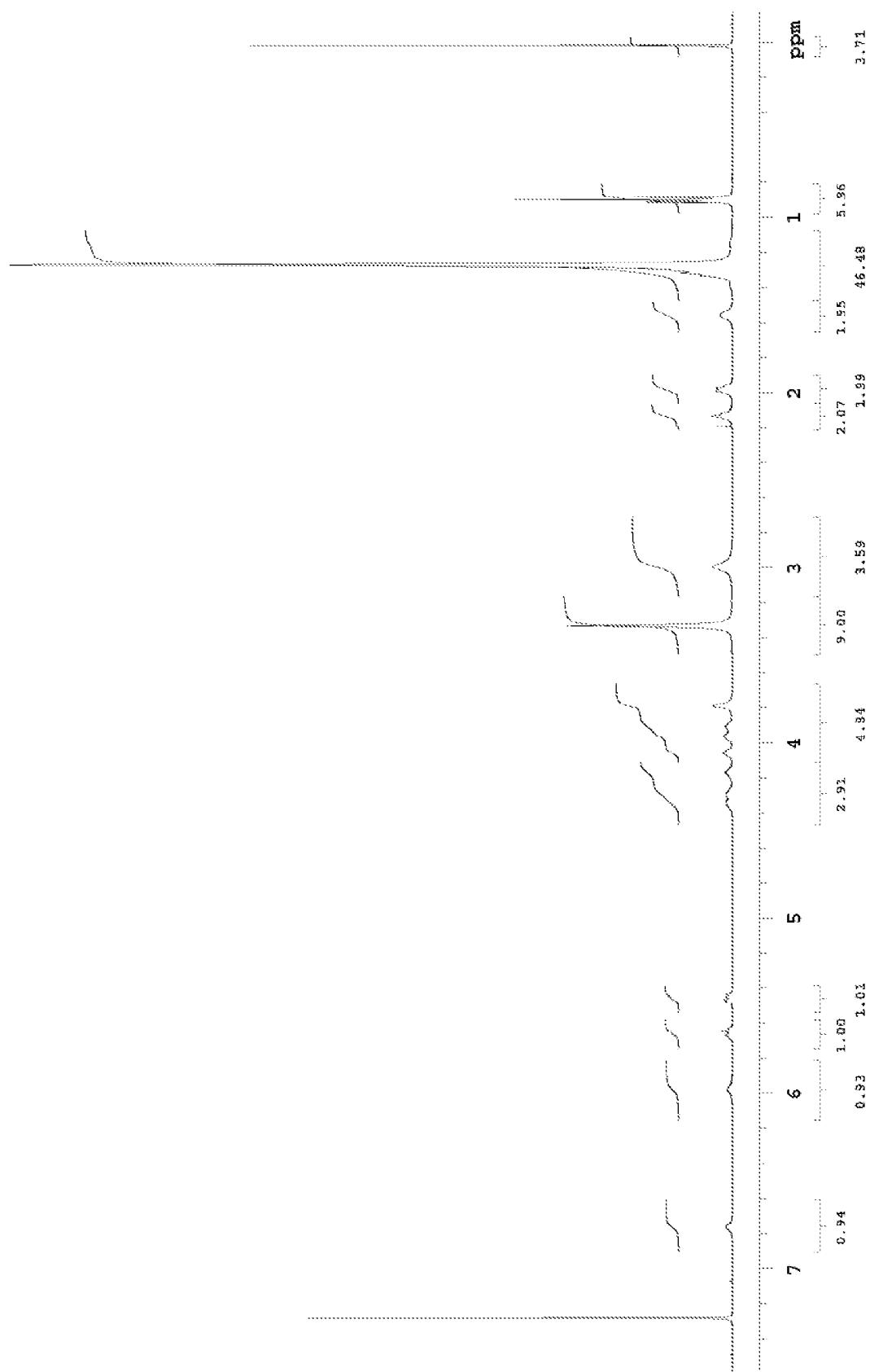


FIG. 2

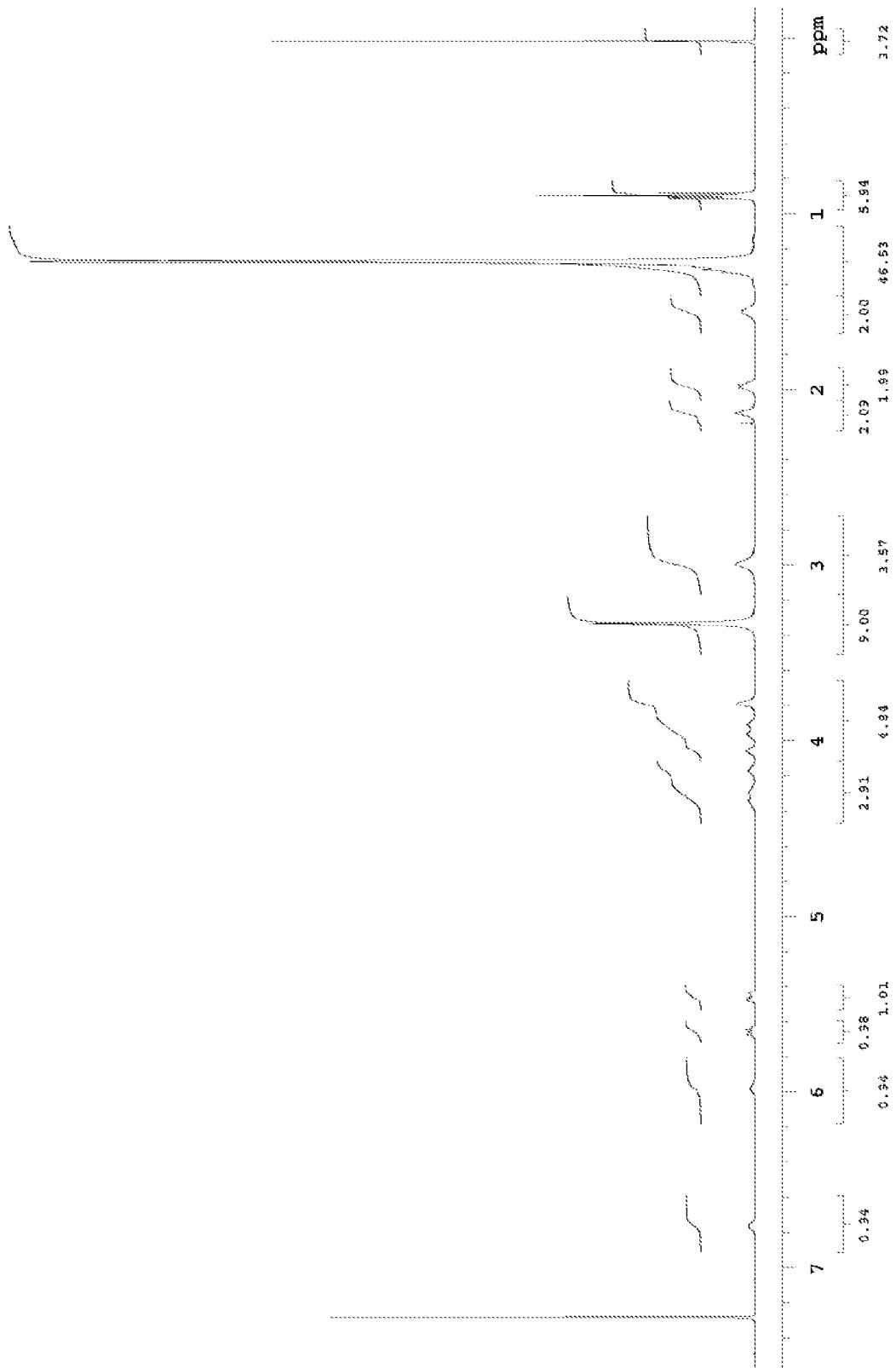


FIG. 3

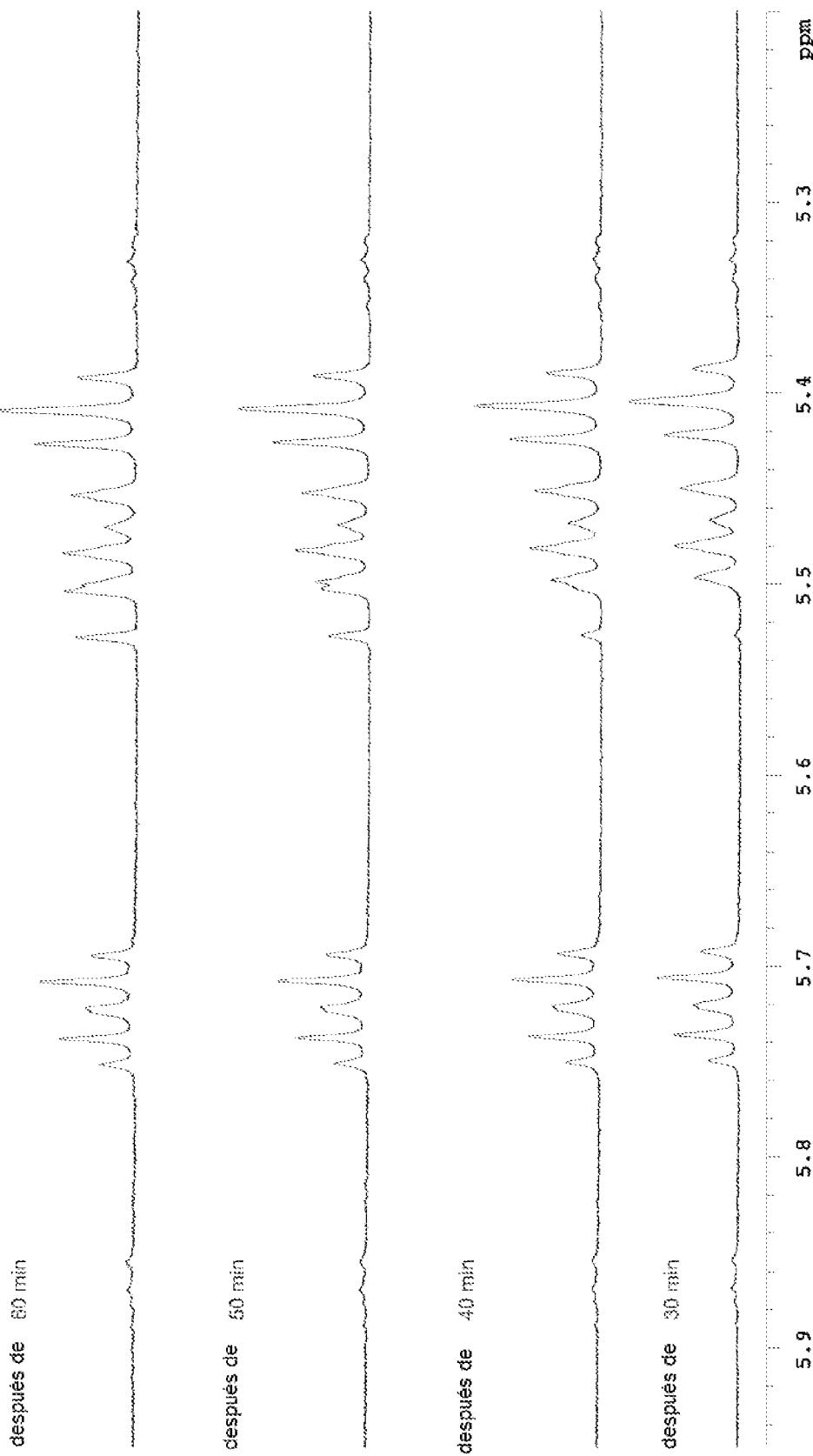


FIG. 4

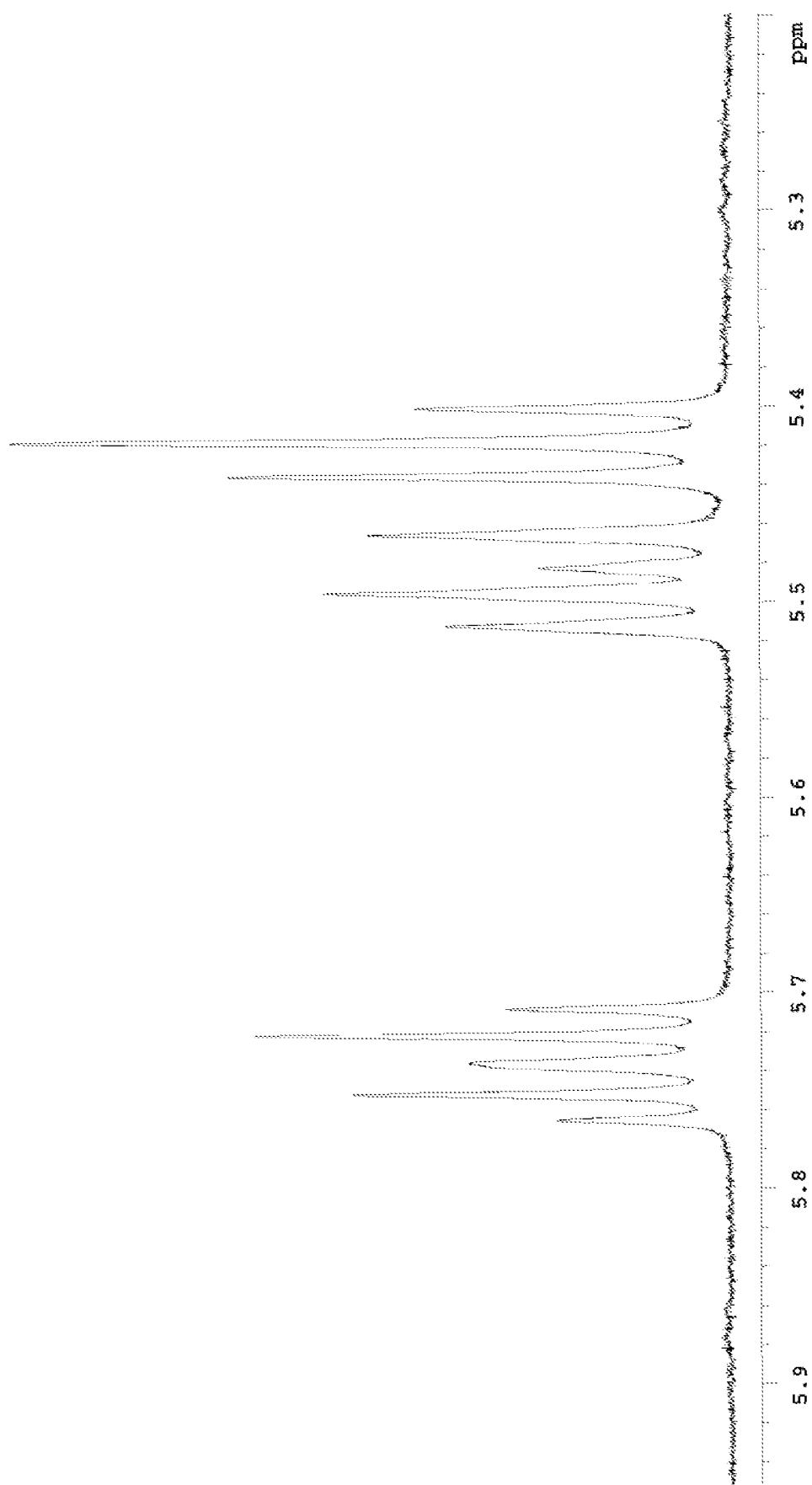


FIG. 5

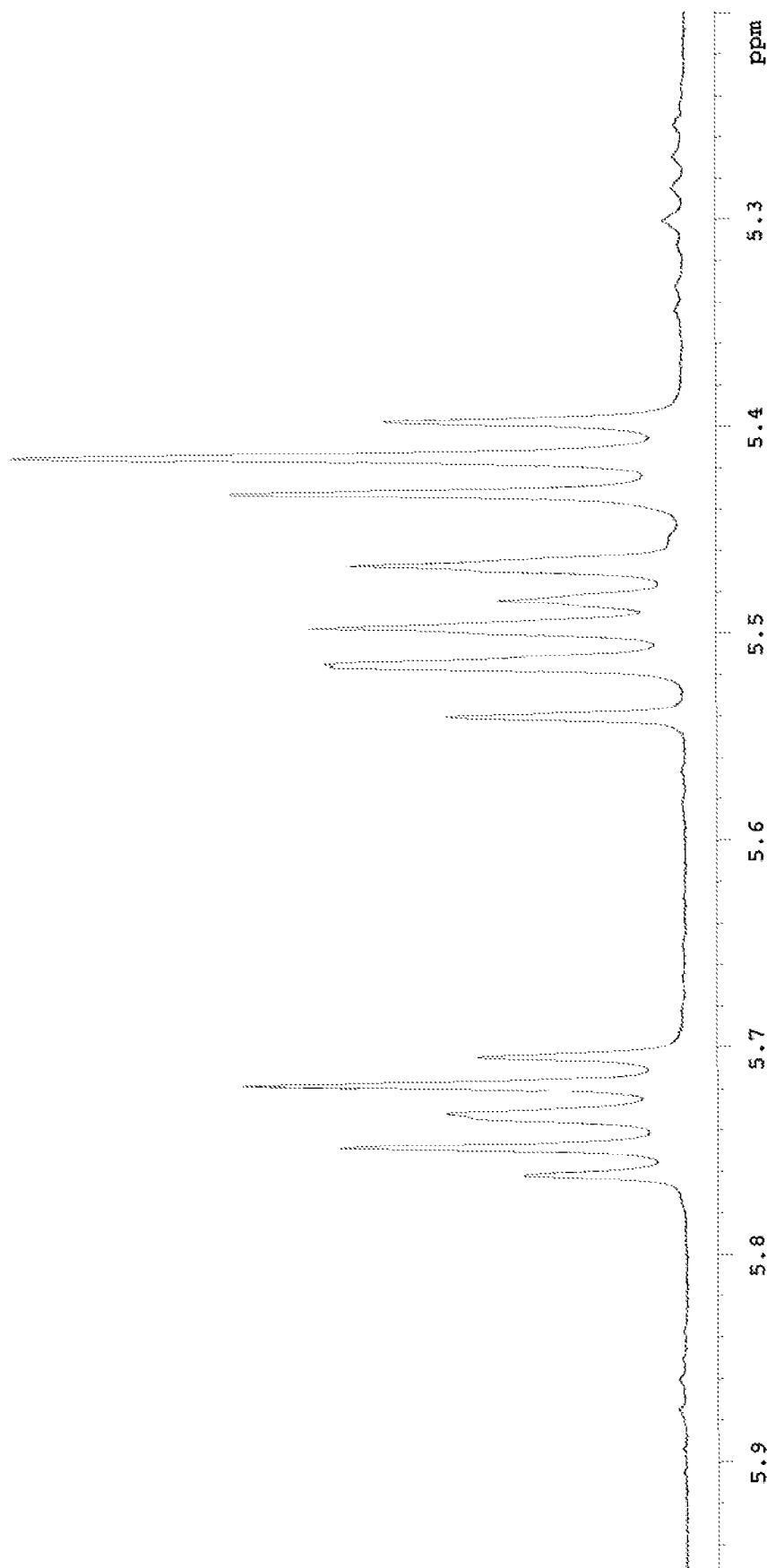


FIG. 6

ES 3 017 659 T3

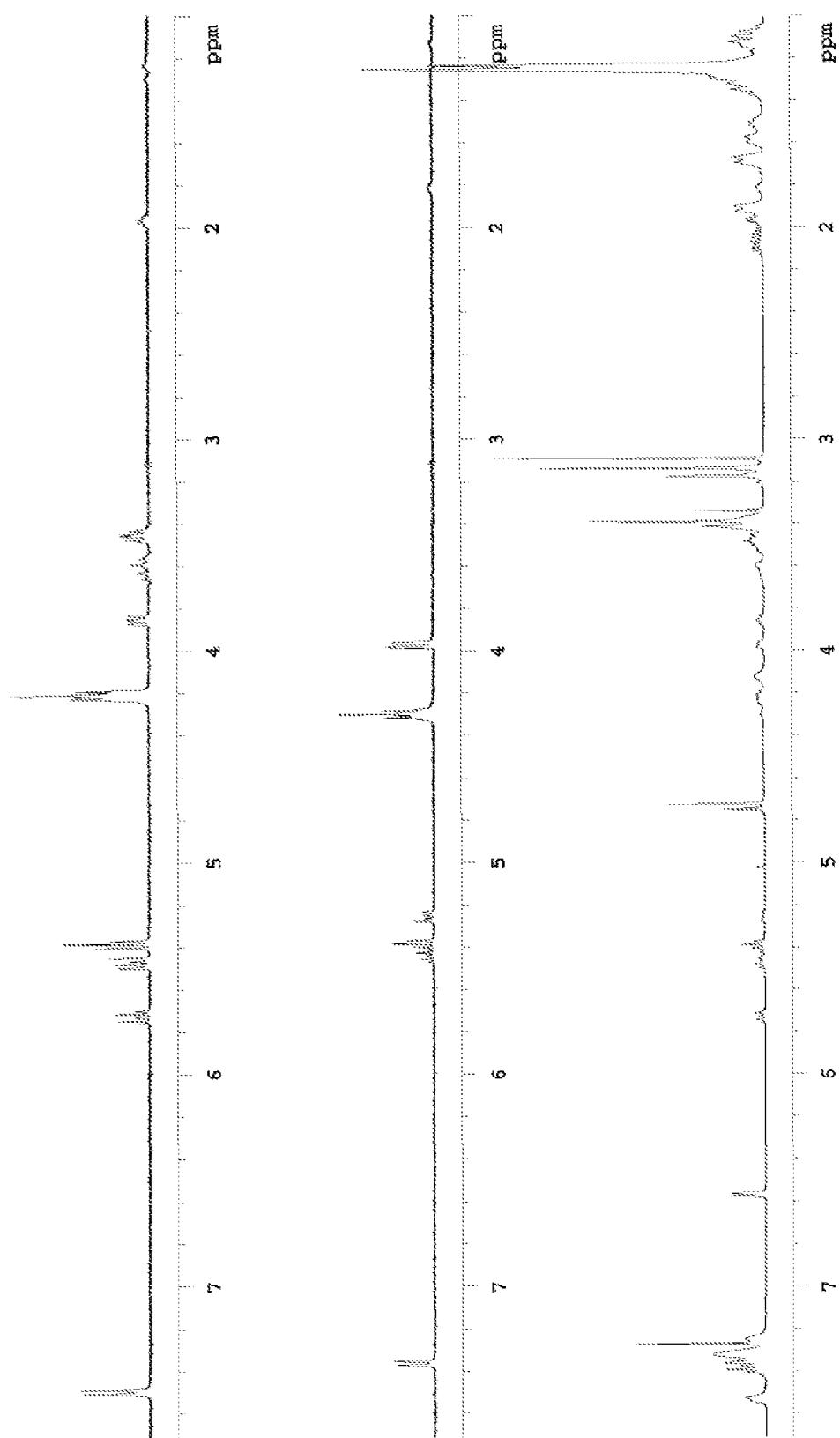


FIG. 7

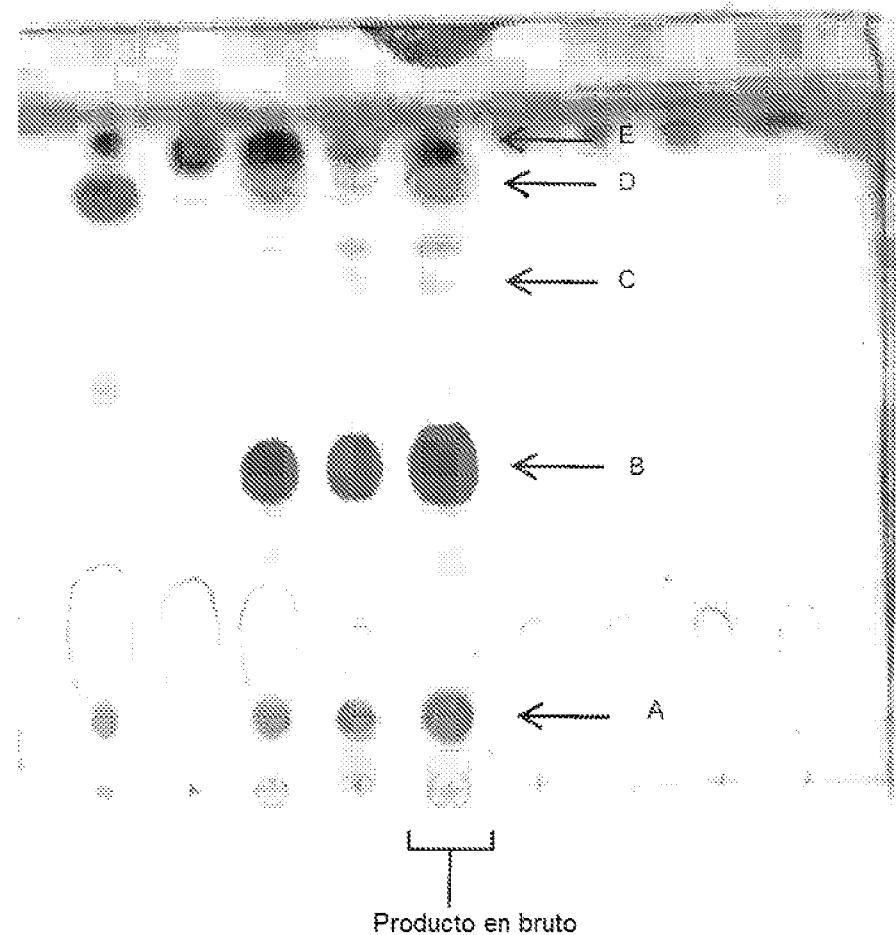


FIG. 8