



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0617687-9 A2**

(22) Data de Depósito: 25/10/2006
(43) Data da Publicação: 02/08/2011
(RPI 2117)



(51) *Int.Cl.:*
C07H 15/00 2006.01
A61K 31/70 2006.01
A61K 35/28 2006.01

(54) Título: **COMPOSTO, MÉTODO PARA PROTEGER UM INDIVÍDUO MAMÍFERO CONTRA, OU TRATAR, UM VÍRUS, INFECÇÃO MICROBIANA, PARASITA, UMA DOENÇA AUTO-IMUNE, CÂNCER, ALERGIA OU ASMA, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**

(30) Prioridade Unionista: 25/10/2005 US 60/730171, 05/01/2006 US 60/756505, 23/01/2006 US 60/761110, 25/10/2005 US 60/730171

(73) Titular(es): Ludwig Institute For Cancer Research

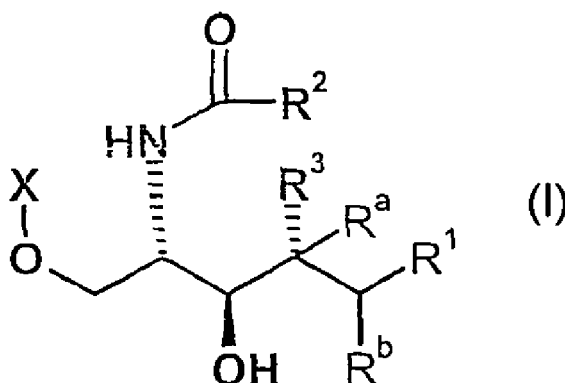
(72) Inventor(es): Gerd Ritter, Gopal Reddy, Gurdyal Besra, Jonathan Silk, Mariolina Salio, Rengarajan Balamurugan, Richard Schmidt, Vincenzo Cerundolo

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006041592 de 25/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/050668 de 03/05/2007

(57) Resumo: COMPOSTO, MÉTODO PARA PROTEGER UM INDIVÍDUO MAMÍFERO CONTRA, OU TRATAR, UM VÍRUS, INFECÇÃO MICROBIANA, PARASITA, UMA DOENÇA AUTO-IMUNE, CÂNCER, ALERGIA OU ASMA, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA. Descreve-se um composto de fórmula 1, sendo que R₁ representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal C de CD1d humana, R₂ representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal A de CD 1d humana, de tal forma que R₁ preencha pelo menos pelo menos 30% do volume ocupado do canal C comparado com o volume ocupado pelo nC₁₄H₂₉ terminal da cadeia esfingosina de c-x-galactosilceramida quando ligado a CD1d humana e R₂ preenche pelo menos 30% do volume ocupado do canal A comparado com o volume ocupado pelo nC₂₅H₅₁ terminal da cadeia acila da α-galactosilceramida quando ligado a CD 1 d humana R₃ representa hidrogênio a b ou OH, R e R representa, cada um, hidrogênio, e, adicionalmente, quando R₃ representa hidrogênio, R^a e R^b em conjunto, podem formar uma ligação simples, X representa ou -CHA(CHOH) nY ou -P(=O)(O)OCH₂ (CHOH) mY, sendo que Y representa CHB₁B₂, n representa um número inteiro de 1 a 4, m representa 0 ou 1, A representa hidrogênio, um de B₁ e B₂ representa H, OH ou fenila, e o outro representa hidrogênio ou um de B₁ e B₂ representahidroxila e o outro representa fenila, adicionalmente, quando n representa 4, então A juntamente com um de B₁ e B₂ forma, em conjunto, uma ligação simples, e o outro de B₁ e B₂ representa H, OH ou OSO₃H e sais farmacêuticamente aceitáveis do mesmo; os compostos de fórmula 1 são indicados para uso no tratamento de um vírus, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma.



Estudo da estrutura de α Gal-Cer mostra que contém uma cadeia esfingosina. MIYAMOTO, *et al*, *Nature*, 413:531 (2001), mostrou que a truncação desta cadeia resulta em um composto que previne encefalite auto-imune.

Em trabalho paralelo mostrou-se que células T exterminadoras naturais (células NKT [*natural killer cells*]) reconhecem antígenos lipídicos que são apresentados pela proteína similar a classe I do Complexo de Histocompatibilidade Maior, CD1d, por exemplo. Ver, Godfrey *et al*, *J. Clin. Invest.*, 114:1379-1388 (2004).

Singh, *et al*, *J. Immunol.*, 163:2373 (1999), e Burdin, *et al*, *Eur. J. Immunol.*, 29:2014 (1999), mostraram que α Gal-Cer e CD1d potencializam respostas imunológicas adaptativas mediadas com Th2, via ativação de V α 14 (NKT) células T exterminadoras naturais (NKT) V α 14.

O mecanismo proposto através do qual α Gal-Cer previne doença é sua capacidade de suprimir interferon-gama, mas não interleucina-4, por células NKT. Ver, p. ex., Brossay, *et al*, *J. Exp. Med.*, 188:1521 (1998); Spada, *et al*, *J. Exp. Med.*, 188:1529 (1998), que mostraram o reconhecimento de α Gal-Cer por células NKT, sugerindo eficácia terapêutica em humanos.

α Gal-Cer foi desenvolvido como um composto terapêutico potencial e levado a testes clínicos, ver, por exemplo, Giaccone *et al*, *Clin. Canc. Res.*, 8, 3702-3709 (2002). No entanto, após tratamento com α Gal-Cer, o nível de células NKT no sangue periférico de pacientes de câncer tratado que foram tratados caiu a níveis indetectáveis dentro de 24 horas de tratamento e não atingiu novamente níveis pré-tratamento durante o período remanescente do estudo.

A perda de níveis circulantes de células NKT poderia representar uma limitação significativa do ponto de vista terapêutico à medida que poderia sugerir que a estimulação terapêutica de células NKT

não poderia ser usada como um tratamento repetido.

Assim, há um interesse na síntese de análogos de α Gal-Cer que atuam como estimuladores de células NKT mas que não levam a perda rápida de níveis circulantes de populações de células NKT após administração terapêutica.

Diversas publicações descrevem a síntese de α Gal-Cer e seus derivados. Uma lista exemplar, mas de modo algum exaustiva dessas referências inclui Morita, *et al*, *J. Med. Chem.*, 38:2176 (1995); Sakai, *et al*, *J. Med. Chem.*, 38: 1836 (1995); Morita, *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5:699 (1995); Takakawa, *et al*, *Tetrahedron*, 54:3150 (1998); Sakai, *et al*, *Org. Lett.*, 1:359 (1998); Figueroa-Perez, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 328:95 (2000); Plettenburg, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 67:4559 (2002); Yang, *et al*, *Angew. Chem.*, 116:3906 (2004); Yang, *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43:3818 (2004); e, Yu, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(9):3383-3388 (2005).

Realizou-se estudos para examinar o impacto biológico da molécula α Gal-Cer quando se realizou modificações em sua estrutura. Higa, *et al*, *supra*, e também, Zhou, *et al*, *Org. Lett.*, 4:1267 (2002); Schmieg, *et al*, *J. Exp. Med.*, 198:1631 (2003), Barbieri, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 468 (2004); e Fan, *et al*, *Tetrahedron*, 61:1855 (2005), são exemplos da literatura limitada neste tópico. Tsuji, *et al*, *J. Exp. Med.*, 198:1631 (2003), prepararam um análogo sintético de C-glicosídeo, i.e., α -C-Gal-Cer, que atua em células NKT, *in vivo*, estimulando respostas imunológicas incrementadas de tipo Th1 em camundongos. A proteção contra infecção microbiana e eficácia anti-tumor (Skold, *et al*, *Infect. Immun.*, 71:5447 (2003); Sharif, *et al*, *supra*; Hong, *et al*, *supra*) são de interesse especial.

Trabalho adicional nos mecanismos de ação destes compostos é mostrado, por exemplo, por Parekh, *et al*, *J. Immunol.*, 173:3693-3706 (2004), e Brossay, *et al*, *supra*.

Exemplos de patentes dos Estados Unidos e Pedidos de Patentes ou Pedidos de Patentes Internacionais que descrevem casos de referidos derivados e ou a atividade biológica de análogos de α Gal-Cer incluem a Patente dos Estados Unidos nº 5.936.076 para Higa, *et al*, e Patente dos Estados Unidos nº 6.531.453 para Taniguchi, *et al*, Patente dos Estados Unidos nº 5.853.737 para Modlin *et al*, Pedido de Patente dos Estados Unidos 2003030611 para Jiang *et al*, Pedido de Patente dos Estados Unidos 20030157135 para Tsuiji *et al*, Pedido de Patente dos Estados Unidos 20040242499 para Uematsu *et al* e Pedidos de Patentes Internacionais descrevendo No. PCT/JP20021008280 para Yamamura *et al*.

Essencialmente, todos estes exemplos anteriores descrevem estruturas análogas baseadas em α Gal-Cer. A identificação e caracterização de moléculas que não são glicolípídeos, como α Gal-Cer e seus análogos, tem sido limitada. Exemplos de Pedidos de Patentes descrevendo estruturas que não parecem ser análogas a α Gal-Cer incluem peptídios de acila do Pedido de Patente dos Estados Unidos nº 20040265976 para Moody *et al*, e Pedido de Patente JP 34540997 para Masunaga *et al*.

Verificou-se agora um grupo inédito de compostos que emulam substancialmente as propriedades de ligação de um α -GalCer com a molécula CD1d humana, mas difere significativamente quanto à interação com receptores de células T (TCR, *T-cell receptors*), levando a propriedades inesperadas e vantajosas em comparação com α -GalCer.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Fig. 1 - Comparação da taxa de dissociação de OCH e α -GalCer. Dissociação de ligante de hCD1d. O complexo de hCD1d (α -GalCer ou OCH) indicado foi carregado sobre uma superfície de sensor de ressonância de plasmon de superfície (Biacore) em $t = 0$ e mediu-se a quantidade de hCD1d remanescente no momento indicado usando o Fab 9B.

Fig. 2 - Comparação da afinidade de ligação de TCR para OCH e α -GalCer;

Afinidade e cinética da ligação de TCR *i*NKT a hCD1d complexado com α -GalCer ou OCH. Concentrações crescentes de 0,4 μ M a 194 μ M (diluição de duas vezes) de TCR MO foram injetadas durante 5 segundos sobre os complexos hCD1d-GSL indicados. As respostas de ligação de 5 concentrações são mostradas superpostas. Os quadros à direita mostram resposta de ligação em equilíbrio.

Fig. 3 - Medições de ressonância de plasmon de superfície (Biacore) de análogos de baixa afinidade de α -GalCer

Mediu-se as afinidades de um TCR de célula NKT solúvel para moléculas CD1d humanas redobradas com diferentes análogos de α -GalCer. Realizou-se medições de ligação e cinética, respectivamente, para α -GalCer (A e B), treitolceramida (C e D), 4S-treitolceramida (E e F), 4R-treitolceramida (G e H). Os valores K_d (μ M) foram calculados da ligação de equilíbrio. Os valores K_{on} foram calculados de K_{off} e K_d .

Fig. 4 - DC [células dendríticas] humanas são maturadas com análogos de α -GalCer *in vitro* quando co-cultivadas com células *i*NKT

Diferentes análogos de α -GalCer como indicado ou LPS foram adicionados a co-culturas de DC humanas e células *i*NKT. (A) Maturação das DC foi avaliada após 40 h, direcionando a células positivas para CD11c. Histogramas indicam os perfis CD83 e CD86 de DC de diferentes tratamentos; os percentuais indicam o percentual de DC maduras CD83hi e os números em parênteses, a intensidade de fluorescência média da população contida na porta marcada. DC e células *i*NKT foram co-cultivadas na presença de diferentes análogos de α -GalCer durante 24 horas. Sorbrenadantes foram analisados usando ELISA quanto à presença de (B) IL-12p40 liberado pelas DC e (C) LFN- γ das células *i*NKT. Todos os compostos testados induziram produção de citocina mais fraca, porém

significativa, do que α -GalCer, com a exceção de arabinitolceramida. (D) Titulação de α -GalCer, OCH ou treitolceramida em DCs e co-cultivo com células *i*NKT induz maturação de DC *in vitro*. Células foram co-cultivadas na presença da concentração indicada de análogo e mostra-se os percentuais de DC com CD83/CD80 incrementado. (E) Titulação de α -GalCer induz morte significativa de DC *in vitro* quando co-cultivadas com células *i*NKT, enquanto que análogos de baixa afinidade não o fazem. Viabilidade de α -GalCer ou DC pulsado com análogo foi avaliada após 40 horas de co-cultura na presença de células *i*NKT por meio de citometria de fluxo. Células foram manchadas com iodeto de piridínio e mostra-se o percentual de células direcionadas com CD11c vivas remanescentes na cultura.

Fig. 5 - Análogos não-glicolipídicos de α -GalCer estimulam ativação de células *i*NKT e subsequente maturação de DC *in vivo*.

Camundongos C57BL/6 ou *i*NKT^{-/-} receberam injeção i.v. com 1 μ g de carreador, α -GalCer, análogo ou 25 μ g de MPL. Vinte horas após a injeção esplenócitos foram manchados com anticorpos contra CD11c, B220 e CD86 e analisados por meio de citometria de fluxo. (A) Maturação foi avaliada por meio de regulação para cima de CD86 na superfície da célula, direcionando em DC (CD11c⁺). Indica-se a intensidade de fluorescência média para cada histograma. Estes são perfis representativos de dois experimentos independentes. Duas, 6 e de 18 a 24 h após injeção como descrito, os camundongos foram sangrados e o soro foi testado com ELISA quanto à presença de (B) IL-4 e (C) IFN- γ liberadas em resposta ao análogo.

Fig. 6 - Antígenos não-glicolipídicos como adjuvantes efetivos quando co-administrados com um antígeno-alvo.

(A) camundongos C57BL/6 foram co-injetados com 1 μ g de α -GalCer ou análogo e 800 μ g de OVA. 6 dias mais tarde coletou-se

amostras de sangue da veia caudal que foram manchadas diretamente *ex vivo* com tetrâmeros SIINFEKL-K^b fluorescentes e um anticorpo anti-CD8 e analisados por meio de citometria de fluxo. Dados são mostrados como células positivas para tetrâmero como um percentual de células CD8⁺. (B) 7 dias após a injeção, os camundongos foram expostos em um cenário profilático com 1x10⁶ células de tumor E.G7-OVA s.c. e monitorou-se o tamanho do tumor durante dias subseqüentes. Houve pouco ou nenhum crescimento de tumor em camundongos injetados com α -GalCer, arabinitol ou treitolceramida com OVA.

Fig. 7 - Análogos não-glicolipídicos de α -GalCer estimulam maturação de células B na presença de células *i*NKT *in vivo* e subseqüente produção de anticorpos.

(A) camundongos C57BL/6 ou *i*NKT^{-/-} receberam injeção i.v. com 1 μ g de carreador, α -GalCer, análogo ou 25 μ g de MPL. Vinte horas após injeção esplenócitos foram manchados com anticorpos contra B220 e CD86 e analisados por meio de citometria de fluxo. Maturação foi avaliada por meio de regulação para cima de CD86 na superfície da célula, direcionando em células B (B220⁺). Indica-se a intensidade de fluorescência média para cada histograma. (B) Administração simultânea de 1 μ g α -GalCer ou análogos e 400 μ g de OVA induz IgGs específicas para OVA que são significativas. Camundongos foram sangrados de 11 a 14 dias após a administração e o soro foi testado com ELISA quanto a anticorpos. Em resumo, placas ELISA foram revestidas com 10 μ g/ml de OVA e adicionou-se então diluições seriais de soros e isto foi incubado de um dia para o outro a 4°C antes de detecção com uma IgG anti-camundongo de cabra conjugada com HRP.

Fig. 8 - Expansão de células T CD8⁺ específicas para Melan A com DC pulsadas com treitolceramida é pelo menos tão efetiva quanto com DC pulsadas com α -GalCer *in vitro*

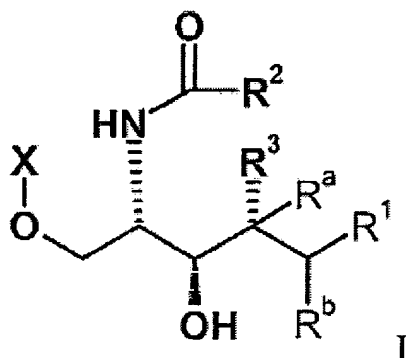
A expansão de células T CD8⁺ específicas para Melan A com DC pulsadas com treitolceramida é pelo menos tão efetiva quanto com DC pulsadas com α -GalCer *in vitro*. A adição de diferentes análogos de α -GalCer e peptídeo Melan-A₂₆₋₃₅ a PBMCs humanas induziu maturação de DC e subsequente expansão de células T CD8⁺ específicas para Melan-A como avaliado por meio de análise de tetrâmero HLA-A2/Melan-A₂₆₋₃₅. Citometria de fluxo de culturas nos dias de 10 a 15 de PBMCs co-cultivadas com APCs irradiadas autólogas, pulsadas com peptídeo Melan-A₂₆₋₃₅ foram manchadas com o tetrâmero e FITC anti-CD8⁺. Indica-se os percentuais de células positivas para tetrâmero [tetrâmero⁺] como um percentual do total de células CD8⁺ \pm SE.

Fig. 9 - Derivados de α -GalCer à base de inositol são funcionais *in vitro*. DC derivadas de monócitos humanos foram pulsadas com 150 ng de diferentes análogos de inositol e co-cultivadas com células *i*NKT durante 24 h. Os análogos de 6-desóxi- e 6-sulfono-mio-inositolceramida foram apenas ligeiramente menos potentes do que α -GalCer conforme avaliado por meio de regulação para cima de CD83 e CD86. Números indicam a intensidade de fluorescência média do histograma direcionado em células CD11c⁺. 6-Desóxi e 6-sulfono-mio-inositolceramida induzem produção significativa de (B) IL-12p40 e (C) IFN- γ por DC e células *i*NKT respectivamente nos sobrenadantes de DC co-cultivadas e células *i*NKT. Sobrenadantes foram testados com ELISA e revelam que 6-Desóxi-mio-inositolceramida induz liberação de concentrações similares de IL-12p40 e IFN- γ àquelas observadas com α -GalCer. A liberação de (D) IFN-g e (E) IL-4 de células *i*NKT após 24 h em cultura com células CD1d humanas de C1R pulsadas com α -GalCer, 6-Desóxi- ou 6-Sulfono-mio-inositolceramida. Titulações dos análogos sugerem que o TCR de célula *i*NKT humana tem uma menor afinidade por

estes compostos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção proporciona-se um composto de fórmula I,



em que

R^1 representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal C' de CD1d humanas, R^2 representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal A' de CD1d humanas, de tal forma que R^1 preencha pelo menos 30% do volume ocupado do canal C' comparado com o volume ocupado pelo nC₁₄H₂₉ terminal da cadeia esfingosina de α -galactosilceramida quando ligado a CD1d humanas e R^2 preenche pelo menos 30% do volume ocupado do canal A' comparado com o volume ocupado pelo nC₂₅H₅₁ terminal da cadeia acila de α -galactosilceramida quando ligado a CD1d humana R^3 representa hidrogênio ou OH,

R^a e R^b representa, cada um, hidrogênio e, adicionalmente, quando R^3 representa hidrogênio, R^a e R^b em conjunto podem formar uma ligação simples,

X representa ou -CHA(CHOH)_nY ou -P(=O)(O)OCH₂(CHOH)_mY, sendo que Y representa CHB₁B₂

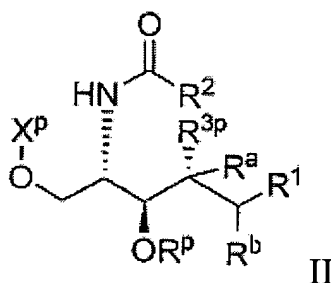
n representa um número inteiro de 1 a 4,

m representa 0 ou 1,

A representa hidrogênio, um de B₁ e B₂ representa H, OH ou fenila, e o outro representa hidrogênio ou um de B₁ e B₂ representa

hidroxila e o outro representa fenila, adicionalmente, quando n representa 4, então A, em conjunto com um de B₁ e B₂ forma, conjuntamente, uma ligação simples e o outro de B₁ e B₂ representa H, OH ou OSO₃H e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

De acordo com a invenção nós também proporcionamos um processo para a produção de compostos de fórmula I, ou um sal dos mesmos, ou um derivado farmaceuticamente aceitável dos mesmos, que compreendem a remoção de um ou mais grupos protetores de um composto de fórmula II correspondente,



em que X^p representa X protegido, R^p é um grupo protetor de hidroxila, R^{3p} representa um grupo hidroxila protegido ou um hidrogênio e R¹, R², R^a e R^b são como definido acima.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

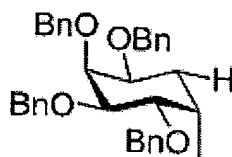
Grupos protetores vantajosos em X^p que podem ser usados para proteger X incluem grupos protetores bem conhecidos por pessoas versadas na arte da síntese de carboidratos, em particular para proteger grupos hidroxila isolados e grupos hidroxila adjacentes. Exemplos de grupos protetores são dados em *Protecting Groups* por P.J. Kocienski (Editor, Thieme Publishing Group, ISBN 3131356030), cujo teor é incorporado aqui por referência. Exemplos adicionais são dados em *Carbohydrate Chemistry* por Geert-Jan Boons (Editor, G. J. Boons, Publisher, Springer, ISBN 0751403962), cujo teor é incorporado aqui por referência.

Grupos protetores de OH particulares para X^p incluem

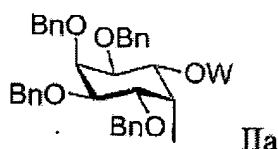
grupos bis-O-isopropilideno, bis-O-cicloexilideno, t-butildifenilsilila, alila e benzilóxi. A reação de desproteção pode ser realizada com ácido trifluoroacético em uma mistura de metanol:diclorometano à temperatura ambiente ao longo de vários dias. A desproteção pode envolver Pd/C na presença de gás de hidrogênio em metanol ou mistura de metanol/EtOAc. Onde o grupo X^P contém uma ligação O-P, a trietilamina também pode ser adicionada para formar o sal de amônio.

Grupos protetores vantajosos para R^P e R^{3p} incluem grupos O-benzila e em que R^P e R^{3p} formando em conjunto um grupo bis-O-isopropilideno.

Compostos de fórmula II, em que OR^P e R^{3p} são grupos O-benzila, R^2 é um grupo $C_{25}H_{51}$, e em que X^P é representado pela fórmula,

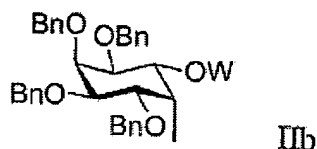


podem ser preparados por meio da redução de composto da fórmula IIa, sendo que X^P é



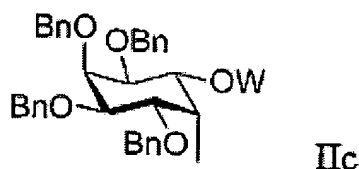
E onde OR^P e R^{3p} , grupos R^2 são definidos acima e onde grupo W é grupo éster fenoxitiocarbonila. A reação pode ser realizada com hidreto de tributil estanho, AIBN em tolueno aquecido em refluxo durante 4 horas.

Compostos de fórmula IIa podem ser preparados a partir de composto de fórmula IIb em que X^P é representado pela fórmula,



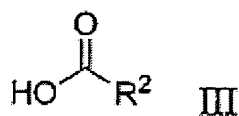
em que OR^P , R^{3p} , R^2 são definidos acima e W é um hidrogênio. A reação pode ser realizada com cloreto de fenoxitiocarbonila, piridina, DMAP e diclorometano à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Compostos de fórmula IIb podem ser preparados a partir de compostos de fórmula IIc em que X^P é representado pela fórmula,

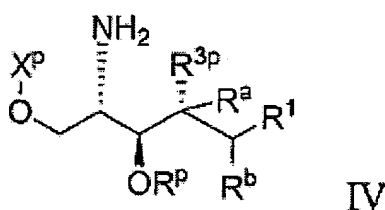


sendo que OR^P , R^{3p} , R^2 são definidos acima e W é grupo A11. A reação pode ser realizada com cloreto de tris(trifenilfosfino)rutênio (II), DBU, 90°C, 30 minutos seguido da adição de 1M de HCl/acetona.

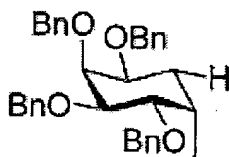
Compostos de fórmula II e IIc podem ser preparados reagindo-se compostos de fórmula III,



em que R^2 é definido acima, com um composto de fórmula IV,



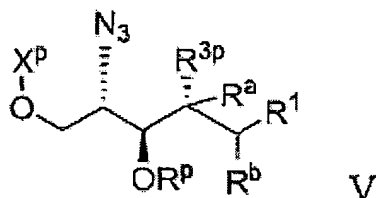
sendo que X^P , OR^P , R^{3p} , R^1 , R^a e R^b são definidos acima, desde que X^P não seja



, a reação pode ser realizada com EDC, HOBT, TEA em DMF a 45°C durante 24 horas.

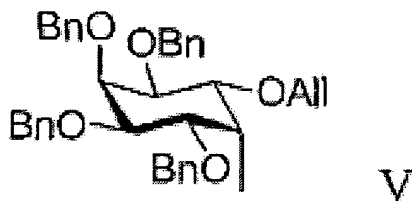
Compostos de fórmula III são obtíveis comercialmente ou podem ser preparados de materiais comerciais por meio de métodos convencionais *per se*.

Compostos de fórmula IV podem ser preparados reagindo-se compostos de fórmula V,

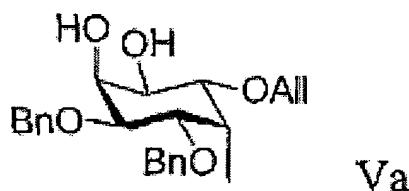


sendo que X^P , OR^P , R^{3p} , R^1 , R^a e R^b são definidos acima. A reação pode ser realizada com $LiAlH_4$ em éter a $0^\circ C$ aquecendo-se à temperatura ambiente ao longo de 1 hora.

Compostos de fórmula V, sendo que OR^P e R^{3p} são grupos benzilóxi e sendo que X^P é representado pela fórmula,

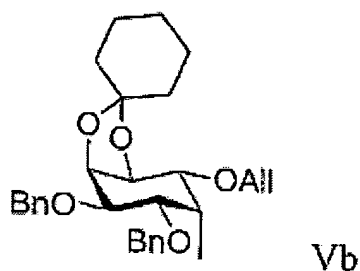


podem ser preparados por meio da proteção benzila a compostos de fórmula Va, sendo que OR^P e R^{3p} são definidos acima, e X^p é representado pelo grupo,



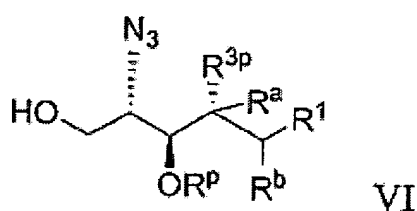
A reação pode ser realizada na presença de NaH , $BnBr$, DMF à temperatura ambiente durante 5 horas.

Compostos de fórmula Va podem ser preparados por meio da desproteção de composto de fórmula Vb, sendo que OR^P , R^{3p} são definidos acima e X^P é representado pelo grupo,



A reação pode ser realizada na presença de ácido clorídrico em uma mistura de tolueno/etanol,

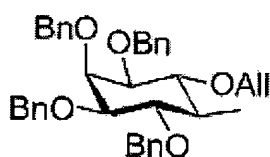
Compostos de fórmula V e Vb, podem ser preparados reagindo compostos de fórmula VI,



sendo que OR^P , R^{3p} , R^1 , R^a e R^b são definidos acima com um composto de fórmula VII,



e sendo que o grupo X^P é definido acima, exceto que o grupo X^P não é representado pela fórmula



A reação pode ser realizada na presença de hidreto de sódio em THF, a 0°C aquecendo à temperatura ambiente de um dia para o outro.

Compostos de fórmula VI são comercialmente obteníveis ou podem ser preparados de materiais comercialmente obteníveis por meio de métodos convencionais *per se*.

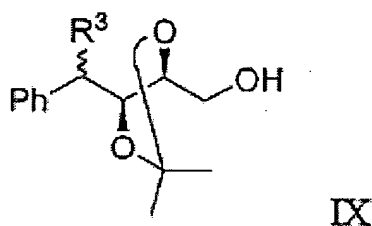
Compostos de fórmula VII podem ser preparados reagindo compostos de fórmula VIII,



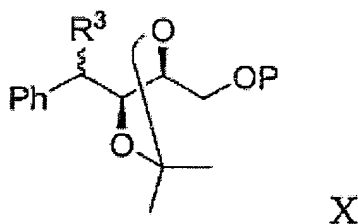
sendo que X^P é como definido acima com anidrido triflico em diclorometano e 2,6-di-t-butilpiridina.

Compostos de fórmula VIII são obteníveis comercialmente ou podem ser preparados a partir de materiais comercialmente obteníveis por meio de métodos convencionais *per se*.

Ou, alternativamente, compostos de fórmula VIII podem apresentar a forma de compostos da fórmula IX:

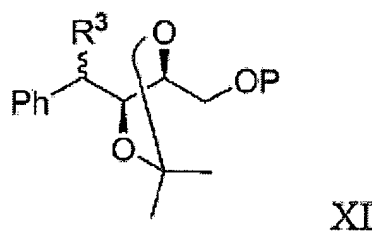


Sendo que R^3 é hidrogênio. Compostos de fórmula IX podem ser preparados desprotegendo-se compostos de fórmula X,



por meio de hidrogenação catalítica, sendo que o grupo R^3 é definido acima, e grupo protetor P é um grupo benzila. A reação pode ser realizada com 10% de Pd/C, H_2 , em MeOH/EtOAc (2:3) de um dia para o outro.

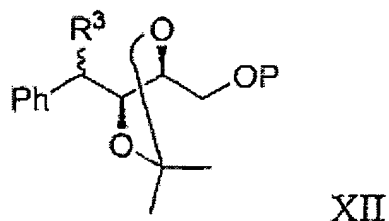
Compostos de fórmula X podem ser preparados a partir de compostos de fórmula XI,



sendo que P é definido acima e R^3 é um éster de fenoxitiocarbonila. A reação pode ser realizada com hidreto de tributil

estanho, AIBN em tolueno aquecido em refluxo durante 4 horas.

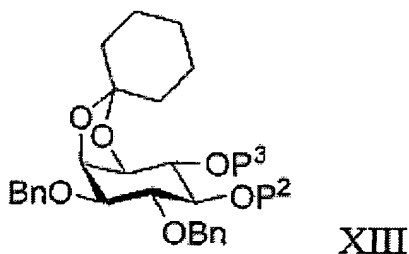
Compostos de fórmula XI podem ser preparados a partir do composto de fórmula XII,



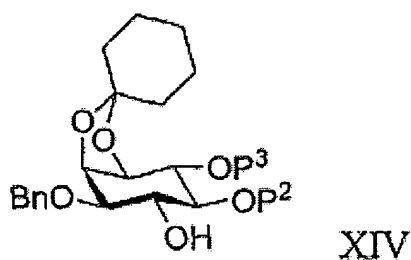
sendo que P é definido acima e R³ é um grupo hidroxila. A reação pode ser realizada com cloreto de fenoxitiocarbonila, piridina, DMAP e diclorometano à temperatura ambiente durante 30 minutos.

Compostos de fórmula XII são comercialmente obteníveis ou podem ser preparados a partir de materiais comercialmente obteníveis por meio de métodos convencionais *per se*.

Ou, também alternativamente, compostos de fórmula VIII, podem apresentar a forma de compostos da fórmula XIII,



Sendo que P² é um hidrogênio e P³ é, ou um grupo benzila ou um grupo A11. Compostos de fórmula XIII podem ser preparados por meio de proteção de compostos de fórmula XIV com um grupo benzila,

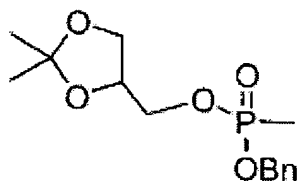


Sendo que P² e P³ é definido acima. A reação pode ser realizada com NaH, BnBr em tolueno aquecida em refluxo durante 10

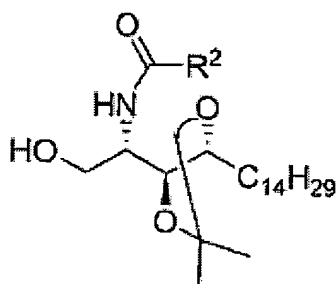
horas, seguido de separação de isômeros.

Compostos de fórmula XIV são comercialmente obteníveis ou podem ser preparados a partir de materiais comercialmente obteníveis por meio de métodos convencionais *per se*.

Compostos de fórmula II, sendo que R^2 é $C_{25}H_{51}$, OR^P e R^{3P} , em conjunto, formam um grupo protetor de bis-O-isopropilideno e X^P é representado pela fórmula,



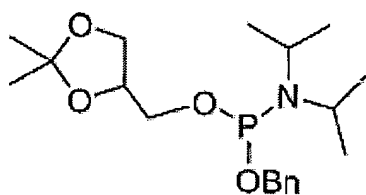
podem ser preparados reagindo-se compostos de fórmula XV,



XV

sendo que R^2 é definido acima, com compostos de fórmula

XVI

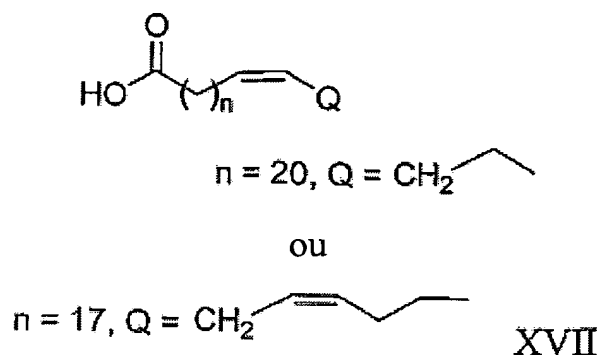


XVI

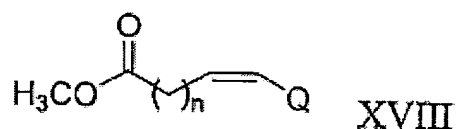
A reação pode ser realizada com tetrazol em diclorometano à temperatura ambiente durante 3 horas como um ativador, seguido de adição de t-BuOOH como um oxidante.

Compostos XV e XVI são comercialmente obteníveis ou podem ser preparados a partir de materiais comercialmente obteníveis por meio de métodos convencionais *per se*.

Compostos de fórmula III podem apresentar a forma de compostos da fórmula XVII

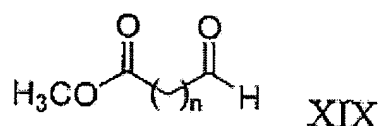


Compostos de fórmula XVII podem ser preparados a partir de compostos de XVIII, sendo que n e Q são definidos acima,



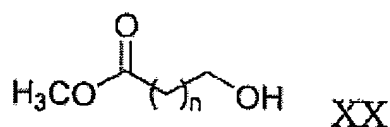
A reação pode ser realizada na presença de NaOH (em que n = 20) e LiOH (em que n = 17) aquecendo-se em refluxo em metanol durante 2 horas, seguido da adição de ácido.

Compostos de fórmula XVIII podem ser preparados a partir de compostos de XIX,



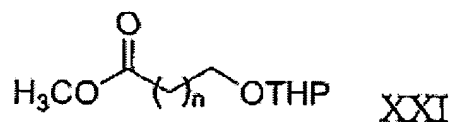
A reação pode ser realizada na presença de brometo de brometo de n-butiltrifenilfosfônio (em que n = 20), e brometo de heptenotriphenilfosfônio (em que n = 17), com bis(trimetilsilil)amida de sódio a -78°C de um dia para o outro.

Compostos de fórmula XIX podem ser preparados a partir de compostos de XX, sendo que n é definido acima



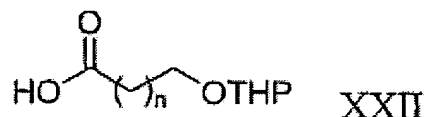
A reação pode ser realizada na presença DMP em diclorometano à temperatura ambiente durante de 3 a 4 horas.

Compostos de fórmula XX podem ser preparados a partir de compostos de XXI, sendo que n é definido acima



A reação pode ser realizada na presença de p-TSA em metanol durante de 3 a 4 horas.

Compostos de fórmula XXI podem ser preparados a partir de compostos de XXII, sendo que n é definido acima

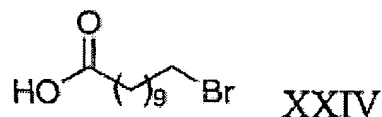


A reação pode ser realizada na presença de diazometano em THF ao longo de 4 horas a 0°C aquecendo-se à temperatura ambiente.

Compostos de fórmula XXII podem ser preparados a partir de compostos de XXIII, sendo que m = 9 (em que n = 20), e m = 6 (em que n = 17)

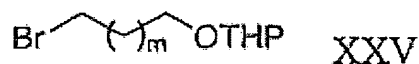


com um composto de fórmula XXIV



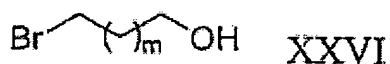
A reação pode ser realizada na presença de MeMgCl, Li₂CuCl₄ em THF a -20°C à temperatura ambiente ao longo de 16 horas.

Compostos de fórmula XXIII podem ser preparados a partir de compostos de XXV, sendo que m é definido acima



A reação pode ser realizada na presença de Mg, refluxo de THF durante 4 horas.

Compostos de fórmula XXV podem ser preparados a partir de compostos de XXVI, sendo que m é definido acima



A reação pode ser realizada na presença de 3,4-diidro-2H-pirano, PPTS.

Compostos XXIV e XXVI são comercialmente obteníveis ou podem ser preparados a partir de materiais comercialmente obteníveis por meio de métodos convencionais *per se*.

Sais farmacologicamente aceitáveis vantajosos dos compostos de fórmula I com bases vantajosas. Exemplos de referidos sais incluem sais de metal alcalino, p. ex., sódio e potássio, e metal alcalino terroso, p. ex., cálcio e magnésio.

O composto de fórmula I podem ser obtido em forma de um sal, vantajosamente um sal farmacologicamente aceitável.

Onde desejado, referidos sais podem ser convertidos às bases livres usando-se métodos convencionais. Sais farmacologicamente aceitáveis podem ser preparados reagindo-se o composto de fórmula I com um ácido ou base apropriada na presença de um solvente vantajoso.

Os compostos de fórmula I podem apresentar tautomerismo, eles também podem conter um ou mais átomos de carbono assimétricos e, portanto, podem apresentar óptico e/ou diastereoisomerismo. Diastereoisômeros podem ser separados usando-se técnicas convencionais, p. ex. cromatografia ou cristalização fracionada. Os vários isômeros ópticos podem ser isolados por meio de separação de uma mistura racêmica ou outra mistura dos compostos usando-se técnicas convencionais, p. ex. cristalização fracionada ou HPLC. Alternativamente, os desejados isômeros

ópticos podem ser preparados por meio de reação dos materiais de partida opticamente ativos apropriados em condições que não causam racemização. Nós preferimos particularmente compostos de fórmula I em que a estereoquímica a porção hidrofílica é análoga àquela encontrada na porção α -galactose de α -GalCer.

As condições para uma ocupação substancialmente plena de ambos os canais A' e C', como apresentado por α -GalCer encontram-se descritos detalhadamente em Koch *et al*, *Nature Immunology*, 6(8) 819 - 826 (2005). Em Koch *et al*, cavidades foram identificadas como superfícies acessíveis a moléculas de água (raio, 1,4 Å) mas não sondas maiores (raio, 6 Å) com o programa VOLUMES (R. Esnouf, *University of Oxford*, Oxford, UK). A natureza aberta dos bolsos na superfície de reconhecimento de TCR requereu imposição de uma definição auto-consistente para o limite exterior do bolso, e, com base nisto os autores calcularam os volumes do bolso para CD1d, CD1a e CD1b de camundongo, e também CD1d humana. Embora isto resultasse em algumas diferenças em valores absolutos daqueles reportados antes, observou-se as mesmas tendências relativas. Análise de complementaridade de forma foi realizada usando-se o programa SC (http://www.ccp4.ac.uk/ccp4i_main.html). Nós preferimos particularmente compostos de fórmula I que se ligam a CD1d humanas com uma boa complementaridade de forma, ou seja, com um S_c maior do que 0,50, mais preferivelmente maior que 0,55, particularmente maior do que 0,60.

A cadeia acila de 26 carbonos e a cadeia esfingosina de 18 carbonos de um α GalCer coube nos bolsos A' e C', respectivamente, com boa complementaridade de forma (S_c 0,61). O volume total destas cavidades (1,400 Å³) na fenda de ligação de CD1d humana é preenchida essencialmente com as cadeias de hidrocarboneto. A cadeia acila cabe no bolso A' adotando-se uma curva circular no sentido contrário ao dos

ponteiros do relógio como observado de acima da fenda de ligação, enchendo o bolso. A cadeia esfingosina adota uma conformação mais estreita para caber no bolso C' e termina na extremidade da fenda de ligação. Assim, é provável que α -GalCer apresente comprimentos de cadeia lipídica máximos que são capazes de caber na fenda de ligação de antígeno de CD1d humanas. Assim, nós preferimos que o comprimento de R² (a cadeia acila) não exceda 25 ligações simples carbono-carbono de comprimento e R¹ (a cadeia esfingosina) não exceda 13 ligações simples carbono-carbono de comprimento. A partir de estudos de ligação reportados na literatura, é de conhecimento geral que duplas ligações carbono-carbono podem ser substituídas por diversas das ligações simples carbono-carbono, desde que as porções hidrofóbicas ainda sejam capazes de ocupar as conformações necessárias para ligação com seus respectivos canais. Alguns estudos mostraram, por exemplo, que os canais são capazes de aceitar radicais hidrofóbicos relativamente volumosos, como fenila.

Nós preferimos compostos de fórmula I em que R¹ preenche pelo menos 35%, mais preferivelmente pelo menos 60%, ainda mais preferivelmente pelo menos 80% e, particularmente, pelo menos 90% do volume ocupado do canal C' como definido acima.

Prefere-se compostos de fórmula I em que R² preenche pelo menos 40%, mais preferivelmente pelo menos 50%, ainda mais preferivelmente pelo menos 60%, particularmente pelo menos 70% e, particularmente, pelo menos 80% do volume ocupado do canal A' como definido previamente.

A partir de estudos de difração de raios-X e experimentos de modelagem, parece que quando o grupo R² é mais curto do que o comprimento máximo preferido, o espaço remanescente pode ser ocupado por moléculas "espaçadoras" que ocorrem naturalmente no corpo e que são suficientemente disponíveis para ocupar espaços vazios na molécula de

CD1d. Referidas moléculas espaçadoras são lipídeos, e análogos. Em virtude disto, compostos de fórmula 1 em que R^2 é um tanto menor do que o necessário para ocupação máxima do canal A' ainda se ligarão bem à molécula de CD1d.

De preferência, R^2 tem um comprimento de pelo menos uma unidade de carbono (i.e. metila), mais preferivelmente pelo menos 5 unidades de carbono de comprimento e, particularmente, pelo menos 8 unidades de carbono de comprimento. Nós preferimos compostos de fórmula 1 em que R^2 representa uma cadeia de hidrocarboneto linear saturada ou insaturada contendo de 1 a 25, mais preferivelmente 5 a 25 e, particularmente, 8 a 25 átomos de carbono.

Parece que a ligação da cadeia esfingosina é mais dependente da proporção de ocupação do canal C', do que a ligação da cadeia acila ao canal A', pelo fato de que a ocupação deste canal por moléculas espaçadoras ainda não foi, que o saibam os inventores, observada até aqui. Assim, R^1 tem, de preferência, pelo menos 5 ligações simples carbono-carbono de comprimento, mais preferivelmente pelo menos 11 ligações simples carbono-carbono de comprimento e, particularmente, 12 ou 13 ligações simples carbono-carbono de comprimento.

Prefere-se compostos de fórmula I, sendo que um ou ambos de R^1 ou R^2 contém uma ou mais duplas ligações. Nós preferimos particularmente aqueles compostos em que um ou ambos de R^1 ou R^2 contém uma, duas ou três duplas ligações. Nós preferimos aqueles compostos em que R^2 contém duplas ligações.

Prefere-se aqueles compostos em que as duplas ligações são *cis* (Z).

Prefere-se aqueles compostos em que X representa $\text{CHA}(\text{CHOH})_n\text{CHB}_1\text{B}_2$.

Prefere-se compostos de fórmula I em que X representa $\text{CH}_2(\text{CHOH})_n\text{CHB}_1\text{B}_2$.

Prefere-se compostos de fórmula I em que n representa 1, 2 ou 3, especificamente 2.

Prefere-se compostos de fórmula I e em que n representa 2 que se encontra na configuração *treo*, em oposição à configuração *erito*.

Prefere-se compostos de fórmula I em que R^3 representa hidrogênio.

Prefere-se compostos de fórmula I em que R^a e R representam, ambos, hidrogênio.

Prefere-se compostos de fórmula I em que um de B_1 e B_2 representa hidrogênio e o outro representa hidroxila.

Prefere-se compostos de fórmula I em que m representa 1

Prefere-se compostos de fórmula I em que Y representa CH_2OH , CH_2PH ou $\text{C}(\text{OH})(\text{Ph})$. Nós preferimos particularmente compostos em que Y representa CH_2OH .

Prefere-se também compostos de fórmula I em que n representa 4, e em que A e B^1 e B^2 formam, em conjunto, uma ligação simples e o outro de B^1 e B^2 é OH ou OSO_3H .

A capacidade dos compostos de fórmula I de modular respostas imunes específicas para antígeno permite que os compostos sejam úteis na terapia do câncer, vacinas preventivas e terapêuticas, alergias e doenças auto-imunes.

De acordo com a invenção proporciona-se também um composto de fórmula I para uso como um medicamento.

De acordo com a invenção proporciona-se também um método de proteger um sujeito mamífero contra, ou de tratar, um vírus, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma que compreende administrar ao sujeito uma quantidade

farmaceuticamente efetiva de um composto de acordo com a invenção que apresenta atividade farmacêutica contra, ou de tratar, um vírus do tipo referido, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma.

De acordo com a invenção nós também proporcionamos o uso de compostos de fórmula I e seus sais na preparação de um medicamento para o tratamento ou profilaxia de um vírus, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma. Em particular, os compostos de fórmula I podem ser usados no tratamento ou profilaxia das doenças a seguir:

Cânceres: Por exemplo Carcinoma de Células Basais, Câncer de Mama

Leucemia, Linfoma de Burkitt, Câncer do Colo, Câncer do Esôfago, Câncer da Bexiga, Câncer Gástrico, Câncer da Cabeça e Pescoço, Câncer Hepatocelular, Linfoma de Hodgkin, Leucemia de Células Peludas, Tumor de Wilms, Câncer da Tireóide, Timoma e Carcinoma Tímico, Câncer Testicular, Linfoma de Células T, Câncer da Próstata, Câncer do Pulmão de Células não-Pequenas, Câncer do Fígado, Câncer de Células Renais, e Melanoma.

Infecções virais que podem ser mencionadas incluem:

Hepatite Viral, por exemplo, HBV, HCV;

Infecção por herpes vírus, por exemplo, vírus Herpes simplex.

Outros vírus trópicos da pele, como vírus do papiloma humano.

Vírus trópicos do pulmão, como vírus da influenza ou vírus sincicial respiratório.

Infecções virais crônicas ou agudas com HIV, EBV ou CMV ou combinações de infecções virais ou infecções virais e bacterianas.

Infecções bacterianas do pulmão com, por exemplo, *Haemophilus influenzae* ou micobactérias, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis* e infecções bacterianas do intestino, por exemplo, *Helicobacter pylori* ou o *Staphylococcus aureus* similar à pele.

Asma, asma induzida com alérgeno, dermatite de contato, psoríase, doença de Crohn.

Mais particularmente, doenças que podem ser tratadas com compostos de fórmula I são [infecção por] vírus, infecção microbiana, parasita, câncer.

Os compostos de fórmula I podem ser usados sozinho ou em combinação com outros agentes terapêuticos. Combinações com outros agentes terapêuticos incluem:

Moduladores imunes, como anticorpo anti CD40/CD40L, anticorpo bloqueador de anti-CTLA-4 ou moduladores imunes baseados em LAG3 solúvel, agonistas de receptor similar a *Toll*, como MPL, CpG, RNA de filamento simples, nucleotídeos, análogos de nucleotídeos, como CL087 ou loxoribina, ácido poliinosina-policitidílico, flagelina, resiquimod ou immiquimod, gardiquimod entre outros. Ligantes NOD, como dipeptídeo de Muramila, Murabutida ou Peptidoglicano, dipeptídeo de Muramila entre outros. Anti-virais, como fosfato de oseltamivir, antifúngicos, como Anfotericina B e antibióticos. Anticorpos antivirais, como palivizumab.

Outras combinações úteis incluem outros terapáicos imunes para câncer, como herceptina, alemtuzumab, gemtuzumab, rituximab, ibritumomab tiuxetano e outros tratamentos de câncer à base de anticorpos monoclonais. Agentes quimioterápicos, inibidores de quinase, como Imatinib ou Erlotinib ou agentes citotóxicos, como ciclofosfamida. Anti-asmáticos e anti-histaminas e drogas antiinflamatórias também poderiam ser usados em combinação. Outras combinações potenciais incluem

adjuvantes de vacina, como *partículas similares a vírus (VLPs, virus-like particles)*, liposomas, e células apresentadoras de antígenos artificiais. Pode ser usado como um aditivo na terapia de células vivas, por exemplo, imunoterapia baseada em DC. Outras combinações potenciais incluem anticorpos bloqueadores de citocina ou quimiocina, como infliximab, Adalimumab e basiliximab.

Proporcionou-se também uma composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com a invenção em mistura com um excipiente, carreador ou adjuvante farmacêuticamente aceitável. Referidas formulações são geralmente bem conhecidas pela pessoa versada na arte e podem ser análogas às aquelas descritas nas EP 0 609 437B, EP-A-1 437 358 e WO 2004/028475, cujos teores são incorporados aqui por referência.

Composições em uma forma vantajosa para administração tópica no pulmão incluem aerossóis, p. ex. composições em pó pressurizadas ou não-pressurizadas;

Composições em uma forma vantajosa para administração esofagal incluem tabletes, cápsulas e drágeas;

Composições em uma forma vantajosa para administração na pele incluem cremes, p. ex. emulsões óleo-em-água ou emulsões água-em-óleo;

Composições em uma forma vantajosa para administração intravenosa incluem injeções e infusões; e composições em uma forma vantajosa para administração no olho incluem gotas e unguentos.

De acordo com a invenção proporciona-se também uma composição farmacêutica compreendendo, de preferência, menos de 80% e mais preferivelmente menos de 50% em peso de um composto de fórmula I ou um derivado farmacêuticamente aceitável do mesmo, em mistura com um diluente ou carreador farmacêuticamente aceitável.

Exemplos de referidos diluentes e carreadores são: para tabletes e drágeas - lactose, amido, talco, ácido esteárico; para cápsulas - ácido tartárico ou lactose; e para soluções injetáveis - água, alcoóis, glicerina, óleo vegetais.

Quando o composto de fórmula I for administrado no pulmão ele pode ser inalado como um pó que pode ser pressurizado ou não-pressurizado. Composições de pó pressurizado dos compostos de fórmula I podem conter um propelente de gás liquefeito ou um gás comprimido. Em composições de pó não-pressurizado o ingrediente ativo em forma finamente dividida pode ser usado em mistura com um carreador farmacologicamente aceitável de maior tamanho compreendendo partículas com até, por exemplo, 100 μm de diâmetro.

Carreadores inertes vantajosos incluem, p. ex., lactose cristalina.

Para os usos mencionados acima, as doses administradas variarão evidentemente com o composto empregado, o modo de administração e o tratamento desejado. No entanto, em geral, obtém-se resultados satisfatórios quando o composto de fórmula I é administrado em dosagem diária de cerca de 1 μg a cerca de 20 mg por kg de peso corporal animal, de preferência, dada em doses divididas de 1 a 4 vezes por dia ou em forma de liberação sustentada.

Para o Homem, a dose diária total situa-se na faixa de 70 μg a 1.400 mg e formas de dosagem unitária vantajosas para administração compreendem de 20 mg a 1.400 mg do composto misturado com um diluente ou carreador farmacêutico sólido ou líquido.

Os compostos de fórmula I apresentam a vantagem de que são menos tóxicos, mais eficazes, têm ação mais prolongada, possuem maior faixa de atividade, são mais potentes, produzem menos efeitos colaterais, são mais facilmente absorvidos ou possuem outras propriedades

farmacológicas úteis, do que compostos com estrutura similar, por exemplo GalCer.

Vários dos análogos da presente invenção apresentaram excelente atividade imunomoduladora conforme evidenciado pelo fato de que (a) análogos atuaram como imunoestimuladores ou adjuvantes quando injetados em camundongos juntamente com antígenos como evidenciado pela geração de respostas IgG específicas para antígeno, ou respostas de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos para antígeno, ou como evidenciado pela proteção de camundongos contra a morte quando se injetou análogos como monoterapia em animais, tanto em modelos protetores e estabelecidos de crescimento de tumor.

Adicionalmente, análogos atuaram como imunostimulantes quando injetados como monoterapia em camundongos, como evidenciado pela indução de respostas de IL-12, ou como evidenciado pela proteção de camundongos contra perda de peso e/ou morte em modelos estabelecidos de infecção por influenza.

Adicionalmente, análogos atuaram como imunostimulantes ou adjuvantes quando adicionados a amostras de linfócitos do sangue periférico humano (TBLs', *human peripheral blood lymphocytes*) como evidenciado pela indução de marcadores de maturação de células dendríticas em referidas amostras de PBL, ou quando adicionados a amostras de PBLs humanos que foram pulsados com a adição do peptídeo MelanA26-35 imunogênico conhecido, ELAGIGILTV (SEQ ID NO: 1), como evidenciado pela indução de células T CD8⁺ que foram específicas para o peptídeo MelanA26-35 alvo.

É importante observar que muitos análogos de α Gal-Cer do estado da técnica induzem respostas tão fortes de citocina de NKT *in vivo* que células NKT são levadas a um estado não-responsivo e tornam-se refratárias a imunoestimulação adicional, ver, Parekh *et al.*, *J. Clin. Invest.*,

115:2572-2583 (2005).

Em contraste a compostos do estado da técnica, determinados análogos da presente invenção são indutores altamente efetivos da maturação de células dendríticas humanas, ao mesmo tempo que produzem respostas de citocinas de NKT meramente limitadas em células NKT humanas, em comparação com α Gal-Cer. Referida separação de estimulação de células dendríticas e conseqüente maturação na ausência de secreção de citocina de NKT é um aspecto único da presente invenção.

Antecipa-se que este aspecto único e inédito permite estimulação repetida de células dendríticas sem exaustão ou depleção da população de células NKT após administração de compostos da presente invenção.

Nos exemplos a seguir descreve-se moléculas novas, juntamente com métodos para sua síntese. Estes exemplos são seguidos mostrando-se as propriedades imunomoduladoras destas moléculas.

A estimulação referida acima pode proporcionar proteção contra condições em que é desejável que o sistema imunológico responda efetivamente, como doença infecciosa ou câncer.

Adicionalmente, compostos da invenção podem ser usados em combinação com ligantes de TLR, como poli LC (TLR3), MPL (TLR4), imiquimod (TLR7), R848 (TLR8) ou CpG (TLR9) para produzir uma estimulação imune incrementada e proteção resultante de condições em que é desejável que o sistema imunológico responda efetivamente, como doença infecciosa ou câncer.

Compostos da invenção também podem ser usados como imuno-estimulantes ou adjuvantes em uso combinado com materiais de antígeno, como, sem limitação, proteínas, peptídios, ou ácidos nucleicos etc. para produzir respostas imunes protetoras, como uma resposta de anticorpo de IgG e células B, ao antígeno administrado.

Compostos da invenção também podem ser usados como imunostimulantes ou adjuvantes em uso combinado com materiais de antígeno, como, sem limitação, proteínas, peptídios, ou ácidos nucleicos etc. para produzir respostas imunes protetoras, como uma resposta de CTL ou células T ao antígeno administrado.

Referidos materiais de antígeno poderiam ser quaisquer materiais vantajosos para prevenção ou terapia daquela doença particular. Especificamente com relação ao câncer, exemplos de antígenos de proteína e peptídio associados com tumor que podem ser administrados para induzir ou incrementar uma resposta imune são derivados de genes associados com tumor e proteínas codificadas, incluindo MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-A13, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, BAGE-1, RAGE-1, LB33/MUM-1, PRAME, NAG, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), tirosinase, glicogênio fosforilase de cérebro, Melan-A, MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1, LAGE-1, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 e CT-7. Por exemplo, peptídios antigênicos característicos de tumores incluem aqueles listados no pedido PCT publicado WO00/20581 (PCT/US99/21230).

Os compostos da invenção são eficazes tanto *in vitro* como *in vivo*, e tanto em camundongos como em humanos, como se mostrou. Assim, um aspecto da invenção refere-se a estimular uma resposta imune em um sujeito, por meio de administração de um ou mais dos compostos da invenção com ou sem uma molécula antigênica, numa quantidade suficiente para estimular uma resposta imune favorável em referidos sujeito.

Está claro que composições e ou kits, compreendendo um

ou mais dos derivados da invenção, em conjunto com um ou mais peptídios ou proteínas (como composições), ou como porções separadas de derivado e proteína ou peptídio, (como kits), são outra característica da invenção.

Outras facetas da invenção estarão claras para a pessoa versada e não precisam ser reiteradas aqui.

Há dois parâmetros principais que determinam a ativação de células NKT por seu ligante CD1d,

1) A afinidade do TCR de *i*NKT a CD1d (amplamente determinado pela natureza do ligante ligado a CD1d).

2) A estabilidade do complexo de CD1d (determinado pela natureza do ligante ligado a CD1d).

Análises estruturais, cinéticas e funcionais combinadas da ligação de TCR solúvel a complexos CD1d-lipídeo e ativação de células NKT invariáveis (*i*NKT) forneceram compreensões importantes sobre a identificação ótima de agonistas de células *i*NKT para uso clínico. O objetivo destes estudos consistiu em identificar agonistas de células *i*NKT que, diferentemente de α -Galactosilceramida (α -GalCer), foram capazes de preencher 3 critérios: a) capacidade de induzir ativação de células *i*NKT, sem super-estimulação de células *i*NKT para minimizar tempestade de citocinas e lise de células dendríticas (DC, *Dendritic Cells*) dependente de células *i*NKT; b) capacidade de assegurar maturação de DC c) capacidade de assegurar preparação ótima de células T específicas para antígeno.

O conhecimento derivado da estrutura de TCRs específicos para CD1d- α -GalCer (Gadola, Koch *et al*, *J Exp Med*, 2006, 203; 699-710) e da estrutura de moléculas CD1d humanas vazias e carregadas com α -GalCer (Koch, Strange *et al*, *Nat Immunol*, 2005, 6; 819-26) suscitaram-nos a realizar uma série de experimentos cinéticos e funcionais para avaliar o papel da cabeça polar e o comprimento e saturação de cadeias alquila de α -GalCer no controle da taxa de dissociação de lipídeos ligados a

moléculas CD1d, e a afinidade de ligação de TCR específico para lipídeo.

Para tratar destas questões, nós manipulamos dois reagentes:

i) Um TCR solúvel de um clone de célula *i*NKT e ii) um anticorpo específico para complexo CD1d- α -GalCer. Usando estes dois reagentes nós realizamos estudos cinéticos e funcionais combinados para comparar a afinidade da ligação de TCR de *i*NKT a moléculas CD1d humanas carregadas com α -GalCer ou seus análogos com cadeias esfingosina e acila truncadas ou cabeças polares modificadas.

Papel do comprimento de lipídeos no controle da estabilidade de complexos CD1d/lipídeo *i*NKT e na modulação da afinidade de ligação de TCR ao complexo CD1d-lipídeo.

Foram redobrados *in vitro* monômeros de CD1d reduzidos e biotinizados, e carregamos os mesmos com uma faixa de análogos de α -GalCer com cadeias esfingosina ou acila truncadas. Em seguida, nós analisamos independentemente a taxa de dissociação dos análogos de moléculas de CD1d e a afinidade de ligação a um TCR de *i*NKT solúvel.

Foram testados α -GalCer e (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-N-tetracosanoil-2-amino-1,3,4-nonanotriol (referido a seguir como OCH), que apresenta uma cadeia esfingosina mais curta do que α -GalCer e que apresentou previamente ligação com moléculas CD1d de camundongo com uma meia-vida menor, resultando numa ativação mais fraca de células *i*NKT de camundongo (Miyamoto, Miyake *et al*, *Nature*, 2001, 413; 531-4, Old, Chiba *et al*, *J Clin Invest*, 2004, 113; 1631-40).

Para medir a taxa de dissociação de moléculas CD1d, nós geramos, por meio de biblioteca de apresentação de fago, um anticorpo Fab específico para moléculas CD1d carregado com α -GalCer (referido a seguir como 9B Fab), medições iniciais Biacore e manchamento com FACS de células C1R-CD1d pulsadas com lipídeo demonstraram que o Fab 9B reconheceu especificamente moléculas CD1d humanas carregadas com

todos os compostos testados, embora falhasse em manchar células C1R-CD1d impulsadas (dados não mostrados). Usando o Fab 9B nós verificamos a taxa de dissociação de todos os compostos testados de moléculas CD1d humanas solúveis usando ressonância do plasmon de superfície. Complexos de CD1d-lipídeo biotinilados foram imobilizados sobre cavacos [*chips*] revestidos com estreptavidina e mediu-se ao longo do tempo o nível de ligação do Fab 9B. A perda de ligação do anticorpo ao longo do tempo foi usada para determinar a taxa de dissociação de lipídeo de moléculas CD1d.

Resultados: OCH apresentou uma taxa de dissociação 3,9 vezes mais rápida do que α -GalCer, respectivamente (Fig. 1). Estes resultados foram consistentes com dados previamente publicados, demonstrando que a estabilidade de glicolipídeos ligados a moléculas CD1d depende do comprimento das cadeias alquila (Old, Chiba *et al*, *J Clin Invest*, 2004, 113; 1631-40).

Foi avaliado então se o comprimento das cadeias acila e esfingosina poderia afetar a afinidade da ligação de TCR de *i*NKT ao complexo glicolipídeo-CD1d. Nós redobramos cadeias V α 24 e V β 11 do TCR de *i*NKT como previamente descrito (Gadola, Koch *et al*, *J Exp Med*, 2006, 203; 699-710) e usamos o TCR de *i*NKT purificado e redobrado em estudos de ressonância do plasmon de superfície contra monômeros de CD1d biotinilados imobilizados carregados com α -GalCer ou OCH. Os resultados destes experimentos demonstraram que um aumento do comprimento da cadeia esfingosina correlacionou-se com um aumento da afinidade de ligação de TCR, sugerindo que uma redução do comprimento da cadeia de lipídeo afeta negativamente a afinidade de ligação de TCR a complexos lipídeo-CD1d (Fig. 2).

Conclusões: A estrutura cristalina de CD1d humanas-GalCer demonstrou que α -GalCer explora totalmente a capacidade de

ligação de CD1d. Usando ressonância do plasmon de superfície, nós verificamos que: i) encurtamento de qualquer uma das cadeias alquila reduziu significativamente a estabilidade de complexos CD1d/lipídeo (Fig. 1 e dados não mostrados); ii) encurtamento da cadeia esfingosina de α -GalCer reduz a afinidade de TCR de células *i*NKT em 100 vezes (Fig. 2), resultando em alterações na sinapse imunológica de células *i*NKT, polarização de grânulos citotóxicos de células *i*NKT e ativação de células *i*NKT (dados não mostrados). Em contraste, variações do comprimento ou a saturação da cadeia acila não altera afinidade de TCR de células *i*NKT (dados não mostrados). Análise de estruturas previamente reportadas de moléculas CD1d humanas vazias e carregadas sugere que a ocupação incompleta da fenda de ligação por uma cadeia esfingosina encurtada poderia resultar em diferenças conformacionais na superfície de reconhecimento do TCR. Este efeito indireto proporciona um mecanismo geral por meio do qual o comprimento da cadeia lipídica que ocupa o canal C' de CD1d desempenha um papel no controle da afinidade de células T restritas a CD1d específicas para lipídeo.

A modulação observada da afinidade de ligação de TCR do complexo OCH/CD1d é obtida, portanto, ao custo de maior instabilidade do complexo CD1d lipídeo, causada pela cadeia esfingosina encurtada. Como agonistas de células NKT com cadeias esfingosina mais curtas apresentarão uma menor duração de vida *in vivo*, nós objetivamos definir uma nova família de compostos capazes de se ligarem com alta afinidade a CD1d. Referida nova classe de moléculas poderia dotar-nos com uma oportunidade de realizar o ajuste fino da faixa de afinidade de ligação entre o TCR de NKT e os complexos CD1d/lipídeo.

Modificação da cabeça polar.

i. Derivados de glicerol ceramida

Afinidade menor do TCR invariante por análogos de α -

GalCer.

Para caracterizar a afinidade de análogos de α -GalCer, gerou-se monômeros de hCD1d biotinilados usando protocolos previamente descritos (Karadimitris, Gadola *et al*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98; 3294-8) ligados aos diferentes análogos. Realizou-se análise de ressonância de plasmon de superfície (Biacore) usando um TCR de $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ invariante humano ligado a dissulfeto solúvel (Gadola, Koch *et al*, *J Exp Med*, 2006, 203; 699-710) para medir as constantes de dissociação em equilíbrio (K_d) da ligação do TCR aos diferentes monômeros (Fig. 3).

A K_d da ligação de TCR ao monômero contendo α -GalCer foi de 1,29 μ M, enquanto que aquela da treitolceramida foi [afinidade] menor a 5,78 μ M. A ligação do TCR aos monômeros de treitolamina 4S e 4R foi ligeiramente maior do que a treitolamina não-modificada a 3,84 μ M e 4,25 μ M respectivamente.

Diferenças na medição cinética da taxa de dissociação (K_{off}) entre o TCR e os diferentes monômeros apresentaram magnitude similar entre os análogos como nos estudos de equilíbrio (Fig. 3) com 0,37s⁻¹ para α -GalCer e 0,506 e 0,650s⁻¹ para os derivados de treitolceramida 4R e 4S respectivamente. A K_{off} mais rápida dos testados foi com o análogo de treitolceramida não modificado a 1,04s⁻¹ indicativo de uma menor interação de afinidade. É tentador especular que a diferença de afinidade observada entre as variantes 4S e 4R tenha se devido à maior estabilidade do grupo principal de fenil-treitol interagindo com o TCR. Estes dados sugerem que a estrutura previamente gerada pode ser útil no projeto racional de análogos de ligação de CD1d que podem apresentar diferentes propriedades a α -GalCer.

Em um esforço para identificar os radicais mínimos necessários para estimular células *i*NKT, nós decidimos gerar uma família

de compostos que conservam alta afinidade por moléculas CD1d (i.e. com máximo comprimento de ambas as cadeias alquila), e contendo, ou um 3-carbono i.e. grupo principal emulando glicerol), um 4-carbono (i.e. grupo principal emulando treitol, referido a seguir como treitol-ceramida) ou um 5-carbono (i.e. grupo principal emulando arabinitol).

DC humanas imaturas foram cultivadas na presença de um clone de células *i*NKT humanas com ou sem análogos ou carreador em diferentes concentrações. Após 24 horas, DC foram analisadas por meio de citometria de fluxo para a regulação para cima de diferentes marcadores de maturação, α -GalCer induziu significativa regulação para cima de todos os marcadores examinados (CD83, CD86 e CD38) (Fig 4 e dados não-publicados). Em cada caso, o grau de maturação observado com um análogo foi reduzido em comparação com α -GalCer. Treitolceramida foi mais potente do que glicerolceramida e arabinitolceramida, enquanto que modificações nas variantes fenila 4R-treitolceramida e 4S-treitolceramida não parecem ter afetado sua função. É interessante observar que a arabinitolceramida pareceu ser apenas fracamente funcional neste sistema, que pode ser significativa e indica o grau de interação necessário para estimulação através do TCR invariante humano.

Liberação de IL-12p40 (e p75 bioativo) por DC é um marcador de ativação e considera-se que desempenha um papel importante na regulação do perfil da resposta imune gerada em resposta a estas DC (Trinchieri *et al*, *Nat Rev Immunol*, 2003, 3; 133-46). IL-12p40 foi medido a partir dos sobrenadantes das culturas mistas e a concentração de IL-12p40 liberada (Fig. 4B) refletiu as respostas de maturação previamente descritas (Fig. 4A). α -GalCer induziu níveis significativos de IL-12p40, enquanto que treitolceramida e glicerolceramida induziu aproximadamente 50% do nível observado na presença de α -GalCer. Ambas, treitolceramida 4R e 4S, induziram uma resposta menos potente, enquanto que se detectou pouca IL-

12p40 na presença de arabinitolceramida.

Obteve-se respostas similares quando se examinou a ativação de células *i*NKT. A liberação de IFN- γ pelas células *i*NKT em resposta à estimulação por análogos apresentados por DC induziu aproximadamente 40 ng/ml de IFN- γ na presença de α -GalCer, 20 ng/ml com treitolceramida e glicerolceramida e não se detectou qualquer IFN γ detectável quando se adicionou arabinitolceramida à cultura (Fig. 4C).

A partir destes ensaios verificou-se que treitolceramida é um análogo de α -GalCer potente, com menor afinidade. Para comparar as funções de α -GalCer com alta afinidade, treitolceramida com afinidade intermediária, com o conhecido análogo de OCH com baixa afinidade, os três compostos foram titulados sobre DC e usados para apresentar [] a células *i*NKT. A maturação de DC e a viabilidade de DC foram examinadas após 48 horas. Embora α -GalCer induzisse máxima maturação de DC mesmo a 0,8 ng/ml, em comparação com 67 ng/ml para treitolceramida ou OCH, nas mesmas concentrações (Fig. 4D), apenas 10% de DC ainda se mostravam viáveis quando estimulava com α -GalCer, enquanto que uma proporção significativamente maior de DC foi negativa para iodeto de propídio quando se usou qualquer um dos análogos (Fig 4E). Estes dados mostram que treitolceramida pode induzir boas respostas funcionais de células *i*NKT *in vitro*, enquanto mantém significativa viabilidade de DC em comparação com α -GalCer.

Estes dados sugerem que análogos de α -GalCer com menor afinidade podem estimular maturação potente de DC dependente de células *i*NKT sem a significativa eliminação observada com α -GalCer. Diferentemente de OCH, treitolceramida deveria ter a mesma afinidade de ligação por CD1d que a esfingosina e cadeias acila são idênticas àquelas em α -GalCer.

Os experimentos a seguir exemplificam adicionalmente usos

potenciais desta nova classe de ligantes de CD1d:

A estimulação de células NKT com α -GalCer no contexto de CD1d induz rapidamente liberação de níveis significativos de uma quantidade de citocinas, incluindo IFN- γ e IL-4 (Burdin, Brossay *et al*, *J Immunol*, 1998, 161; 3271-81), IL-3 e GM-CSF (Leite-de-Moraes, Lisbonne *et al*, *Eur J Immunol*, 2002, 32; 1897-904) com outros tipos de células a jusante incluindo ativação de DC (Kitamura, Iwakabe *et al*, *J Exp Med*, 1999, 189; 1121-8) e células NK (Carnaud, Lee *et al*, *J Immunol*, 1999, 163; 4647-50). Mostrou-se que análogos, como OCH (Miyamoto, Miyake *et al*, *Nature*, 2001, 413; 531-4) e 20:2 (Yu, Im *et al*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102; 3383-8) induzem uma resposta de citocina modificada, com liberação de IL-4 mas com pouca ou nenhuma IFN- γ . Injeção de glicerolceramida em camundongos de tipo selvagem não induziu qualquer liberação detectável de citocina (Fig 5. B e C) como seria de se esperar pela falta de DC dependentes de células iNKT (Fig. 5A). No entanto, quando se injetou treitolceramida ou arabintolceramida, IL-4 (Fig. 4B), IFN- γ (Fig. 5C) e IL-12p40/70 (dados não mostrados) foram detectadas no soro com um decurso similar àquele observado com α -GalCer. Ambos os compostos foram menos potentes do que α -GalCer em doses equivalentes. Nenhum composto mostrou uma resposta enviesada de citocina Th2 como observado com OCH (Miyamoto, Miyake *et al*, *Nature*, 2001, 413; 531-4, Silk, Hermans *et al*, *J Clin Invest*, 2004, 114; 1800-11).

Função adjuvante de análogos de α -GalCer induz efetivas respostas de células T específicas para tumor, *in vivo*.

Previamente, nós e outros mostramos que a co-injeção de antígenos modelo, como OVA (Silk, Hermans *et al*, *J Clin Invest*, 2004, 114; 1800-11, Fujii, Shimizu *et al*, *J Exp Med*, 2003, 198; 267-79, Hermans, Silk *et al*, *J Immunol*, 2003, 171; 5140-7) e β -galactosidase (Silk, Hermans *et al*, *J Clin Invest*, 2004, 114; 1800-11) em conjunto com α -

GalCer induz respostas incrementadas de células B e células T CD8⁺, CD4⁺. Estas foram efetivas para terapia contra células de tumor expressando o antígeno-alvo. Os diversos análogos foram co-injetados com OVA em camundongos de tipo selvagem, e 6 dias mais tarde examinou-se o sangue quanto à presença de células T CD8⁺ específicas para antígeno usando tetrâmeros K^b-SIINFEKL fluorescentes. Ambas, arabintolceramida e treitolceramida, induziram uma significativa resposta de células T CD8⁺ após 6 dias, embora de forma menos potente do que α -GalCer, enquanto que glicerolceramida não o fez (Fig. 6A). Soros dos camundongos foram examinados quanto à presença de anticorpos específicos para OVA usando-se ELISA e isto mostrou respostas de ordem de classificação similar às aquelas observadas com células T CD8⁺ (Fig. 7B e 7C).

Respostas de células B

Análogos não-glicolipídicos de α -GalCer estimulam maturação de células B na presença de células *i*NKT *in vivo* e subsequente produção de anticorpos. (A) camundongos C57BL/6 ou *i*NKT^{-/-} receberam injeções i.v. com 1 μ g de carreador, α -GalCer, análogo ou 25 μ g de MPL. Vinte horas após a injeção esplenócitos foram manchados com anticorpos contra B220 e CD86 e analisados por meio de citometria de fluxo. A maturação foi avaliada por meio da regulação para cima de CD86 na superfície da célula, direcionando em células B (B220⁺) (Fig 7 A). Indica-se a intensidade de fluorescência média para cada histograma. (B) administração simultânea de 1 μ g de α -GalCer ou análogos e 400 μ g de OVA induz significativas IgGs específicas para OVA. Camundongos foram sangrados de 11 a 14 dias após a administração e o soro foi testado quanto a anticorpos por meio de ELISA (Fig 7 B).

Preparação de repostas de células T específicas para antígeno usando modelo de preparação humano *in vitro*.

Experimentos realizados com linfócitos do sangue periférico

humano demonstraram que treitol-ceramida é superior à glicerol-ceramida na expansão de respostas de células T específicas para Melan-A₂₆₋₃₅. (Fig 8)

II. Análogos de derivado de inositol de α -GalCer

Subseqüentemente gerou-se um novo grupo de análogos inéditos de α -GalCer. O primeiro foi uma inositolceramida com uma cadeia de ácido graxo de 25 carbonos (INOC-25). INOC-25 induziu maturação detectável de DC e produção de citocina a partir de células *i*NKT. (Dados não mostrados). Realizou-se modificações estruturais adicionais para gerar 6-Sulfono-mio-inositolceramida e 6-Desóxi-mio-inositolceramida. Estes compostos foram testados quanto a seus efeitos sobre a maturação de DC no sistema de co-cultura humana (Fig. 9A) e em camundongos *in vivo* (dados não-publicados). Enquanto o derivado de inositol INOC-25 induzisse pouca maturação de DC (dados não mostrados) por meio de regulação para cima de CD83 e CD86, ambas, 6-Desóxi e 6-Sulfono-mio-inositolceramida, induziram significativa maturação de DC de uma maneira dependente de células *i*NKT (Fig. 9 A.) em extensão similar àquela observada com α -GalCer.

De forma similar àquela observada com maturação de DC (Fig. 9 A.), produção de IL-12p40 pelas DC foi quase idêntica entre α -GalCer e 6-Desóxi-mio-inositolceramida, enquanto que o derivado de 6-Sulfono foi ligeiramente mais fraco (Fig. 9B). No entanto, a quantidade de IL-12p40 produzida pelas DC em resposta a células *i*NKT estimuladas com os análogos de derivados de 6-Desóxi e 6-Sulfono foi significativamente superior àquela de INOC-25 (não mostrado) e também maior do que aquela observada com LPS. Os sobrenadantes das co-culturas de DC com os compostos de derivados de inositol foram examinados quanto a IFN- γ como uma medida da ativação de células *i*NKT. Embora o composto 6-Desóxi induza liberação similar de IFN- γ àquela observada com adição de

α -GalCer (Fig. 9C), 6-Sulfono-mio-mositolceramida induziu muito pouca liberação de IFN- γ das células *i*NKT.

Os três compostos de inositol foram titulados em células C1R expressando CD1d humanas e usados para estimular um clone de células *i*NKT. De ambos, a liberação de IFN- γ (Fig. 9D.) e IL-4 (Fig. 9E.) parece que, embora o INOC-25 induzisse pouca ou nenhuma IFN- γ e IL-4, 6-Desóxi inositolceramida estimulou a liberação de níveis significativos de ambas as citocinas das células *i*NKT. É interessante observar que, conforme observado quando co-cultivadas com DC (Fig. 9C), embora 6-Sulfono inositolceramida estimulasse pouca ou nenhuma liberação de IFN- γ (Fig. 9D), produziu-se IL-4 detectável quando se usou concentrações maiores do composto (Fig. 9E).

Em comparação com α -GalCer, cada um dos compostos de derivados de inositol pareceu apresentar menor afinidade. Tanto em termos de IFN- γ (Fig. 9C) e IL-4 (Fig. 9B) α -GalCer induz a liberação de concentrações significativamente maiores de citocinas. IFN- γ e IL-4 pareceram aproximar-se de um platô quando estimuladas com 200 ng/ml de α -GalCer. Embora IFN- γ e IL-4 induzidas pelos derivados de inositol também pareçam titular [] com concentração crescente de composto, elas não se aproximaram dos níveis induzidos por α -GalCer.

  possível que, embora células C1R sejam efetivas na apresentação de quantidades maiores de ligantes, como α -GalCer, elas são menos efetivas para apresentar compostos com menor afinidade do que APCs profissionais, como DC. Isto pode explicar a diferença na magnitude da produção de citocina observada entre análogos apresentados por DC e por células C1R transfectadas com CD1d.

Conclusões: O ajuste fino da afinidade de ligação do TCR de *i*NKT com o complexo CD1d/lipídeo e a estabilidade de ligantes de lipídeos a moléculas CD1d levou à identificação de um novo grupo de

compostos capazes de induzir ativação de células *i*NKT, sem super-estimular células *i*NKT. Esta classe inédita de compostos é eficiente para estabilizar moléculas CD1d e isto é otimizado para estimulação de NKT porque minimiza a liberação de citocina e lise de DC dependente de células NKT, ao mesmo tempo que assegura a maturação de DC e preparação de células B e T específicas para antígeno. Esta combinação inédita de atributos biológicos e moleculares úteis foi obtida projetando-se uma classe de ligantes de CD1d que otimizam a interação de *i*NKT/CD1d sem comprometer a estabilidade do complexo CD1d/ligand. Portanto, referidos compostos podem ser usados numa faixa de dosagem efetiva mais ampla do que compostos existentes.

Exemplo A

Estes experimentos descrevem a preparação de células dendríticas (a seguir denominadas de DCs [*dendritic cells*]). Neste e nos exemplos a seguir usou-se, Composto 1, arabinitol ceramida; Composto 2, glicerol ceramida; ou Composto 3, derivados de treitol ceramida).

Seguiu-se a metodologia de Salio, *et al*, *J. Immunol.*, 167:1188-1197 (2001), incorporada por referência. Em resumo, 2×10^5 DCs derivadas de monócitos humanos foram pulsadas com 100 ng/ml de um dos Compostos 2, 3, α Gal-Cer, ou solução de carreador, como um controle. Para pulsação de DC, cada um de arabinitol ceramida (Composto 1), treitol ceramida (Composto 3), glicerol ceramida (Composto 2) e α Gal-Cer foi solubilizado em solução de carreador (0,5% de Tween 20/PBS), e adicionado ao meio das culturas de DC. Células NKT também foram adicionadas às culturas de DC numa relação de 10 células DC/NKT. Após 36 horas, sobrenadante foi removido das culturas e analisado quanto à presença de marcadores de maturação de DC conhecidos CD83, CD80, CD86, CD25, e CD38, sendo que todos estes foram analisados via FACS, usando-se métodos bem conhecidos.

Os resultados indicaram que DCs são combinadas com NKTs na presença de Composto 1 (arabinitol ceramida) ou Composto 2 (glicerol ceramida) ou Composto 3 (treitol ceramida) induz-se marcadores de maturação de DC. Níveis de indução de marcadores de maturação são similares àqueles observados com α Gal-Cer. Não se observou regulação para cima com controles.

Adicionalmente, níveis de interleucina-12 (IL-12) foram medidos como uma indicação da estimulação de DC por meio de detecção de p40 de IL-12 via ELISA, usando-se métodos convencionais. As células NKT não produzem IL-12 isto indica uma resposta específica de DC. Todos os compostos produziram secreção de IL-12 neste ensaio. Observou-se que Composto 3 é aproximadamente 50% tão potente quanto α Gal-Cer neste ensaio, enquanto que Compostos 1 e 2 foram aproximadamente 1000 vezes menos potentes do que Composto 3 confirmando diferentes atividades biológicas destes compostos neste sistema de ensaio.

Exemplo B

Nestes experimentos mediu-se a expansão de células T por meio de pulsação de DCs humanos a partir de PBLs com 100 nM do peptídeo de MelanA26-35 imunogênico conhecido, ELAGIGILTV. O peptídeo foi adicionado às DCs juntamente com PBLs sinérgicos do mesmo doador. Para detalhar estes experimentos mais plenamente, amostras de DCs foram irradiadas com 3000 rads, seguido de um pulso de 3 horas com o peptídeo, em meio isento de soro.

As células foram então lavadas cuidadosamente e incubadas com PBLs autólogos, numa relação de 1:10, em RPMI 1640/5% de soro humano. Adicionou-se IL-2 humana recombinante a 10 U/ml do dia 4 ao dia 7. No dia 10, após a adição dos PBLs, células foram analisadas. Células cultivadas foram manchadas com anti-CD8 e A2/tetrâmero MelanA25-35. O percentual de células T CD8 específicas para MelanA de um total de

células positivas para CD8 foi medido por meio de análise de FACS.

Os resultados indicaram que quando DCs humanas são incubadas na presença de células NKT, ocorre preparação cruzada de treitol e glicerol e ambos os compostos se mostraram estimuladores mais potentes de respostas de CTL específicos para antígeno, *in vitro*, do que α Gal-Cer. Isto confirma que tanto Composto 2, glicerol ceramida e Composto 3, treitol ceramida, são provavelmente úteis como imunoestimulantes de CTL CD8+, e sugere que outros compostos da invenção podem comportar-se de maneira similar.

Exemplo C

Estes experimentos animais detalham trabalho projetado para estudar o impacto dos compostos da invenção *in vivo*.

Animais-sujeito, cinco camundongos por grupo, receberam uma injeção intravenosa de 400 μ g de ovalbumina (OVA) juntamente com 1 μ g de um dos compostos da invenção em exame, ou um volume equivalente de solução de carreador diluída com PBS. Um subconjunto de camundongos recebeu injeção com 25 μ g da molécula MPL (Sigma-Aldrich; extraído de *Salmonella* Minnesota) solubilizada em PBS.

Após as injeções, obteve-se sangue das veias laterais da cauda, e PBLs foram isolados usando-se métodos convencionais. Os PBLs foram então manchados, diretamente, *in vivo*, com complexos tetraméricos, H-2Kb/OVA 257-264, H-2Kb, de acordo com Palmowski, *et al*, *J. Immunol.*, 168:4391-4398 (2002), incorporado por referência. Os tetrâmeros foram preparados de acordo com Whilan, *et al*, *J. Immunol.*, 163:4342-4348 (1999), incorporado por referência.

Quando os PBLs de animais não-tratados foram comparados com aqueles de animais manchados com tetrâmeros irrelevantes, os manchamentos de fundo foram equivalentes.

Houve um incremento da resposta específica para OVA

quando se usou α Gal-Cer, Composto 1, arabinitol ceramida, ou Composto 3, treitol ceramida. O incremento foi mais fraco com Composto 2, glicerol ceramida.

Quando MPL foi co-injetado com α Gal-Cer ou Composto 3, treitol ceramida, houve um incremento da resposta de CTL como seria de se esperar considerando Silk *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 114:1800-1811, 2004.

Exemplo D

Estes experimentos avaliaram a presença de anticorpos de IgG específicos para OVA no soro de camundongos que foram injetados com a proteína de OVA.

Placas ELISA revestidas com proteína de OVA foram preparadas usando-se métodos bem conhecidos. Em seguida coletou-se amostras de sangue, dez dias após a imunização, e preparou-se soro.

As amostras foram colhidas de camundongos que haviam sido imunizados apenas com OVA, OVA e Composto 1, arabinitol ceramida, OVA e α Gal-Cer, ou OVA e Composto 2, glicerol ceramida. Adicionalmente, camundongos foram imunizados com cada um destes programas de dosagem com adição de MPL. Mediu-se as titulações de IgG por meio da adição de diluições seriadas de soro de mouse [que foram] foram detectadas usando IgG de camundongo α conjugada com peroxidase de rabanete (peroxidase de rabanete ("HRP", *horseradish peroxidase*).

Os dados indicaram que os compostos da invenção produzem respostas de anticorpos específicas para OVA. Verificou-se que Composto 1, arabinitol ceramida e α Gal-Cer são mais efetivos como adjuvantes do que MPL, enquanto que Composto 2, glicerol ceramida, foi menos efetivo do que MPL, ao mesmo tempo em que ainda produz anticorpos específicos para OVA.

Adicionalmente, quando se adicionou MPL foi possível observar forte incremento da resposta em todos os casos, demonstrando que

compostos da invenção, quando usados em combinação com um ligante de TLR4, são extremamente eficientes para expandir a titulação de anticorpos específicos para antígeno.

Exemplo E

Nestes experimentos, as DCs obtidas do baço de animais-sujeito foram fenotipificadas.

Em resumo, em cada experimento, 1 µg de um dentre uma seleção de compostos da invenção foi injetado na veia caudal de camundongos-sujeitos. 24 h mais tarde removeu-se tecido do baço dos animais e cuidadosamente passou-se isto através de gaze para meio completo, suplementado com 5 mM de EDTA. Células foram enriquecidas para CD11c com pérolas magnéticas anti-CD11, usando-se técnicas publicadas. Uma vez enriquecidas, elas foram analisadas quanto a marcadores de maturação usando manchamento de anticorpo e citometria de fluxo. Manchamento não-específico foi realizado usando-se um anticorpo específico para o receptor de Fc-RIII/II.

Todos, Composto 1, arabinitol ceramida, e Composto 2, treitol ceramida e αGal-Cer, induziram CD86 *in vivo* de maneira similar, confirmando que ambos estes compostos em camundongos são altamente eficiente na produção de células T e também respostas de células B. Em contraste, Composto 3, glicerol ceramida, não induziu o marcador DC86 significativamente. Estes resultados mostram que, embora a combinação de MPL e glicerol seja efetiva para suscitar respostas de células B específicas para antígeno (Exemplos 25 e 26) em camundongos, a maturação de DC e expansão de células T não parecem ser incrementadas significativamente pelo Composto 2, glicerol ceramida. Isto contrasta com a verificação, em humanos, onde Composto 2, glicerol ceramida, amadurece células DC na presença de células NKT que, então, servem como preparadores eficientes de CTLs humanos.

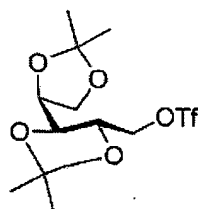
Exemplo F

Estes experimentos foram realizados para determinar o efeito de compostos selecionados da invenção na estimulação da produção de JDL-12 em animais indivíduos. Os animais receberam 1 µg ou 10 µg de treitol, glicerol ou Gal-Cer. Um grupo de animais também recebeu 50 µg de MPL. Seis horas após a injeção coletou-se amostras de sangue caudal, e determinou-se a proteína p70 de IL-12 usando um ELISA de acordo com procedimentos convencionais.

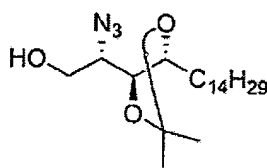
Observou-se aumentos dependentes da dose na secreção de IL-12/p70 com o Composto 3, camundongos tratados com treitol ceramida, confirmando a potência desta molécula na indução da liberação de IL-12/p70. A efetividade do Composto 3 compara-se de forma extremamente favorável com MPL.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS**Composto 1: Arabinitol Ceramida**

(a) L(+) arabinose foi convertida ao composto de triflato de arabinitol, i.e.



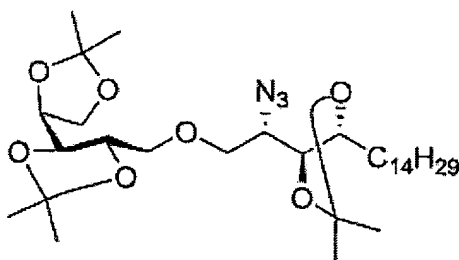
de acordo com procedimentos bem conhecidos. Ver, Zinner, *et al*, *Chem. Ber.*, 92:1614 (1959); Qin, *et al*, *Can. J. Chem.*, 77:481 (1999); e Yann, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 74:323 (1979), todos incorporados por referência. Este composto foi combinado com um componente de esfingosina, i.e.,



que foi sintetizado a partir de 4,6-O-benzilideno-D-galactose (Gros, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 29:3647 (1941)), segundo qualquer dentre Zimmermann, *et al*, *Liebigs Ann. Chem.*, 663 (1988); Schmidt, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 172:169 (1988) e Figueroa-Perez, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 328:95 (2000).

Uma vez que estes dois compostos se tornaram disponíveis, adiciona-se uma solução do componente esfingosina (220 mg, 0,575 mmol), em 3 ml de THF anidro, e 95% de NaH (17 mg, 0,708 mmol), a 0°C. Após 15 minutos de agitação, adicionou-se uma solução do composto de triflato de arabinitol (251 mg, 0,690 mmol), em 2 ml de THF anidro, à mesma temperatura. A mistura resultante foi aquecida lentamente à temperatura ambiente, e depois agitada de um dia para o outro. A mistura de reação foi extinta com uma solução aquosa de NH₄Cl, recolhida em EtOAc, e as camadas foram separadas.

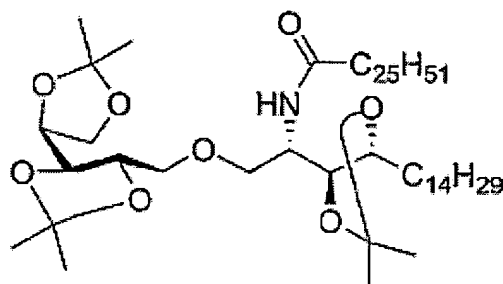
A camada orgânica foi lavada com água, secada sobre MgSO₄ anidro, e evaporada à securo. Material bruto foi purificado via cromatografia de flash (1:9, acetato de etila: éter de petróleo, dando:



como um líquido incolor (rendimento: 95%). $R_f = 0,54$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 5,2$ (c 1,0, CHCl₃). RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 4,19-4,00 (m, 5H), 3,99-3,86 (m, 2H), 3,84-3,61 (m, 5H), 1,60-1,25 (m, 26H), 1,41 (s, 3H), 1,40 (br s, 6H), 1,38 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,30 (s, 3H), 0,87 (t, J = 6.5 Hz, 3H). RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃): δ 109,6, 108,2, 96,0, 79,7, 77,7, 77,07, 77,3, 75,7, 72,8, 71,8, 67,5, 60,0, 31,9, 29,6, 29,5, 29,66, 29,62 29,59, 29,56, 29,4, 29,3, 28,1, 26,9, 26,6,

26,4, 25,6, 25,2, 22,6, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 620,2 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{32}H_{59}N_3O_7$ (597,43): C, 64,29; H, 9,95; N, 7,03. Encontrado: C, 64,35; H, 10,01; N, 7,15

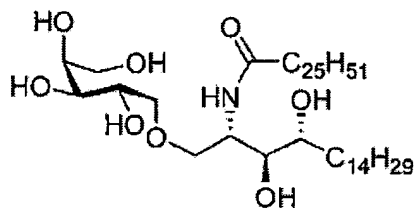
(b) O produto de (a) acima (150 mg, 0,251 mmol), e 10% de Pd/C (100 mg) em 4 ml de metanol com uma gota de ácido acético foi agitado, sob uma atmosfera de H_2 , durante 20 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi filtrada, concentrada, e co-evaporada com tolueno. O xarope resultante foi dissolvido em 5 ml de DMF seco, e então adicionou-se sucessivamente ácido hexacosanóico (Fluka) (120 mg, 0,303 mmol), N-hidróxi-benzotriazol (40 mg, 0,301 mmol), e cloridrato de 1-[3-(dimetilamino-propil)-3 etilcarbodiimida (EDC, 58 mg, 0,303 mmol), e a mistura resultante foi agitada a $45^\circ C$ durante 1 dia. A mistura foi recolhida em acetato de etila, lavada com água, solução de salmoura saturada, secada sobre $MgSO_4$ anidro, e concentrada. Resíduo foi purificado por meio de cromatografia de flash dando 182 mg de



como um sólido incolor (rendimento: 75%). p.f. $89^\circ C$. $R_f = 0,46$ (2:8, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +11,4$ (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 5,84 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 4,25-4,00 (m, 6H), 3,98-3,92 (m, 1H), 3,85-3,74 (m, 2H), 3,70-3,62 (m, 1H), 3,56-3,49 (m, 2H), 2,17-2,11 (m, 2H), 1,60-1,24 (m, 72H), 1,41 (s, 3H), 1,38 (s, 6H), 1,36 (s, 3H), 1,32 (br s, 6H), 0,86 (t, $J = 6,7$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 172,4, 109,6, 107,8, 79,8, 77,9, 77,8, 77,1, 76,1, 72,4, 71,3, 67,6, 48,3, 36,9, 29,69, 29,64, 29,5, 29,3, 29,0, 28,0, 27,1, 27,0, 26,7, 26,4, 25,77, 25,72, 25,2, 22,6, 14,0. MALDI-MS (modo positivo, Matriz

CHCA): m/z 972,6 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{58}H_{111}NO_8$ (949,83): C, 73,29; H, 11,77; N, 1,47. Encontrado: C, 73,59; H, 11,99; N, 1,41

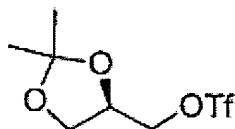
(c) O produto de (b) acima (120 mg, 0,123 mmol) em MeOH:CH₂Cl₂ (10:1, 22 ml) contendo TFA (100 μ l), foi agitado à temperatura ambiente durante 3 dias. O sólido resultante foi filtrado e secado dando



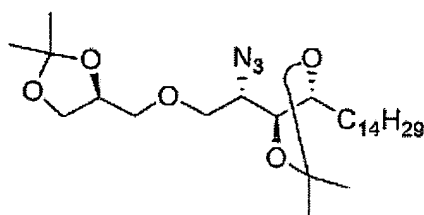
, referido a seguir como Composto 1 ('arabinitol-ceramida'), 63 mg, 60% de rendimento, p.f. 125°C. RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N): δ 8,66 (d, J= 8,8 Hz, 1H), 5,30-5,25 (m, 2H), 4,98- 4,94 (m, 1H), 4,66-4,58 (m, 2H), 4,44-4,22 (m, 7H), 2,57-2,53 (m, 2H), 2,07-1,37 (m, 72H), 0,99 (t, J= 6,7 Hz, 6H). RMN ¹³C (150,9 MHz, C₅D₅N): δ 173,3, 78,1, 76,3, 74,6, 73,2, 72,7, 71,3, 70,0, 65,4, 51,8, 36,8, 32,1-29,6 (m), 26,4, 22,9, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 853,3 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{49}H_{99}NO_8$ (830,73): C, 70,88; H, 12,02; N, 1,69. Encontrado: C, 73,59; H, 11,99; N, 1,41.

Composto 2: Glicerol Ceramida

O procedimento de 1(a) acima foi repetido usando

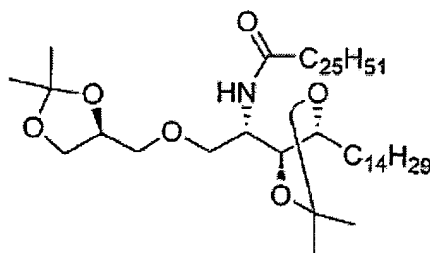


como o material de partida de triflato (Cassel, *et al*, *Eur. J. Org Chem.*, 875 (2001)) dando



como um sólido incolor (rendimento: 90%). $R_f = 0,47$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 24,6$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 4,32-4,23 (m, 1H), 4,16- 4,04 (m, 2H), 3,96 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H), 3,87-3,76 (m, 2H), 3,68-3,48 (m, 4H), 1,57-1,18 (m, 26H), 1,42 (s, 3H), 1,40 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,30 (s, 3H), 0,87 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 109,3, 108,2, 77,7, 75,6, 74,5, 72,8, 72,4, 66,7, 59,8, 31,8, 29,6, 29,5, 29,4, 29,3, 29,1, 28,0, 26,7, 26,3, 25,6, 25,3, 22,6, 14, 1. MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 520,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_5$ (497,38): C, 65,16; H, 10,33; N, 8,44. Encontrado: C, 65,25; H, 10,41; N, 8,50.

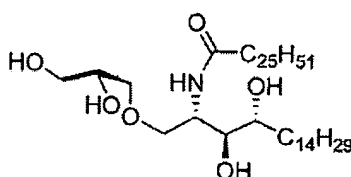
(b) O procedimento de 1(b) foi repetido usando produto de (a) acima dando



como um sólido incolor (rendimento de 72%). p.f. 81°C . $R_f = 0,43$ (2:8, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 13,5$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 5,75 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 4,27-4,00 (m, 5H), 3,74 (dd, $J = 9,3, 3,1$ Hz, 1H), 3,69 (dd, $J = 8,2, 6,2$ Hz, 1H), 3,54-3,45 (m, 3H), 2,20-2,07 (m, 2H), 1,60-1,23 (m, 72H), 1,40 (s, 6H), 1,34 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 0,86 (t, $J = 6,8$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 172,4, 109,4, 107,8, 77,7, 75,9, 74,7, 72,5, 66,4, 48,1, 36,9, 31,8, 29,6, 29,5, 29,39, 29,34, 29,2, 28,9, 27,9, 26,7, 26,4, 25,7, 25,3, 22,6, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 873,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{53}\text{H}_{103}\text{NO}_6$ (849,77): C, 74,86; H, 12,21; N, 1,65. Encontrado: C, 74,81; H, 12,26; N, 1,70.

(c) O procedimento de 1(c) acima foi repetido usando o

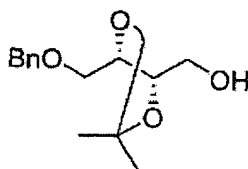
produto de (b) acima dando



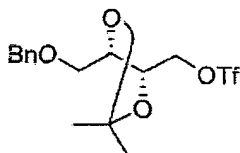
como um sólido incolor, referido a seguir como Composto 2 ('glicerol ceramida'). Rendimento 70%, p.f. 140°C. RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,64 (d, $J= 8,67$ Hz, 1H), 4,92-4,83 (m, 1H), 4,60-4,56 (m, 1H), 4,41-4,31 (m, 2H), 4,12-3,96 (m, 6H), 2,57 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,03-1,37 (m, 72H), 0,99 (t, $J= 6,8$ Hz, 6H). MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 793,6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{47}\text{H}_{95}\text{NO}_6$ (769,72): C, 73,29; H, 12,43; N, 1,82. Encontrado: C, 73,33; H, 12,47; N, 1,91.

Composto 3: Treitol ceramida

Composto (100 mg, 0,4 mmol) como preparado de acordo com de acordo com procedimentos bem conhecidos (ver, Wagner, *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 780 (2001))

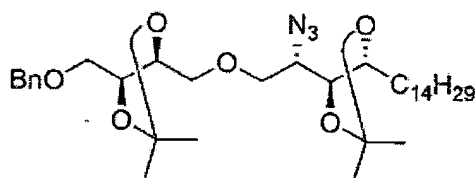


foi adicionado a 2,6-di-*t*-butilpiridina (92 mg, 0,48 mmol) em CH_2Cl_2 anidro (1 ml), Tf_2O (0,08 ml, 0,48 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 anidro (1 ml) com agitação a 0°C. A mistura de reação foi agitada à mesma temperatura durante 1 hora. A mistura de reação foi recolhida em acetato de etila e lavada com água fria (2x15 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução de salmoura, secadas e evaporadas dando o produto bruto que foi purificado por meio de cromatografia de coluna de sílica-gel (1:10, acetato de etila: éter de petróleo contendo gotas de Et_3N) dando



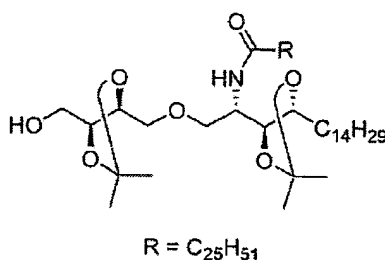
(145 mg, 95%). $R_f = 0,41$ (1:10, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,41-7,27 (m, 5H), 4,71 (dd, $J = 10,9, 2,8$ Hz, 1H), 4,57 (s, 2H), 4,50 (dd, $J = 10,9, 4,9$ Hz, 1H), 4,14 (ddd, $J = 8,0, 4,9, 2,8$ Hz, 1H), 4,05 (ddd, $J = 8,1, 6,3, 4,5$ Hz, 1H), 3,73 (dd, $J = 9,7, 4,5$ Hz, 1H), 3,55 (dd, $J = 9,7, 6,3$ Hz, 1H), 1,42 (s, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 128,6, 128,5, 128,0, 127,7, 10,7, 76,8, 75,03, 75,00, 73,8, 69,9, 26,9, 26,6.

(b) O procedimento de 1(a) acima foi seguido usando-se o produto de (a) acima dando



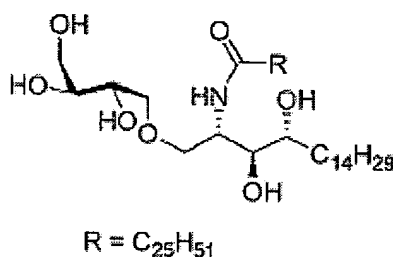
que foi purificado por meio de cromatografia de flash (1:9, acetato de etila: éter de petróleo) dando um líquido incolor (306 mg, 94%). $R_f = 0,46$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +7,3$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,36-7,23 (m, 5 H), 4,50 (s, 2H), 4,17-3,98 (m, 3H), 3,94 (dd, $J = 9,8, 2,0$ Hz, 1H), 3,83 (dd, $J = 9,2, 5,6$ Hz, 1H), 3,70- 3,53 (m, 6H), 1,62-1,21 (m, 26 H), 1,43 (s, 6H), 1,40 (s, 3H), 1,30 (s, 3H), 0,88 (t, $J = 6,2$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 138,0, 128,3, 127,63, 128,60, 109,6, 108,2, 77,8, 77,5, 77,4, 75,7, 73,5, 72,9, 72,2, 70,6, 60,0, 31,9, 29,7, 29,62, 29,57, 20,5, 29,4, 29,3, 28,1, 27,0, 26,4, 25,6, 22,7, 14,1, 4,8. MALDI-MS (modo positivo, Matriz DHB): m/z 640,9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(c) O procedimento de 1(b) acima foi seguido usando o produto de (b) acima dando



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (4:6, acetato de etila: éter de petróleo) dando um sólido incolor (116 mg, 81%). $R_f = 0,23$ (3:7, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 5,74 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 4,27-4,14 (m, 1H), 4,13-3,99 (m, 3H), 3,93-3,87 (m, 1H), 3,81 (3,55 (m, 6H), 2,20-2,13 (m, 2H), 1,65-1,20 (m, 72H), 1,42 (s, 9H), 1,33 (s, 3H), 0,88 (t, $J = 6,3$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,6, 109,2, 107,9, 79,2, 77,7, 76,7, 76,2, 71,9, 71,6, 62,4, 48,1, 36,9, 31,9, 29,6, 29,5, 29,4, 29,3, 29,0, 27,9, 26,9, 26,4, 25,7, 25,6, 22,6, 14,4, 14,0. MALDI-MS (modo positivo, Matriz DHB): m/z 902,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

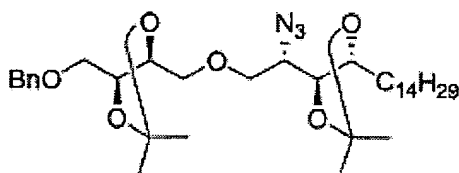
(d) O procedimento de 1(c) acima foi repetido usando os produtos de (c) acima dando



um sólido incolor (71 mg, rendimento de 71%), referido a seguir como Composto 3 ('treitol ceramida'). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,62 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 4,81-4,05 (m, 9H), 2,52-2,39 (m, 2H), 2,35-1,15 (m, 72 H), 0,87-0,83 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 822,9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

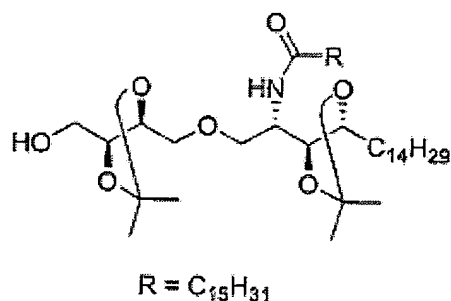
Composto 4: Treitol ceramida C_{15} acila

(a) O produto de 3(b) acima p. ex.



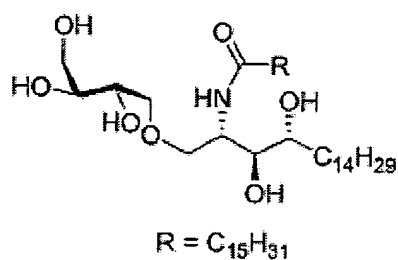
(175 mg, 0,284 mmol) e 10% de Pd/C (150 mg) em metanol (3 ml) contendo uma gota de ácido acético foi agitada sob atmosfera de H_2 (balão) à temperatura ambiente durante 22 horas. Em seguida, a mistura foi

filtrada, concentrada e co-evaporada com tolueno. O xarope resultante foi dissolvido em DMF seco (4 ml). Adicionou-se sucessivamente ácido palmítico (Fluka) (73 mg, 0,284 mmol), N-hidroxibenzotriazol (38 mg, 0,284 mmol) e cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilcarbodiimida (54 mg, 0,284 mmol) e a mistura resultante foi agitada a 45°C durante 1 dia. Em seguida foi recolhida em acetato de etila, lavada com água, solução de salmoura saturada, secada sobre MgSO₄ anidro, e concentrada. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia em sílica-gel (4:6, acetato de etila: éter de petróleo) dando



(168 mg, 80%). $R_f = 0,16$ (7:3 acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +11,6$ (c 1,0, CHCl₃). RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 5,77 (d, J = 9,4 Hz, 1H), 4,27-4,14 (m, 1H), 4,13-3,99 (m, 3H), 3,93-3,87 (m, 1H), 3,81-3,55 (m, 6H), 2,20-2,13 (m, 2H), 1,75-1,20 (m, 52H), 1,42 (s, 9H), 1,33 (s, 3H), 0,88 (t, J = 6,4 Hz, 6H). MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 762,9 [M + Na]⁺. 778,8 [M + K]⁺.

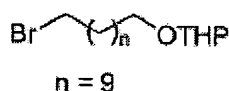
(b) O produto de (a) acima (120 mg, 0,162 mmol) em MeOH/CH₂Cl₂ (10:1, 22 ml) contendo TFA (100 μ l) foi agitado à temperatura ambiente durante 65 horas. O sólido que precipitou foi filtrado e secado para se obter



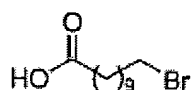
(70 mg, rendimento de 65%) referido a seguir como Composto 4, ('treitol ceramida C15 acila') RMN ^1H (250 MHz, DMSO- d_6): δ 5,45-5,35 (m, 1H), 4,60-3,75 (m, 10 H), 2,04-1,89 (m, 2H), 1,57-1,02 (m, 52H), 0,83-0,72 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 682,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 698,6 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

Síntese ácido 22-(Z)-hexacosanóico

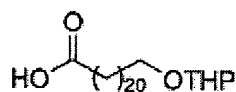
(a) 11-bromoundecanol protegido com THP (10,0 g, 29,85 mmol) p. ex.



e magnésio (1,0 g, 41,66 mmol) em THF seco (150 ml), foram aquecidos em refluxo para um período de 3 a 4 horas para preparar o reagente de Grignard. Isto foi adicionado a ácido 11-bromoundecanóico (8,0 g, 30,22 mmol) p. ex.

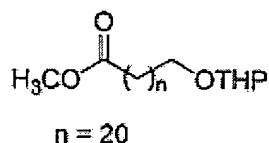


em THF seco (100 ml) sob argônio a -20°C . Adicionou-se Cloreto de metilmagnésio em THF ($\sim 10,2$ ml, 3 M) até cessar a evolução de gás, adicionando-se então Li_2CuCl_4 , agitação a -20°C prosseguiu durante 1 hora, e então deixou-se a temperatura elevar à temperatura ambiente. Após 15 horas, a mistura de reação foi cuidadosamente neutralizada com 10% de H_2SO_4 e extraída com acetato de etila (2 x 150 ml). A camada orgânica foi secada sobre MgSO_4 , e concentrada dando sólido incolor, que foi purificado por meio de cromatografia de flash (1:9 acetato de etila: éter de petróleo) dando



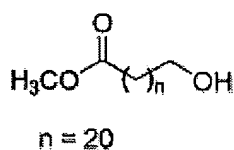
(10,9 g, 82% de rendimento). Este composto foi dissolvido em THF (50 ml) e esterificado com diazometano. O solvente foi evaporado,

e purificado por meio de cromatografia (5:95 de acetato de etila: éter de petróleo) dando o éster de 11-bromoundecanol protegido com THP, p. ex.



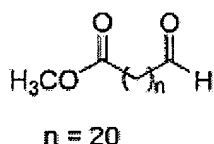
como um sólido incolor (10,9 g, 97% de rendimento). $R_f = 0,65$ (5:95, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 4,56 (t, $J = 3,3$ Hz, 1H), 3,90-3,81 (m, 1H), 3,76-3,65 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,52-3,45 (m, 1H), 3,40-3,31 (m, 1H), 2,28 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,62-1,51 (m, 10H), 1,23 (br. s, 32H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 174,3, 98,8, 67,7, 62,3, 51,4, 34,1, 30,7, 29,7, 29,68, 29,63, 29,60, 29,49, 29,44, 29,2, 29,1, 26,2, 25,5, 24,9, 19,6. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 477,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(b) O produto de (a) acima (8,0 g, 17,62 mmol) em metanol (200 ml) foi tratado com ácido p-toluenossulfônico (6,7 g, 35,26 mmol). A mistura de reação foi agitada durante de 3 a 4 horas. Após completamento da reação, (monitoração com TLC) o solvente foi evaporado e o resíduo foi dissolvido em clorofórmio e lavado com solução saturada de NaHCO_3 . A camada de clorofórmio foi secada e concentrada dando sólido incolor, que foi recristalizado (éter de petróleo/acetato de etila) dando



como cristais incolores (6,4 g, 98% de rendimento). $R_f = 0,21$ (2:8, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 3,66 (s, 3H), 3,63 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H), 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H), 1,64-1,53 (m, 4H), 1,25 (br. s, 32H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 174,3, 63,0, 51,4, 34,1, 32,8, 29,6, 29,59, 29,58, 29,4, 29,2, 29,1, 25,7, 24,9. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 393,8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

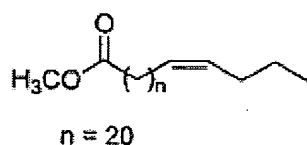
(c) O produto de (b) acima (6,0 g, 16,21 mmol) em CH_2Cl_2 seco (200 ml), foi tratado com periodinano de Dess-Martin (DMP) (13,74 g, 32,42 mmol). A mistura de reação foi agitada durante de 3 a 4 horas à temperatura ambiente. Após completamento da reação, solvente foi evaporado; resíduo foi suspenso em éter de dietila e removido por filtração. O filtrado foi lavado com solução de NaHCO_3 , depois solução de salmoura. A camada de éter foi secada e concentrada dando sólido, que foi purificado por meio de cromatografia de flash (5:95, acetato de etila: éter de petróleo) dando



como um sólido incolor (5,5 g, 92% de rendimento). $R_f = 0,62$ (5:95, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 9,73 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H), 3,63 (s, 3H), 2,39 (dt, $J = 14,0, 7,5, 2,0$ Hz, 2H), 2,26 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,66-1,56 (m, 4H), 1,21 (br. s, 32H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 202,8, 174,2, 51,3, 43,8, 34,0, 29,65, 29,61, 29,5, 29,49, 29,42, 29,40, 29,3, 29,2, 29,1, 24,9, 22,0. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 391,9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

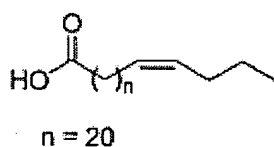
(d) Uma suspensão de brometo de n-butiltrifenilfosfônio (8,66 g, 21,73 mmol) em THF seco (80 ml) sob argônio a -78°C , foi tratada com bis(trimetilsilil) amida de sódio (21,73 ml, 1,0 M). A mistura de reação foi agitada durante 15 minutos, à mesma temperatura, antes de se adicionar uma solução do produto de (c) acima (5 g, 13,58 mmol) em THF seco (30 ml), e então a temperatura foi deixada elevar-se à temperatura ambiente. Após completamento da reação, esta foi extinta com solução aquosa de NH_4Cl e então extraída com éter de dietila (2 x 80 ml). A camada de éter foi lavada com salmoura, secada e evaporada dando resíduo, que foi purificado por meio de cromatografia de flash (5:95,

acetato de etila: éter de petróleo) dando



como um sólido incolor (5,42 g, 98% de rendimento). $R_f = 0,65$ (5:95, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 5,38-5,33 (m, 2H), 3,66 (s, 3H), 2,30 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,04-1,96 (m, 4H), 1,67-1,56 (m, 2H), 1,40-1,25 (m, 36H), 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 174,3, 130,0, 129,5, 51,3, 34,1, 29,7, 29,69, 29,64, 29,59, 29,56, 29,4, 29,3, 29,28, 29,25, 29,1, 27,2, 24,9, 22,8, 13,7. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 431,8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

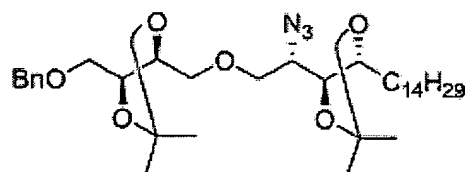
(e) O produto de (d) acima (2 g, 4,893 mmol) e hidróxido de sódio (2,3 g, 5,872 mmol) em metanol foi aquecida em refluxo durante 2 horas após resfriamento com gelo, o precipitado foi recolhido, suspenso em água e acidificado com ácido clorídrico concentrado ($\sim \text{pH } 1$). O produto foi removido por filtração e recristalizado de ácido acético glacial dando ácido 22-(Z)-hexacosanóico p. ex.



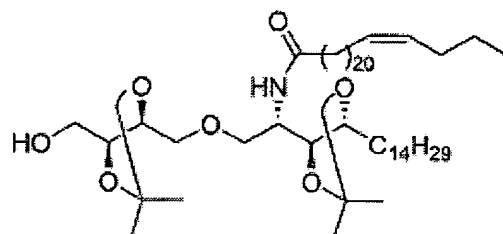
como cristais incolores (1,9 g, 98%). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 12,11 (s, 1H), 5,38- 3,33 (m, 2H), 2,26 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,02-1,99 (m, 4H), 1,64-1,58 (m, 2H), 1,38-1,26 (m, 36H), 0,90 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 176,6, 129,8, 129,3, 33,9, 29,5, 29,49, 29,41, 29, 38, 29,35, 29,31, 29,2, 29,1, 29,0, 28,9, 26,9, 24,7, 22,6, 13,5.

Composto 5: Treitol-22-(Z)-Ceramida

(a) O procedimento de 1(b) acima foi repetido usando ácido 22-(Z)-hexacosanóico e o produto de 3(b) p. ex.

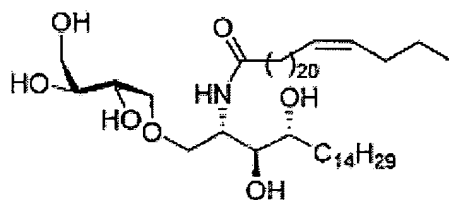


para dar



como um sólido incolor (rendimento: 68%). $R_f = 0,23$ (3:7, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +12,7$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 5,71 (d, $J = 9,5$ Hz, 1H), 5,35-5,31 (m, 2H), 4,21-3,97 (m, 4H), 3,91-3,84 (m, 1H), 3,78-3,63 (m, 5H), 3,59-3,52 (m, 1H), 2,35 (br. t, $J = 6,7$ Hz, 1H), 2,14 (dt, $J = 10,5, 7,5, 3,0$ Hz, 2H), 2,01-1,94 (m, 4H), 1,61-1,22 (m, 76H), 0,90-0,82 (m, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,5, 130,0, 129,5, 109,2, 107,9, 79,1, 77,7, 76,6, 76,1, 71,8, 71,6, 62,3, 48,1, 36,8, 31,8, 29,66, 29,60, 29,5, 29,37, 29,32, 29,28, 29,26, 29,23, 28,9, 27,8, 27,1, 26,9, 26,4, 25,69, 25,64, 22,8, 22,6, 14,0, 13,7. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 902,3 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{103}\text{NO}_7$ (877,77): C, 73,84; H, 11,82; N, 1,59. Encontrado: C, 73,97; H, 11,96; N, 1,67.

(b) O procedimento de 1(c) acima foi seguido usando o produto de (a) acima dando

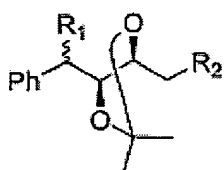


como um sólido incolor, referido a seguir como Composto 5 ('Treitol-22-(Z)-Ceramida') (rendimento: 81%). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,48 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 5,39-5,30 (m, 2H), 4,39-4,35 (m, 1H),

4,42-4,08 (m, 8H), 3,97-3,95 (m, 2H), 2,32 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,99-1,87 (m, 4H), 1,81-1,64 (m, 4H), 1,77-1,12 (m, 60H), 0,78-0,71 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 820,8 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{48}H_{95}NO_7$ (797,71): C, 72,22; H, 12,00; N, 1,75: C, 72,29; H, 11,93; N, 1,80.

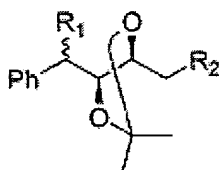
Composto 6: 4-Desóxi-4-Fenil-Treitol-Ceramida

(a) Composto



$R_1 = OH, R_2 = OBn$

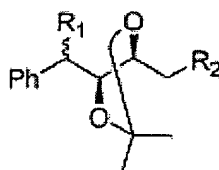
foi preparado com procedimentos bem conhecidos (ver, Su, *et al*, *Tetrahedron*, 57:2147 (2001)); Surivet, *et al*, *Tetrahedron Lett.*, 39:7299 (1998) e Surivet, *et al*, *Tetrahedron*, 55:1311 (1999)). O composto acima (1 g, 3,048 mmol) em CH_2Cl_2 (20 ml) foi tratado com piridina (1,48 ml, 18,291 mmol) e 4-dimetilamino piridina (4-DMAP) (110 mg, 0,901 mmol) seguido de cloreto de fenoxitiocarbonila (0,630 ml, 4,56 mmol) à temperatura ambiente. Após 30 min, a mistura de reação foi diluída com CH_2Cl_2 , lavada com solução de $NaHCO_3$ a 10%, água, secada sobre $MgSO_4$ e co-evaporada com tolueno dando resíduo. O produto bruto foi dissolvido em tolueno (30 ml), hidreto de tributil estanho (2,45 ml, 9,144 mmol) e adicionou-se AIBN (150 mg, 0,914 mmol), e a mistura de reação foi refluxada sob atmosfera de argônio durante 4 horas. Concentrada e purificada por meio de cromatografia de flash (1:9, acetato de etila: éter de petróleo) dando o produto de redução



$R_1 = H, R_2 = OBn$

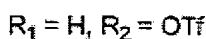
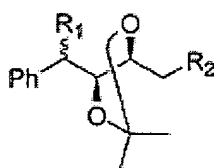
como um líquido incolor (900 mg, 95% de rendimento). $R_f = 0,40$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $n_D^{20} = -10,2$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,31-7,13 (m, 10H), 3,99 (br. s, 2H), 4,01-3,93 (m, 2H), 3,87-3,80 (m, 2H), 3,31-3,18 (m, 2H), 2,92 (dd, $J = 13,7, 6,5$ Hz, 1H), 2,77 (dd, $J = 13,7, 6,5$ Hz, 1H), 1,31 (s, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 137,9, 137,2, 129,3, 128,2, 127,5, 126,4, 108,9, 79,6, 78,4, 76,4, 73,3, 70,3, 39,4, 27,1, 26,9. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 335,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(b) O produto de (a) acima (890 mg, 2,852 mmol) e 10% de Pd/C (200 mg) em acetato de etila: metanol (3:2, 20 ml), agitado sob atmosfera de H_2 (balão) à temperatura ambiente durante 8 e, em seguida, a mistura foi filtrada, concentrada e purificada por meio de cromatografia de flash (2:8, acetato de etila: éter de petróleo) para se obter



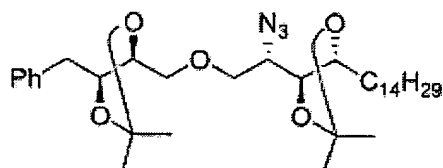
(608 mg, 96% de rendimento). $R_f = 0,20$ (2:8, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = -19,0$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,28-7,19 (m, 5H), 4,12 (dt, $J = 12,5, 8,2, 6,2$ Hz, 1H), 3,80 (ddd, $J = 8,0, 4,7, 3,0$ Hz, 1H), 3,51 (dd, $J = 12,0, 3,0$ Hz, 1H), 3,28 (dd, $J = 12,0, 4,7$ Hz, 1H), 3,04 (dd, $J = 14,0, 6,5$ Hz, 1H), 2,82 (dd, $J = 14,0, 6,5$ Hz, 1H), 1,40 (s, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 136,9, 129,2, 128,4, 126,6, 108,7, 81,1, 77,06, 61,9, 39,3, 27,2, 27,0. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 345,0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(c) O produto de (b) acima, foi convertido ao produto de triflato usando-se o método mencionado no procedimento 1(a) acima dando



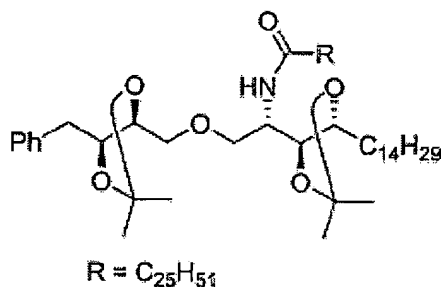
como um líquido incolor (rendimento: 78%). $[\alpha]_D^{25} = -15,5$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,32-7,19 (m, 5H), 4,23-4,08 (m, 2H), 4,01-3,91 (m, 2H), 3,16 (dd, $J = 13,5, 6,0$ Hz, 1H), 2,81 (dd, $J = 13,5, 6,0$ Hz, 1H), 1,42 (s, 3H), 1,39 (s, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 211,4, 135,8, 129,1, 128,8, 127,2, 110,0, 77,7, 76,9, 74,5, 39,2, 27,2, 26,6.

(d) O procedimento de 1(a) acima foi repetido usando o produto de (c) acima dando



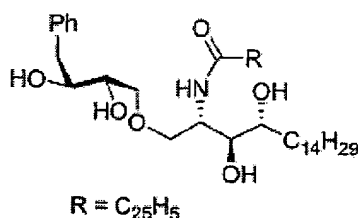
que foi purificado por meio de cromatografia de flash (1:9, acetato de etila: éter de petróleo) como um líquido incolor (rendimento: 93%). $R_f = 0,42$ (15:85, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +4,9$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,30-7,22 (m, 5H), 4,13-4,05 (m, 2H), 3,92-3,80 (m, 3H), 3,61-3,53 (m, 2H), 3,45-3,34 (m, 2H), 3,03 (dd, $J = 14,0, 6,7$ Hz, 1H), 2,88 (dd, $J = 14,0, 6,7$ Hz, 1H), 1,53-1,24 (m, 26H), 1,37 (br. s, 12H), 0,86 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 137,3, 129,3, 128,3, 127,6, 126,5, 108,9, 108,2, 79,7, 78,2, 77,7, 75,6, 72,7, 71,9, 59,8, 39,5, 31,9, 29,67, 29,64, 29,58, 29,54, 29,4, 29,3, 28,1, 27,2, 26,9, 26,4, 25,6, 22,6, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 610,9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(e) O procedimento de 1(b) foi repetido usando o produto de (d) acima dando



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (15:85, acetato de etila: éter de petróleo) como um sólido incolor (rendimento: 72%). $R_f = 0,35$ (2:8, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +9,2$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,31-7,23 (m, 5H), 5,70 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 4,19-4,00 (m, 4H), 3,95-3,88 (m, 1H), 3,71 (dd, $J = 9,7, 3,0$ Hz, 1H), 3,46-3,33 (m, 3H), 3,03 (dd, $J = 14,0, 6,5$ Hz, 1H), 2,88 (dd, $J = 14,0, 6,5$ Hz, 1H), 2,14 (dt, $J = 10,5, 7,2, 2,7$ Hz, 1H), 1,66-1,27 (m, 84H), 0,90 (t, $J = 6,5$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,3, 137,2, 129,3, 128,3, 126,5, 109,0, 107,8, 79,7, 78,4, 77,7, 75,9, 72,1, 48,1, 39,6, 36,9, 31,9, 29,6, 29,5, 29,4, 29,35, 29,32, 29,0, 28,0, 27,3, 27,1, 26,4, 25,79, 25,72, 22,6, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 962,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{60}\text{H}_{109}\text{NO}_6$ (939,83): C, 76,62; H, 11,68; N, 1,49. Encontrado: C, 76,70; H, 11,59; N, 1,53.

(f) O procedimento de 1(c) foi repetido usando o produto de (e) acima dando

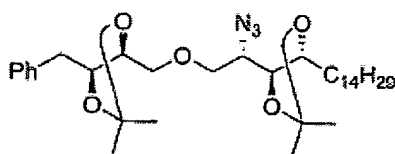


como um sólido incolor (rendimento: 70%), referido a seguir como Composto 6 ('análogo de 4-Desóxi-4-Fenil-Treitól-Ceramida'). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,46 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,37-7,13 (m, 5H), 4,22-4,04 (m, 7H), 3,94-3,92 (m, 2H), 3,17 (dd, $J = 14,0, 4,6$ Hz, 1H), 3,03 (dd, $J = 14,0, 7,5$ Hz, 1H), 2,31 (br. t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,73- 1,70 (m, 4H), 1,19-1,13 (m, 68H), 0,74 (t, $J = 6,7$ Hz, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 882,9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{NO}_6$ (859,76): C, 75,38; H, 11,83; N, 1,63. Encontrado: C, 75,36; H, 12,03; N, 1,68.

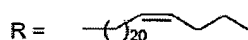
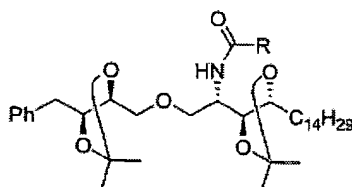
Composto 7: 4-Desóxi-4-Fenil-Treitól-22-(Z)-Ceramida

(a) O procedimento de 1(b) foi repetido usando ácido 22-

(Z)-hexacosanóico e o produto de 6(d) acima, p. ex.,

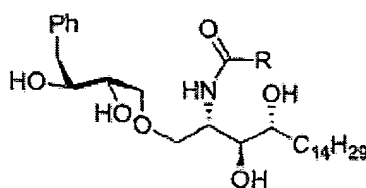


para dar



como um sólido incolor (rendimento: 72%). $R_f=0,38$ (2:8, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 8,0$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,31-7,22 (m, 5H), 5,66 (d, $J=9,2$ Hz, 1H), 5,36-5,31 (m, 2H), 4,12-3,98 (m, 4H), 3,91-3,84 (m, 1H), 3,67 (dd, $J=10,0, 3,5$ Hz, 1H), 3,43-3,28 (m, 3H), 2,99 (dd, $J=14,0, 6,6$ Hz, 1H), 2,84 (dd, $J=14,0, 6,5$ Hz, 1H), 2,00 (dt, $J=10,5, 7,2, 2,7$ Hz, 2H), 2,02-1,97 (m, 4H), 1,57-1,23 (m, 76H), 0,91-0,81 (m, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,3, 137,2, 130,1, 129,5, 129,3, 128,4, 126,6, 109,0, 107,8, 79,7, 78,4, 77,7, 75,9, 72,2, 71,2, 48,1, 39,6, 36,9, 31,9, 29,76, 29,71, 29,5, 29,4, 29,36, 29,31, 29,2, 29,0, 28,0, 27,3, 27,2, 27,1, 26,4, 25,8, 25,7, 22,8, 22,6, 14,1, 13,8. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 960,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, Anal, Calcd for $\text{C}_{60}\text{H}_{107}\text{NO}_6$ (937,81): C, 76,79; H, 11,49; N, 1,49. Encontrado: C, 76,86; H, 11,57; N, 1,55.

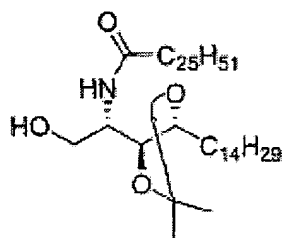
(b) O procedimento de 1(c) foi repetido usando o produto de (a) acima dando



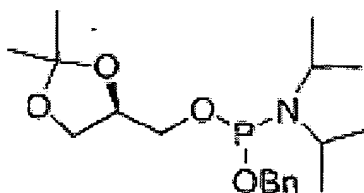
como um sólido incolor referido a seguir como Composto 7 ('4-Desóxi-4-Fenil-Treitol-22-(Z)-Ceramida') (rendimento: 68%). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,46 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 7,37-7,13 (m, 5H), 5,41-5,25 (m, 2H), 4,22-4,05 (m, 7H), 3,94-3,92 (m, 2H), 3,17 (dd, $J=14,0, 4,6$ Hz, 1H), 3,05 (dd, $J=14,0, 7,5$ Hz, 1H), 2,31 (br, t, $J=7,2$ Hz, 2H), 1,99-1,87 (m, 4H), 1,80-1,64 (m, 4H), 1,17-1,13 (m, 60H), 0,79-0,71 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 881,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, Anal, Calcd for $\text{C}_{54}\text{H}_{99}\text{NO}_6$ (857,75): C, 75,56; H, 11,63; N, 1,63. Encontrado: C, 75,47; H, 11,58; N, 1,68.

Composto 8: D-Glicerol-fosfato Ceramida

(a) Uma solução de

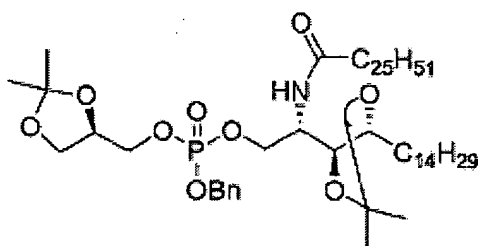


(150 mg, 0,204 mmol) em CH_2Cl_2 (4 ml), foi preparada como descrito por Mayer, *et al*, *Angew. Chem.*, 106:2289 (1994); *Angew. Chem.*, Int. Ed., 33:2177 (1994) e Kratzer, *et al*, *Eur. J. Org. Chem.*, 291 (1998), e combinado com solução 0,45 M de tetrazol em acetonitrila (1,16 ml, 0,50 mmol) à temperatura ambiente. Após ser agitada durante 10 minutos, uma solução de composto



como descrito por Chen, *et al*, *J. Org. Chem.*, 63:6511 (1998), (97 mg, 0,265 mmol), em CH_2Cl_2 seco (3 ml) foi adicionada à mesma temperatura. A mistura de reação foi agitada durante 2,5 horas, e então adicionou-se hidroperóxido de t-butila (0,26 ml, 0,266 mmol) à

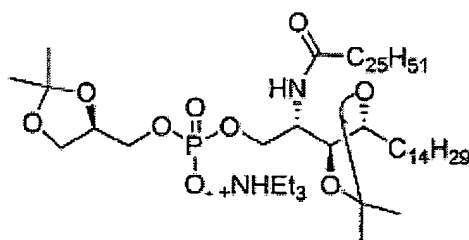
mistura de reação. A mistura de reação foi agitada adicionalmente durante 15 minutos e a mistura foi extraída com CH_2Cl_2 e água, a camada orgânica foi lavada com NaHCO_3 saturada e salmoura, secada sobre MgSO_4 anidro. O solvente foi evaporado dando material bruto, que foi purificado por meio de cromatografia de flash (4:6, acetato de etila: éter de petróleo) dando



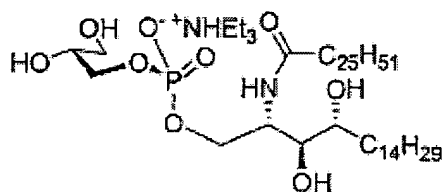
puro como um sólido incolor (191 mg, 92%) p.f. 87°C . R_f 0,40 (6:4, acetato de etila: éter de petróleo). $[\alpha]_D^{25} = +4,0$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , mistura de diastereômeros): δ 7,36-7,32 (m, 5H), 6,01 (d, $J=8,9$ Hz, 1H), 5,89 (d, $J=9,3$ Hz, 1H), 5,07 (d, $J=8,5$ Hz, 2H), 5,04 (d, $J=8,6$ Hz, 2H), 4,29-4,19 (m, 3H), 4,10-3,86 (m, 6H), 3,76-3,69 (m, 1H), 2,11-2,03 (m, 2H), 1,55-1,18 (m, 72H), 1,38 (s, 6H), 1,37 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,31 (s, 6H), 1,28 (s, 3H), 1,27 (s, 3H), 0,85 (t, $J=6,6$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 172,64, 172,61, 135,6, 135,5, 128,6-127,7 (m), 109,9, 108,0, 77,5, 75,3, 73,9, 65,9, 48,2, 36,7, 31,9, 29,6, 29,5, 29,3, 27,8, 26,5, 25,5, 25,1, 22,6, 14,1, ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3): δ 0,1, 0,04. MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 1043,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{60}\text{H}_{110}\text{NO}_9\text{P}$ (1019,79): C, 70,62; H, 10,86; N, 1,37. Encontrado: C, 70,66; H, 10,94; N, 1,41.

(b) O produto de (a) acima (160 mg, 0,157 mmol) e 10% de Pd/C (50 mg) em metanol (8 ml) foi agitada sob atmosfera de H_2 à temperatura ambiente durante 1 hora. A esta mistura de reação adicionou-se trietil amina (26 μl , 0,188 mmol), e após ser agitada durante 15 minutos, isto foi filtrado através de Celite e evaporado dando material bruto que foi submetido a reação subsequente sem qualquer purificação adicional. O

composto resultante



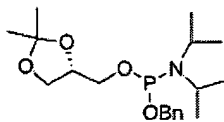
foi dissolvido em MeOH/CH₂Cl₂ (10:1, 22 ml) contendo TFA (150 µl), e foi agitado à temperatura ambiente durante 3 dias. O solvente foi evaporado dando um sólido. O sólido foi filtrado e lavado cuidadosamente com acetato de etila e CH₂Cl₂ (para remover material orgânico solúvel). Este sólido foi dissolvido em dioxano (1 ml), adicionou-se algumas poucas gotas de MeOH e trietilamina (26 µl, 0,188 mmol) com aquecimento a 60°C. Esta mistura foi liofilizada dando molécula-alvo não-protegida



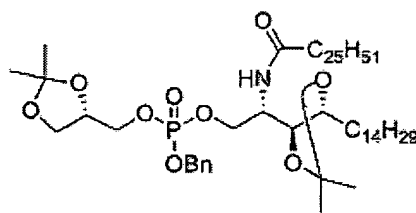
referida a seguir como Composto 8 ('D-Glicerol-Fosfato Ceramida'); como um sólido incolor (97 mg, 60%). RMN ¹H (250 MHz, C₅D₅N): δ 9,09 (d, J=8,5 Hz, 1H), 5,24-5,09 (m, 2H), 4,96-4,90 (m, 1H), 4,80-4,75 (m, 2H), 4,60-4,52 (m, 2H), 4,44-4,40 (m, 1H), 4,28 (br, d, J=5,5 Hz, 2H), 3,10 (q, J=7,5 Hz, 6H), 2,60 (t, J=6,7 Hz, 2H), 2,05-1,32 (m, 81H), 0,97-0,95 (m, 6H). RMN ¹³C (150,9 MHz, C₅D₅N): δ 173,4, 75,5, 72,67, 72,65, 72,5, 68,3, 65,94, 65,92, 65,8, 45,7, 36,8, 33,3, 32,1, 30,3, 30,2, 30,0, 29,8, 29,6, 29,2, 6,4, 22,9, 14,2. RMN ³¹P (162 MHz, C₅D₅N): δ 3,0. MALDI-MS (modo negativo, Matriz ATT): m/z 929,1 [M - HNEt₃]⁻, Calc. anal. para C₅₉H₁₁₉NO₉P (1031,86): C, 68,70; H, 11,63; N, 2,72. Encontrado: C, 68,75; H, 10,99; N, 2,79.

Composto 9: L-Glicerol-fosfato Ceramida

o procedimento descrito em 8(a) acima foi seguido usando-se o isômero

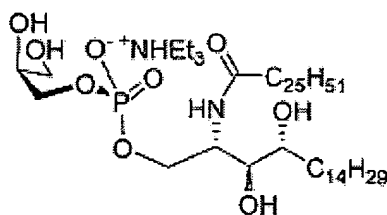


dando um material bruto que foi purificado por meio de cromatografia de flash (4:6, acetato de etila: éter de petróleo) dando



puro como um sólido incolor (195 mg, 94%) p.f. 85°C. R_f 0,47 (6:4, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 2,5$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , mistura de diaesterômeros): δ 7,40-7,30 (m, 5H), 6,05 (d, $J=9,1$ Hz, 1H), 5,99 (d, $J=9,2$ Hz, 1H), 4,32-4,20 (m, 3H), 4,13-3,93 (m, 6H), 3,75 (br, dd, $J=8,8, 5,6$ Hz, 1H), 2,20-2,09 (m, 2H), 1,58-1,13 (m, 72H), 1,38 (s, 6H), 1,34 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,31 (s, 6H), 1,29 (s, 3H), 1,25 (s, 3H), 0,93 (t, $J=6,6$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 172,64, 172,61, 135,6, 135,5, 128,6-127,7 (m), 109,9, 108,0, 108,0, 77,65, 77,63, 75,46, 75,43, 73,9, 73,8, 65,9, 48,2, 36,7, 31,9, 29,6, 29,5, 29,3, 28,9, 27,9, 27,8, 26,6, 26,5, 25,5, 25,1, 22,6, 14,1. RMN ^{31}P (162 MHz, CDCl_3): δ 0,3, 0,2. MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 1043,2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{60}\text{H}_{110}\text{NO}_9\text{P}$ (1019,79): C, 70,62; H, 10,86; N, 1,37. Encontrado: C, 70,69; H, 10,98; N, 1,47.

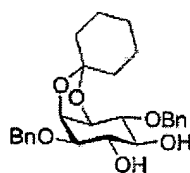
(b) O procedimento descrito em 8(a) acima foi usado dando



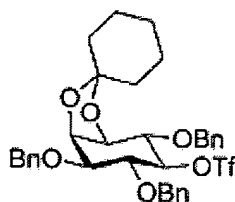
referido a seguir como Composto 9 ('L-Glicerol-fosfato Ceramida'); como um sólido incolor (83 mg, 55%). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 9,09 (d, $J=8,4$ Hz, 1H), 4,87-4,65 (m, 5H), 4,59-4,33 (m, 3H), 4,28 (br, d, $J=5,0$ Hz, 2H), 3,10 (q, $J=7,5$ Hz, 6H), 2,63 (t, $J=6,7$ Hz, 2H), 2,05-1,37 (m, 81H), 0,99-0,96 (m, 6H). RMN ^{13}C (150,9 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 173,4, 75,6, 72,65, 72,5, 68,4, 65,96, 65,7, 46,0, 36,9, 33,4, 32,1, 31,6, 31,2, 31,0, 29,8, 29,6, 29,2, 26,4, 22,9, 14,2. RMN ^{31}P (162 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 3,6. MALDI-MS (modo negativo, Matriz ATT): m/z 929,1 [$M - \text{HNEt}_3$] $^-$, calc. anal. para $\text{C}_{59}\text{H}_{119}\text{NO}_9\text{P}$ (1031,86): C, 68,70; H, 11,63; N, 2,72. Encontrado: C, 68,79; H, 10,95; N, 2,78.

Composto 10: Inositol cerimida

(a) Uma solução agitada de (366 mg, 0,691 mmol) do composto

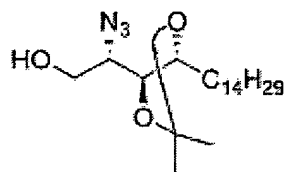


obtida de acordo com procedimentos bem conhecidos, ver Mayer, et al, Liebigs Ann./Recueil, 859 (1997) e Jiang, et al, J. Carbohydr. Chem. 6:319 (1987), foi misturada com 2,6-di-t-butilpiridina (159 mg, 0,83 mmol) em CH_2Cl_2 anidro (3 ml) e Tf_2O (136 μl , 0,83 mmol) que foi dissolvida em 2 ml de CH_2Cl_2 , a 0°C . A mistura de reação foi agitada à mesma temperatura durante 3 horas. A mistura de reação foi recolhida em acetato de etila e lavada com água fria (2 x 25 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura, secadas e evaporadas dando o produto bruto que foi purificado por meio de cromatografia de flash (8:92 acetato de etila: éter de petróleo contendo gotas de Et_3N) dando (413 mg, 90%) de

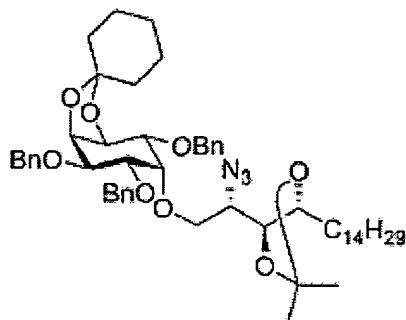


R_f 0,41 (1:9, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,41-7,28 (m, 15H), 4,88 (d, $J=11,9$ Hz, 1H), 4,78-4,67 (m, 5H), 4,30 (dd, $J=6,0, 3,7$ Hz, 1H), 4,17 (t, $J=6,4$ Hz, 1H), 4,03 (t, $J=7,6$ Hz, 1H), 3,97 (dd, $J=9,1, 6,5$ Hz, 1H), 3,77 (dd, $J=8,0, 3,6$ Hz, 1H), 1,83-1,30 (m, 10 H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 137,6, 137,32, 137,29, 128,4, 128,3, 128,2, 128,1, 128,0, 127,9, 127,7, 111,1, 87,7, 79,0, 77,83, 77,77, 76,4, 74,6, 73,6, 73,3, 37,0, 34,5, 25,0, 23,9, 23,6.

(b) O procedimento de 1(a) acima foi repetido usando-se uma solução de NaH (60%, 7 mg, 0,181 mmol), 58 mg (0,151 mmol) de componente esfingosina i.e.



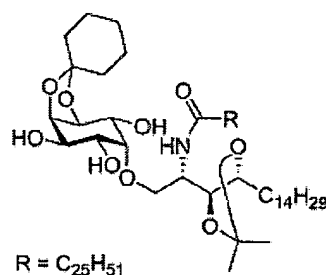
em 1 ml de DMF anidro. Após trinta minutos de agitação, adicionou-se uma solução do produto de (a) acima, (100 mg, 0,151 mmol) em DMF anidro (1,5 ml), a esta mesma temperatura. Após agitação de um dia para o outro, a mistura de reação foi extinta por meio de adição de uma solução aquosa de NH_4Cl . Isto foi recolhido em EtOAc e as camadas foram separadas. A camada orgânica foi lavada com água, secada sobre MgSO_4 anidro e evaporada à secura. O material bruto foi purificado por meio de cromatografia de flash (1:9, acetato de etila: éter de petróleo) dando o composto puro



como um líquido incolor (108 mg, 80%), $R_f=0,44$ (1:9,

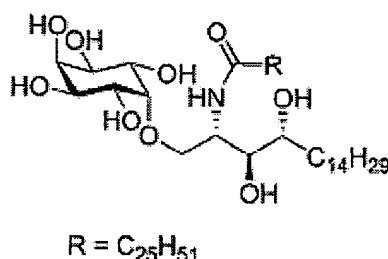
acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,45-7,23 (m, 15H), 4,88-4,63 (m, 6H), 4,30-3,83 (m, 8H), 3,75-3,69 (m, 1H), 3,56-3,47 (m, 1H), 3,40-3,35 (m, 1H), 1,72-1,26 (m, 36 H), 1,37 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 0,88 (t, $J=7,2$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 139,0, 138,8, 138,7, 138,6, 138,4, 138,3, 128,3, 128,22, 128,18, 128,1, 128,0, 127,59, 127,55, 127,5, 127,4, 127,3, 109,7, 108,0, 79,2, 79,1, 78,9, 78,8, 78,7, 78,0, 77,9, 77,8, 77,2, 76,25, 76,20, 75,4, 75,3, 74,2, 73,9, 73,7, 73,4, 73,3, 73,13, 73,09, 71,7, 71,5, 60,22, 60,16, 37,9, 35,3, 31,9, 29,64, 29,61, 29,5, 29,3, 28,13, 28,10, 26,4, 25,7, 25,1, 24,0, 23,5, 22,6, 14,0. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 919,8 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_8$ (896,20): C, 72,37; H, 8,66; N, 4,69. Encontrado: C, 71,91; H, 8,36; N, 4,68,

(c) O produto de (b) acima 160 mg (0,178 mmol), e uma pitada de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ em $\text{MeOH}_2\text{CH}_2\text{CyH}_2\text{O}$ (7,5:7,5:1, 3 ml) foi agitada sob atmosfera de H_2 à temperatura ambiente de um dia para o outro. Em seguida, a mistura foi filtrada, concentrada e co-evaporada com tolueno. O xarope resultante foi dissolvido em DMF seco (4 ml). Adicionou-se sucessivamente ácido hexacosónico (71 mg, 0,178 mmol), N-hidroxibenzotriazol (24 mg, 0,178 mmol) e cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilcarbodiimida (34 mg, 0,178 mmol) e a mistura resultante foi agitada, a 45°C durante 1 dia. Em seguida, isto foi recolhido em acetato de etila, lavado com água, solução de salmoura saturada, secado sobre MgSO_4 anidro, e concentrado. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia de coluna de flash (7:3, acetato de etila: éter de petróleo) dando o composto



(75 mg, 43%). $R_f = 0,23$ (7,5: 2,5, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 6,09 (t, $J=9,5$ Hz, 1H), 4,47-4,40 (m, 1H), 4,27-3,68 (m, 10H), 2,36-2,11 (m, 2H), 1,72-1,18 (m, 82 H), 1,44 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 0,88 (t, $J=6,4$ Hz, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): 1002,0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{59}\text{H}_{111}\text{NO}_9$ (978,51): C, 72,42; H, 11,43; N, 1,43. Encontrado: C, 72,16; H, 11,46; N, 1,36.

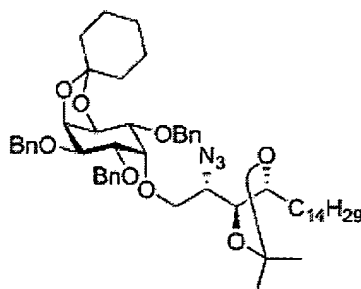
(d) Uma solução do produto (c) acima (46 mg, 0,047 mmol), em $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1, 2 ml), com alguns poucos cristais de CSA foram agitados, à temperatura ambiente, durante 2 dias. O sólido despejado foi secado dando 22 mg do composto



referido a seguir como Composto 10 ('inositol-ceramida'); (55% de rendimento). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 5,20-4,15 (m, HH), 2,49-2,38 (m, 2H), 2,38-1,10 (m, 72H), 0,91-0,80 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 881,6 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{50}\text{H}_{99}\text{NO}_9$ (858,32): C, 69,97; H, 11,63; N, 1,63. Encontrado: C, 70,07; H, 11,70; N, 1,67.

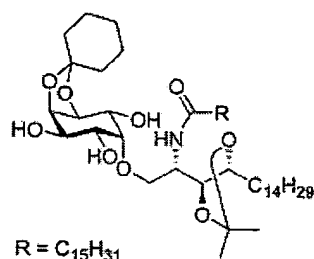
Composto 11: Inositol ceramida C_{15} acila

(a) O produto de 10(b) (114 mg (0,127 mmol) p. ex.



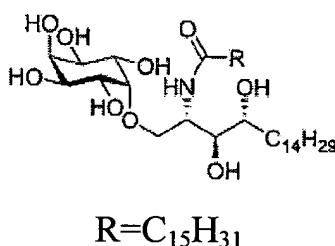
foi combinado com 10% de Pd/C (100 ng) em

MeOH/CH₂Cl₂/H₂O (7,5:7,5:1, 3 ml) e agitado sob uma atmosfera de H₂ à temperatura ambiente de um dia para o outro. Em seguida, a mistura foi filtrada, concentrada e co-evaporada com tolueno. O xarope resultante foi dissolvido em DMF seco (4 ml). Adicionou-se sucessivamente ácido palmítico (33 mg, 0,127 mmol), N-hidroxibenzotriazol (17 mg, 0,127 mmol) e cloridrato de 1-[3-(dimetilamino)-propil]-3-etilcarbodiimida (24 mg, 0,127 mmol) e a mistura resultante foi agitada a 45°C durante 1 dia. Em seguida, isto foi recolhido em acetato de etila, lavado com água, solução de salmoura saturada, secado sobre MgSO₄ anidro, e concentrado. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia de flash (7:3, acetato de etila: éter de petróleo) dando



(48 mg, 45%). R_f = 0,24 (3:4, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 6,05 (t, J=9,3 Hz, 1H), 4,47-4,39 (m, 1H), 4,27-3,67 (m, 10H), 2,28-2,13 (m, 2H), 1,72-1,20 (m, 62 H), 1,44 (s, 3H), 1,34 (s, 3H), 0,88 (t, J=6,4 Hz, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): 861,7 [M + Na]⁺, calc. anal. para C₄₉H₉₁NO₉ (838,24): C, 70,11; H, 10,94; N, 1,67. Encontrado: C, 70,19; H, 11,03; N, 1,69.

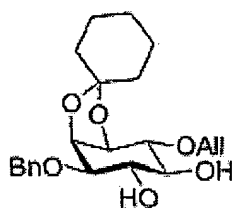
(b) O produto de (a) acima (44 mg, 0,047 mmol) em MeORCH₂Cl₂ (1:12 ml) contendo alguns poucos cristais de CSA foi agitado à temperatura ambiente durante 36 horas. O sólido despejado foi filtrado e secado dando



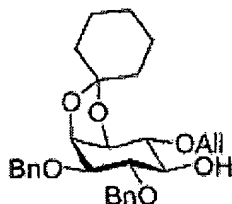
referido a seguir como Composto 11 ('inositol-ceramida C₁₅ acila'); (19 mg, 50%). RMN ¹H (250 MHz, C₅D₅N): δ 5,35-4,25 (m, 1 1H), 2,48-2,37 (m, 2H), 2,37-1,10 (m, 52H), 0,90-0,78 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): 741,2 [M + Na]⁺, calc. anal. para C₄₀H₇₉NO₉ (718,05): C, 66,91; H, 11,09; N, 1,95. Encontrado: C, 66,98; H, 11,47; N, 1,39.

Composto 12: O-mio-Inositol Ceramida

(a) Composto



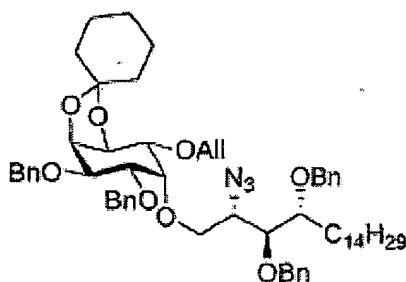
foi preparado com procedimentos bem conhecidos, ver Stadelmaier, *et al*, *Carbohydr. Res.*, 338:2557 (2003). O composto acima (2,66 g, 6,820 mmol) em tolueno seco (25 ml), foi tratado com NaH (95% em óleo mineral, 200 mg, 8,333 mmol), brometo de benzila (900 µl, 7,578 mmol). A mistura de reação foi refluxada durante 10 horas. A mistura de reação foi resfriada à temperatura ambiente, e diluída com acetato de etila, lavada com água, secada sobre MgSO₄ e evaporada dando resíduo que foi purificado por meio de cromatografia de flash (15:85, acetato de etila: éter de petróleo) de uma mistura de isômeros (~1:1,4) (75% de rendimento) dando



R_f = 0,32 (15:85, acetato de etila: éter de petróleo). RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 7,37-7,28 (m, 10H), 5,96-5,90 (m, 1H), 5,29 (dd, J=17,4, 1,8 Hz, 1H), 5,18 (dd, J=10,8, 1,8 Hz, 1H), 4,87 (d, J=11,4 Hz, 1H,

benzil-H)), 4,76-4,71 (m, 3H, benzil-H), 4,38-4,36 (m, 1H, alil-H), 4,29 (dd, $J=6,0, 4,2$ Hz, 1H, H-4), 4,23-4,21 (m, 1H, alil-H), 4,01 (dd, $J=7,2, 6,0$ Hz, 1H, H-5), 3,79 (t, $J=8,1$ Hz, 1H, H-2), 3,68 (dd, $J=8,1, 3,9$ Hz, 1H, H-3), 3,59 (dd, $J=9,6, 7,2$ Hz, 1H, H-6), 3,44 (dd, $J=9,6, 8,1$ Hz, 1H, H-1), 2,32 (br, s, 1H, -OH), 1,80-1,41 (m, 10H). RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3): δ 138,5, 138,1, 135,0, 128,59, 128,57, 128,47, 128,43, 128,0, 127,98, 127,94, 127,8, 127,7, 117,2, 110,4, 81,4 (C-6), 80,6 (C-2), 78,4 (C-5), 77,4 (C-3), 74,6, 74,0 (C-4), 73,3 (C-1), 72,8, 72,2, 37,3, 35,0, 25,0, 23,9, 23,6. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 503,5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

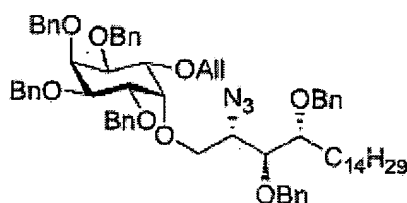
(b) Os procedimentos de 1(a) e 1(b) foram repetidos usando-se o produto de (a) acima dando



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (5:95, acetato de etila: éter de petróleo), (rendimento: 87%). $R_f=0,54$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 1,4$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3): δ 7,39-7,23 (m, 20H), 5,96-5,90 (m, 1H), 5,20 (dd, $J=17,4, 1,8$, Hz, 1H), 5,10 (dd, $J=10,8, 1,8$ Hz, 1H), 4,84-4,81 (m, 2H, benzil-H), 4,72 (d, $J=12,0$ Hz, 1H, benzil-H), 4,68-4,64 (m, 2H, benzil-H), 4,59-4,54 (m, 2H, benzil-H), 4,46 (d, $J=11,4$ Hz, 1H, benzil-H), 4,26 (t, $J=4,8$ Hz, 1H, H-4), 4,19-4,16 (m, 3H, H-5, H-3, alil-H), 4,14-4,06 (m, 2H, H-1', alil-H), 3,99-3,96 (m, 1H, H-1'), 3,81 (d, $J=1,8$ Hz, 1H, H-1), 3,75 (dd, $J=9,6, 1,8$ Hz, 1H, H-2), 3,72-3,70 (m, 1H, H-2'), 3,58-3,56 (m, 2H, H-3', H-4'), 3,33 (dd, $J=8,4, 2,4$ Hz, 1H, H-6), 1,61-1,41 (m, 10H), 1,26-1,24 (m, 26H), 0,88 (t, $J=7,2$ Hz, 1H, 3H). RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3): δ 138,5-127,4 (m, 24C), 135,1, 116,8, 109,7, 79,6 (C-4'), 79,1 (C-1, C-6), 78,8 (C-2), 78,7 (C-

3'), 78,0 (C-5), 76,3 (C-3), 73,8 (C-4), 73,6, 73,5 (C-1'), 73,3, 71,9, 70,9, 62,4 (C-2'), 37,5, 35,0, 25,0, 23,9, 23,6, 22,7, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1009,1 $[M + Na]^+$, calc. anal. para $C_{61}H_{83}N_3O_8$ (985,62): C, 74,28; H, 8,48; N, 4,26. Encontrado: C, 74,19; H, 8,42; N, 4,28.

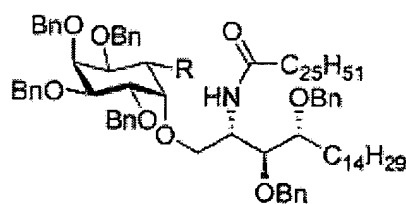
(c) O produto de (b) acima (700 mg, 0,710 mmol) em uma mistura de tolueno/etanol/1 M de HCl aq. (3:6:1, 15 ml) foi aquecido a 60°C durante 3 horas. O solvente foi co-evaporado com tolueno, secado em vácuo, o resíduo foi dissolvido em DMF seco (10 ml), NaH (60% de óleo mineral, 85 mg, 3,553 mmol) foi adicionado e agitado durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e então adicionou-se brometo de benzila (220 μ l, 1,77 mmol). A mistura de reação foi agitada durante mais 5 horas, e então extraída com éter de dietila (2 x 20 ml), a camada de éter foi lavada com água, secada sobre $MgSO_4$ e evaporada dando material bruto, que foi purificado por meio de cromatografia de flash (5:95, acetato de etila: éter de petróleo) dando



(655 mg, 85% de rendimento). $R_f=0,40$ (5:95, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = + 2,8$ (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7,44-7,28 (m, 30H), 5,96-5,90 (m, 1H), 5,32 (dd, $J=17,4$, 1,8 Hz, 1H), 5,14 (dd, $J=10,8$, 1,8 Hz, 1H), 4,88-4,62 (m, HH), 4,54 (d, $J=11,4$ Hz, 1H), 4,29-4,27 (m, 1H), 4,22-4,12 (m, 3H), 4,08 (br, s, 1H), 3,96 (br, s, 3H), 3,87-3,83 (m, 3H), 3,68-3,66 (m, 2H), 1,49-1,32 (m, 26H), 0,94 (t, $J=7,2$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$): δ 138,5-127,2 (in, 36C), 135,4, 116,2, 79,8, 79,2, 79,0, 78,9, 78,7, 78,38, 78,36, 76,0, 74,6, 74,4, 73,8, 73,17, 73,15, 73,0, 72,18, 72,10, 62,5, 32,0, 29,9, 29,89, 29,80, 29,79,

29,76, 29,4, 27,0, 25,7, 22,7, 14,2. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1110,4 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{69}H_{87}N_3O_8$ (1085,65): C, 76,28; H, 8,07; N, 3,87. Encontrado: C, 76,36; H, 8,17; N, 3,95.

(d) O produto de (c) acima (650 mg, 0,598 mmol) em éter de dietila (5 ml) foi adicionado a uma suspensão de $LiAlH_4$ (46 mg, 1,210 mmol) em éter de dietila (10 ml) a $0^\circ C$ por gotejamento. A mistura de reação foi trazida lentamente à temperatura ambiente e refluxada durante 1 hora. A mistura de reação foi extinta com metanol e extraída com acetato de etila (2 x 15 ml) e água. A camada orgânica foi lavada com salmoura e secada sobre $MgSO_4$. A remoção do solvente deu uma amina bruta. O procedimento em 1(b) acima foi repetido para o acoplamento desta amina ao ácido carboxílico dando

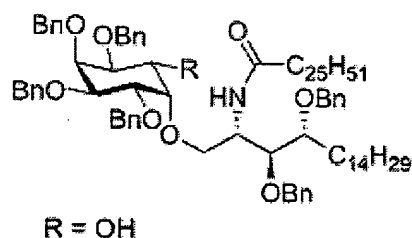


R = Oll

(rendimento: 65%). $R_f = 0,57$ (15:85, acetato de etila: éter de petróleo), + 1,6 (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7,37-7,17 (m, 30H), 7,04 (d, $J=8,6$ Hz, 1H), 5,96-5,91 (m, 1H), 5,27 (dd, $J=17,4$, 1,8 Hz, 1H), 5,15 (dd, $J=10,8$, 1,8 Hz, 1H), 4,83-4,43 (m, 13H, benzil-H, H-1'), 4,33-4,31 (m, 1H), 4,23-4,21 (m, 1H), 4,19-4,02 (m, 2H, H-4, H-2'), 3,91 (dd, $J=9,6$, 2,4 Hz, H-2), 3,88-3,82 (m, 3H, H-3', H-6, H-1), 3,73 (dd, $J=9,6$, 3,0 Hz, 1H, H-3), 3,70 (dd, $J=10,2$, 2,4 Hz, 1H, H-5), 3,66-3,62 (m, 1H, H-1'), 3,48-3,44 (m, 1H, H-4'), 2,21-2,17 (m, 2H), 1,57-1,27 (m, 72H), 0,91 (t, $J=7,2$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$): δ 172,8, 139,2-127,2 (m, 36C), 135,1, 117,1, 80,8 (C-4'), 80,0 (C-1), 79,6 (C-3), 79,44 (C-2), 79,41, 79,3 (C-5, C-6), 78,2 (C-3'), 75,3 (C-4), 74,6, 74,4, 73,8, 73,8 (C-1'), 73,6, 73,1, 72,8, 72,7, 71,6, 51,0 (C-2'), 36,8, 32,0, 29,9, 29,79, 29,77, 29,72,

29,6, 29,44, 29,43, 26,4, 25,9, 25,8, 22,7, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1464,2 $[M + Na]^+$, calc. anal. para $C_{95}H_{139}NO_9$ (1438,04): C, 79,29; H, 9,74; N, 0,97. Encontrado: C, 79,35; H, 9,81; N, 1,09.

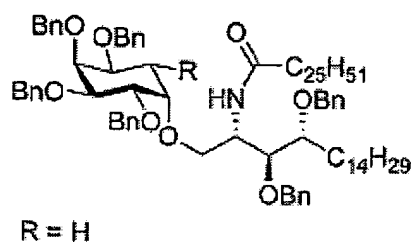
(e) O composto de (d) acima (650 mg, 0,452 mmol) como uma solução em etanol (15 ml), foi tratado com DBU (10 μ l, 0,065 mmol), e cloreto de tris(trifenilfosfino) rutênio (II) (130 mg, 0,135 mmol). A mistura de reação foi aquecida em refluxo a 90°C durante 30 minutos. O solvente foi evaporado dando produto isomerizado ($R_f = 0,54$, 15:85, acetato de etila: éter de petróleo), que foi dissolvido em HCl aq. 1 M em acetona (1:9, 15 ml) e a mistura de reação foi aquecida em refluxo a 70°C durante 15 minutos. A mistura foi resfriada à temperatura ambiente, neutralizada com Et_3N e extraída com acetato de etila (2 x 20 ml), a fase orgânica foi lavada com água e salmoura, secada sobre $MgSO_4$ e evaporada dando material bruto. Purificado por meio de cromatografia de flash (18:82, acetato de etila: éter de petróleo) dando



(655 mg, 78% de rendimento). $R_f = 0,2$ (15:85, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = -6,4$ (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7,37-7,23 (m, 30H), 7,16 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 4,88 (d, $J=12,0$ Hz, 1H), 4,78-4,68 (m, 5H), 4,59-4,54 (m, 4H), 4,47-4,42 (m, 3H), 4,09-4,06 (m, 3H), 3,95-3,93 (m, 2H), 3,76-3,3,73 (m, 2H), 3,66 (br, d, $J=8,4$ Hz, 1H), 3,51-3,46 (m, 2H), 1,97-2,14 (m, 2H), 1,52-1,24 (m, 72H), 0,89 (t, $J=7,2$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$): δ 172,9, 138,9-127,3 (m, 36C), 80,7, 80,3, 79,9, 79,3, 79,1, 74,4, 74,2, 74,0, 73,9, 73,5, 73,3, 72,0,

71,7, 70,2, 51,9, 36,9, 31,9, 29,9, 29,77, 29,75, 29,70, 29,5, 29,42, 29,4, 26,3, 25,8, 22,7, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1424,7 [M + Na]⁺. Calc. anal. para C₉₂H₁₃₅NO₉ (1398,01): C, 78,98; H, 9,73; N, 1,00. Encontrado: C, 79,08; H, 9,84; N, 1,13.

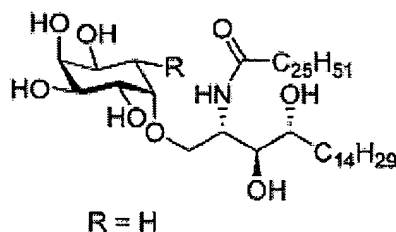
(f) O procedimento de 6(a) para reduzir um grupo OH foi repetido usando o produto de (e) acima dando



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (2:98 acetato de etila: tolueno) como sólido incolor (60%). $R_f = 0,57$ (4:96, acetato de etila: tolueno), $[\alpha]_D^{25} = + 11,2$ (c 1,0, CHCl₃). RMN ¹H (600 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,17 (m, 30H), 6,36 (d, J=8,6 Hz, 1H, -NH), 4,83-4,36 (m, 12H, benzil-H), 4,18-4,14 (m, 2H, H-2', H-4), 4,00 (br, d, J=9,0 Hz, 1H, H-1'), 3,93 (del, J=10,0, 3,0 Hz, 1H), H-2), 3,84 (t, J=4,0 Hz, 1H, H-3'), 3,78 (d, J=3,0 Hz, 1H, H-1), 3,76 (br, t, J=9,0 Hz, 1H, H-5), 3,72 (dd, J=10,0, 2,0 Hz, 1H, H-3), 3,66 (br, d, J=9,0 Hz, 1H, H-1'), 3,51 (ddd, J=12,0, 8,0, 4,0 Hz, 1H, H-4'), 1,98-1,94 (m, 1H, H-6), 1,824,72 (m, 2H), 1,63-1,61 (m, 1H, H-6), 1,43-1,24 (m, 72H), 0,86 (t, J=6,5 Hz, 6H). RMN ¹³C (150 MHz, CDCl₃): δ 173,3, 139-127,2 (m, 36C), 80,2 (C-2, C-3'), 79,8 (C-3, C-4'), 75,9 (C-4), 75,8 (C-1), 75,1 (C-5), 74,0, 73,8, 72,5, 71,9, 71,0 (C-1'), 51,3 (C-2'), 36,6, 31,9, 30,5, 30,2, 29,8, 29,75, 29,73, 29,69, 29,65, 29,5, 29,4, 29,3, 26,0, 25,7, 22,7, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1408,6 [M + Na]⁺, calc. anal. para C₉₂H₁₃₅NO₈ (1382,02): C, 79,89; H, 9,84; N, 1,01. Encontrado: C, 79,98; H, 9,99; N, 1,18.

(g) O produto de (f) acima (150 mg, 0,108 mmol) e 20% de Pd(OH)₂/C (150 mg) em MeOH/CH₂Cl₂H₂O (7,5:7,5:1, 6 ml) foi agitado sob atmosfera de H₂ à temperatura ambiente durante 2 horas. O produto

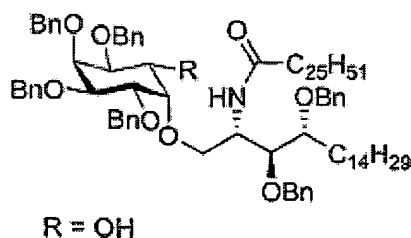
precipitou-se e foi dissolvido por meio da adição de uma mistura de solventes metanol/ CH_2Cl_2 /éter de petróleo e com aquecimento. Após filtração, o filtrado foi concentrado dando sólido incolor



referido a seguir como Composto 12 ('análogo de D-mio-Inositol Ceramida') (86 mg, 95% de rendimento). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,45 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 5,16 (dd, $J=8,0, 4,2$ Hz, 1H), 4,58-4,43 (m, 4H), 4,33-4,22(m, 5H), 2,45-2,30 (m, 3H), 1,91-1,77 (m, 3H), 1,28-1,21 (m, 70H), 0,83 (t, $J=6,7$ Hz, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 864,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{50}\text{H}_{99}\text{NO}_8$ (841,74): C, 71,30; H, 11,85; N, 1,66. Encontrado: C, 71,41; H, 11,98; N, 1,73.

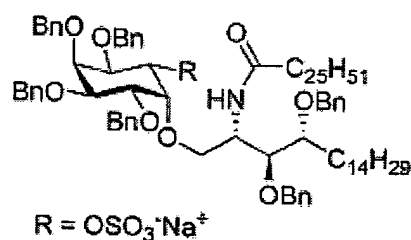
Composto 13: Sal de D-mio-Inositol Ceramida

(a) A uma solução agitada do produto de 12(e) acima, p. ex.

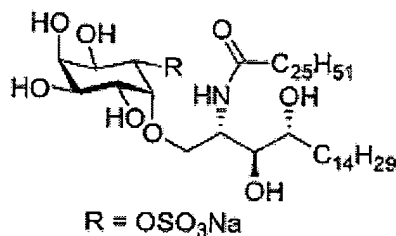


(200 mg, 0,143 mmol) em DMF/THF (1:1, 2 ml), adicionou-se complexo $\text{SO}_3 \cdot \text{NMe}_3$ (40 mg, 0,287 mmol), e a mistura de reação foi agitada durante 24 horas à temperatura ambiente. Após completamento da reação, isto foi extraído com CH_2Cl_2 (2 x 10 ml) e a fase orgânica foi secada e concentrada, purificada por meio de cromatografia de flash dando sólido incolor, que foi dissolvido em MeOH/ CH_2Cl_2 (1:1, 2 ml) e passado através de resina de troca de íon Dowex 50 X 8H^+ (forma de Na^+) e eluído com mistura de MeOH/ CH_2Cl_2 (1:1, 100 ml). O solvente foi

evaporado para se obter sólido,



que foi purificado por meio de cromatografia de flash dando um sólido incolor (203 mg, 95% de rendimento). Este composto foi desbenzilado usando-se procedimento similar ao descrito para o composto 12(f) acima, dando um sólido incolor



referido a seguir como Composto 13 ('D-mio-Inositol Ceramida') (rendimento: 40% de rendimento).

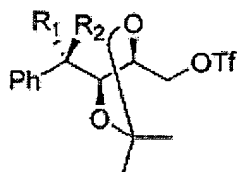
RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N: CD₃OD): δ 8,50 (d, J=8,5 Hz, 1H), 5,10 (dd, J=10,0, 2,0 Hz, 1H), 4,58-4,55 (m, 2H), 4,48-4,42 (m, 2H), 4,26-4,17 (m, 3H), 4,06-3,99 (m, 2H), 3,91-3,88 (m, 1H), 2,31-2,26 (m, 2H), 1,63-1,10 (m, 72H), 0,90 (t, J=5,7 Hz, 6H).

MALDI-MS (modo negativo, ATT): m/z 938,7 [M - Na]⁻.
 Calc. anal. para C₅₀H₉₈NNaO₁₂S (959,67): C, 62,53; H, 10,29; N, 1,46.
 Encontrado: C, 62,59; H, 10,38; N, 1,51.

Composto 14: 4-(S)-Fenila Treitol Ceramidas

(a) Ácido L-(+)-tartárico foi convertido a um triflato correspondente de acordo com procedimentos bem conhecidos, ver Wagner, *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkins Trans.*, 1, 780 (2001).; Su, *et al.*, *Tetrahedron.*, 57 2147 (2001); Surivet, *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 39:7249 (1998) e Surivet, *et al.*, *Tetrahedron.*, 55:1311 (1999), todos incorporados

aqui por referência. A síntese do triflato resulta numa mistura diaestereomérica. Esta mistura é separada, seguindo as referências indicadas acima, dando dois compostos.

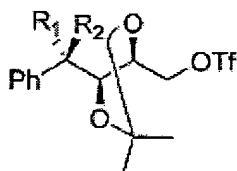


$R_1 = \text{OTBDPS}, R_2 = \text{H}$

e

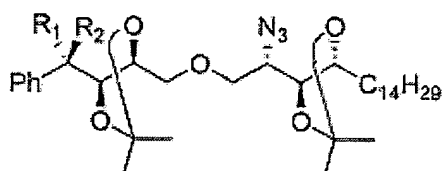
$R_2 = \text{OTBDPS}, R_1 = \text{H}$

(b) O procedimento de 1(a) acima foi repetido com um triflato de (a) acima, em que $R_1 = \text{OTBDPS}$ e $R_2 = \text{H}$, p. ex.



$R_1 = \text{OTBDPS}, R_2 = \text{H}$

para dar

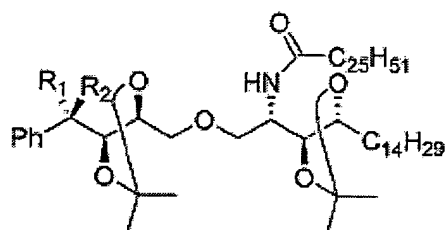


$R_f = \text{OTBDPS}, R_2 = \text{H}$

que foi purificado via cromatografia de flash dando como um líquido incolor, com um rendimento de 84%. $R_f=0,62$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +20,5$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,71-7,17 (m, 15H), 4,90 (d, $J=4,5$ Hz, 1H), 4,27-4,20 (m, 1H), 4,15-4,06 (m, 1H), 3,95 (dd, $J=8,0, 4,5$ Hz, 1H), 3,79-3,70 (m, 2H), 3,52 (dt, $J=8,7, 2,0$ Hz, 1H), 3,40 (t, $J=9,0$ Hz, 1H), 3,28-3,16 (m, 2H), 1,54-1,20 (m, 26H), 1,42 (s, 3H), 1,37 (s, 3H), 1,32 (s, 3H), 1,28 (s, 3H), 1,06 (s, 9H), 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 140,4, 136,07, 136,02, 133,5, 133,2, 129,5, 129,4, 127,7, 127,4, 127,3, 127,2, 127,0,

109,2, 108,1, 81,1, 77,7, 76,8, 75,7, 75,5, 72,8, 72,6, 59,7, 31,9, 29,6, 29,59, 29,53, 29,4, 29,3, 28,0, 27,0, 26,88, 26,82, 26,4, 25,6, 22,6, 19,3, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 865,2 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{50}H_{75}N_3O_6Si$ (842, 23): C, 71,30; H, 8,98; N, 4,99. Encontrado: C, 71,39; H, 9,03; N, 5,07.

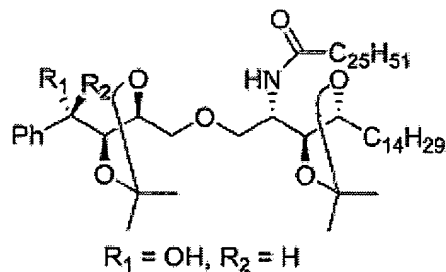
(c) O procedimento de 1(b) acima foi repetido usando o produto de (b) acima dando



, que foi purificado via cromatografia de flash (8:9,2 de acetato de etila:éter de petróleo), como um sólido incolor, com 72% de rendimento. $R_f = 0,52$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +17,9$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,69-7,16 (m, 15H), 5,72 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 4,84 (d, $J=4,7$ Hz, 1H); 4,19-4,08 (m, 4H), 3,87 (dd, $J=7,6, 4,5$ Hz, 1H), 3,59 (br, d, $J=9,2$ Hz, 1H), 3,33 (br, d, $J=10,5$ Hz, 1H), 3,17 (br, d, $J=4,5$ Hz, 2H), 2,12-2,06 (m, 2H), 1,56-1,25 (m, 72H), 1,40 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 1,30 (s, 3H), 1,19 (s, 3H), 1,05 (s, 9H), 0,89 (t, $J=6,7$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 170,4, 139,5-127,1 (m), 109,1, 108,1, 80,3, 77,6, 77,1, 75,7, 72,6, 71,7, 65,2, 58,9, 31,8, 29,6, 29,5, 29,3, 29,2, 28,0, 26,9, 26,6, 26,5, 26,3, 25,5, 22,6, 20,6, 14,0. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1217,7 $[M + Na]^+$, calc. anal. para $C_{76}H_{127}NO_7Si$ (1194, 90): C, 76,39; H, 10,71; N, 1,17. Encontrado: C, 76,45; H, 10,81; N, 1,21.

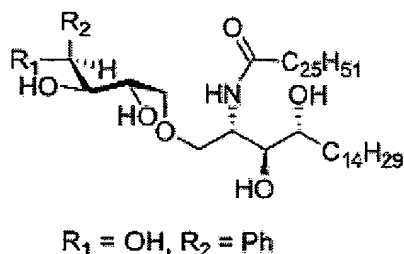
(d) O produto de (c) acima (200 mg, 0,169 mmol) em THF e solução 1,0M de TBAF (0,2 ml, 0,203 mmol), foi agitado à temperatura ambiente durante 24 horas. A mistura de reação foi então recolhida em

acetato de etila, lavada com água, então solução de salmoura saturada, e depois secada sobre MgSO_4 anidro, e concentrada. O resíduo foi purificado, via cromatografia de flash, dando



como um sólido incolor (132 mg, 82% de rendimento). $R_f = 0,42$ (4:6, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +6,7$ (c 0,5, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,41-7,32 (m, 5H), 5,68 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 4,87 (d, $J=5,5$ Hz, 1H), 4,32-3,96 (m, 5H), 3,60 (dd, $J=10,0, 3,8$ Hz, 1H), 3,39 (dd, $J=10,0, 2,5$ Hz, 1H), 3,24 (dd, $J=10,5, 5,5$ Hz, 1H), 3,14 (dd, $J=10,5, 4,0$ Hz, 1H), 2,12 (dt, $J=7,5, 3,5$ Hz, 2H), 1,54-1,25 (m, 72H), 1,43 (s, 3H); 1,41 (s, 3H), 1,38 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 0,88 (t, $J=6,7$ Hz), 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,5, 139,5, 128,3, 127,8, 126,1, 109,3, 107,9, 81,0, 77,6, 76,1, 73,0, 72,1, 71,2, 48,1, 36,9, 31,9, 29,6, 29,5, 29,3, 29,0, 27,05, 27,01, 26,4, 25,7, 22,6, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 979,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{60}\text{H}_{109}\text{NO}_7$ (956,51): C, 75,34; H, 11,49; N, 1,46. Encontrado: C, 75,40; H, 11,55; N, 1,51.

(e) Os procedimentos de 1(c) acima foram repetidos usando o produto de (d) acima, dando um sólido incolor,

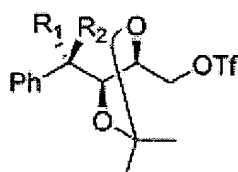


referido a seguir como Composto 14 ('4-(S)-Fenila Treitol Ceramida'), com um rendimento de 68%. RMN ^1H (600 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ

8,52 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 7,79-7,27 (m, 5H), 5,39 (d, $J=7,8$ Hz, 1H), 5,18-4,94 (m, 1H), 4,93-4,91 (m, 1H), 4,30-4,19 (m, 5H), 4,12-4,08 (m, 2H), 2,41 (br, t, $J=7,5$ Hz, 2H), 1,92-1,25 (m, 72H), 0,87 (t, $J=6,5$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (150,9 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 173,3, 114,4, 128,3, 128,1, 127,2, 76,2, 75,4, 75,2, 74,6, 72,8, 71,3, 70,0, 51,8, 36,8, 32,1, 30,3, 30,0, 29,7, 29,6, 26,6, 26,4, 22,9, 14,3. MALDI-MS (modo positivo, CHA): m/z 899,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calc. anal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{NO}_7$ (876,38): C, 74,01; H, 11,62; N, 1,60. Encontrado: C, 73,98; H, 11,59; N, 1,62.

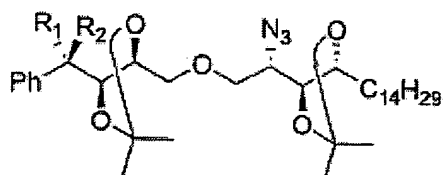
Composto 15: 4-(R)-Fenil Treitol Ceramida

(a) O procedimento de 1(a) acima foi repetido usando o produto de 14(a) acima, em que $\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{OTBDPS}$, p. ex.,



$\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OTBDPS}$

para dar

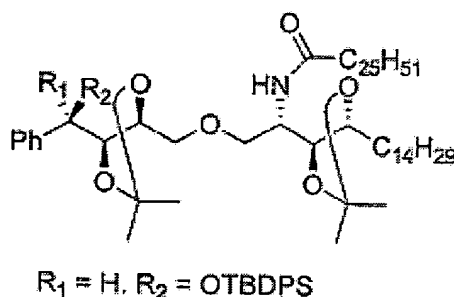


$\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{OTBDPS}, 86\%$

que foi purificado por meio de cromatografia de flash (7:9,3 acetato de etila/éter de petróleo), como um líquido incolor, com um rendimento de 86%. $R_f=0,59$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo). $[\alpha]_D^{25} = -15,0$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,76-7,14 (m, 15H), 4,82 (d, $J=6,5$ Hz, 1H), 4,21-4,06 (m, 3H), 3,86 (dd, $J=9,5, 5,5$ Hz, 1H), 3,87-3,68 (m, 3H), 3,51 (dt, $J=9,5, 2,2$ Hz, 1H), 3,34 (dd, $J=10,0, 8,5$ Hz, 1H), 1,58-1,25 (m, 26H), 1,41 (s, 3H), 1,36 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 1,04 (s, 9H), 0,87 (t, $J=6,7$ Hz). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 139,5, 136,1, 135,9, 133,6, 133,3, 129,4, 129,3, 127,88, 127,80, 127,4,

127,2, 127,1, 109,1, 108,1, 80,3, 77,7, 77,5, 77,1, 75,7, 72,6, 71,7, 59,7, 31,8, 29,6, 29,5, 29,55, 29,50, 29,47, 29,41, 29,3, 29,2, 28,0, 27,0, 26,6, 26,4, 26,3, 25,5, 25,4, 22,6, 19,3, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 865,4 $[M + Na]^+$, calc. anal. para $C_{50}H_{75}N_3O_6Si$ (842, 23): C, 71,30; H, 8,98; N, 4,99. Encontrado: C, 71,42; H, 9,07; N, 5,04.

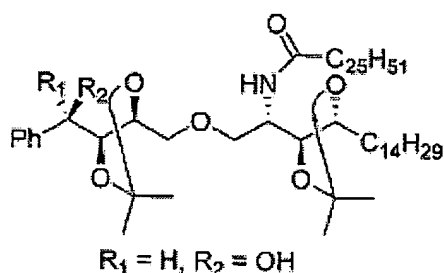
(b) Os procedimentos de 14(b) acima foram repetidos, mas usando o produto de (a) acima dando



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (1:9 acetato de etila/éter de petróleo);] o composto puro foi obtido como um sólido incolor com um rendimento de 69%. $R_f=0,49$ (1:9, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = -5,9$ (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7,77-7,18 (m, 15H), 5,88 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 4,74 (d, $J=6,5$ Hz, 1H), 4,10-4,07 (m, 3H), 3,97 (dd, $J=8,0, 6,5$ Hz, 1H), 3,77 (dt, $J=5,7, 2,2$ Hz, 1H), 3,55 (br, d, $J=9,0$ Hz, 1H), 3,27 (br, d, $J=8,5$ Hz, 1H); 3,00-2,97 (m, 2H), 2,16-2,08 (m, 2H), 1,58-1,25 (M, 72H), 1,39 (s, 3H), 1,33 (s, 3H), 1,29 (s, 3H), 1,18 (s, 3H), 1,04 (s, 9H), 0,88 (t, $J=6,5$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 172,6, 139,6, 136,1, 135,9, 133,6, 133,2, 129,4, 127,9, 127,4, 127,3, 127,2, 109,2, 107,7, 80,6, 77,7, 77,1, 76,9, 75,7, 72,0, 70,8, 49,4, 36,9, 31,9, 29,7, 29,5, 29,3, 29,2, 28,4, 27,0, 26,6, 26,4, 26,3, 25,5, 25,4, 22,6, 19,3, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1217,7 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{76}H_{127}NO_7Si$ (1194, 90): C, 76,39; H, 10,71; N, 1,17. Encontrado: C, 76,41; H, 10,75; N, 1,22.

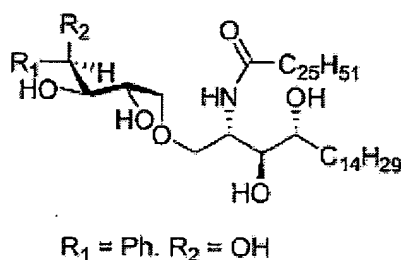
(c) Os procedimentos de 14(c) acima foram repetidos, mas

usando o produto de (b) acima dando



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (3:7 de acetato de etila/éter de petróleo), o composto foi obtido como um sólido incolor, com um rendimento de 85%. $R_f = 0,40$ (4:6, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = -3,1$ (c 0,5, $CHCl_3$). RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7,38-7,36 (m, 5H), 5,58 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 4,69 (d, $J=5,2$ Hz, 1H), 4,13-3,91 (m, 5H), 3,60 (dd, $J=9,7, 3,2$ Hz, 1H), 3,33 (dd, $J=9,7, 2,5$ Hz, 1H), 3,21 (dd, $J=10,5, 5,2$ Hz, 1H), 3,10 (dd, $J=10,5, 3,5$ Hz, 1H), 2,12 (dt, $J=7,5, 3,2$ Hz, 2H), 1,58-1,24 (m, 72H), 1,42 (s, 6H), 1,39 (s, 3H), 1,31 (s, 3H), 0,87 (t, $J=6,5$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 172,4, 139,6, 128,5, 128,3, 126,9, 109,9, 107,8, 81,9, 77,7, 77,2, 76,8, 75,9, 5 74,9, 71,7, 71,1, 48,1, 36,9, 31,9, 29,7, 29,5, 29,3, 28,9, 28,0, 27,3, 27,2, 26,4, 25,8, 25,7, 22,6, 14,1. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 979,5 $[M + Na]^+$. Calc. anal. para $C_{60}H_{109}NO_7$ (956,51): C, 75,34; H, 11,49; N, 1,46. Encontrado: C, 75,43; H, 11,48; N, 1,44.

(d) Os procedimentos de 14(d) acima foram repetidos, mas usando o produto de (c) acima dando

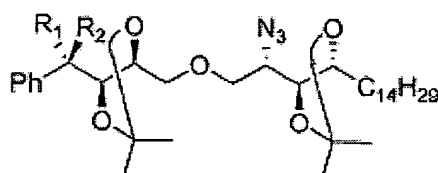


como um sólido incolor, referido a seguir como Composto 15 ('4-(R)-Fenil Treitol Ceramida') obtido com um rendimento de 60%. RMN 1H (600 MHz, C_5D_5N): δ 8,46 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 7,82-7,28 (m, 5H),

5,46 (d, $J=5,4$ Hz, 1H), 5,14-5,11 (m, 1H), 4,25-4,00 (m, 8H), 2,38 (m, 2H), 1,88-1,25 (m, 72H), 0,86 (t, $J=6,5$ Hz, 6H). RMN ^{13}C (150,9 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 173,3, 144,4, 128,4, 127,7, 127,3, 76,6, 76,2, 75,3, 74,4, 72,7, 71,2, 71,0, 51,7, 36,8, 33,8, 32,1, 30,3, 30,1, 30,0, 29,8, 29,7, 29,6, 26,6, 26,3, 22,9, 14,2. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 899,5 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{101}\text{NO}_7$ (876,38): C, 74,01; H, 11,62; N, 1,60. Encontrado: C, 74,05; H, 11,68; N, 1,65.

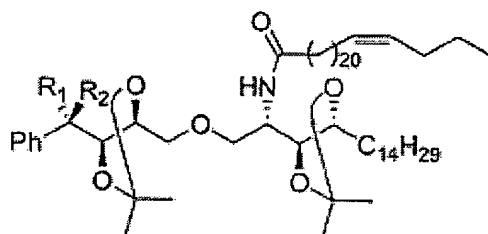
Composto 16: 4-(S)-Fenil Treitol-22-(Z)-Ceramida

(a) O procedimento de 1(b) acima foi repetido usando ácido 22-(Z)-hexacosênico com o produto de 9(b) acima, p. ex.,



$\text{R}_1 = \text{OTBDPS}$, $\text{R}_2 = \text{H}$

para dar

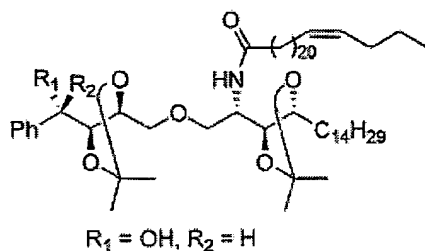


$\text{R}_1 = \text{OTBDPS}$, $\text{R}_2 = \text{H}$

que foi purificado por meio de cromatografia de flash (5: 9,5, acetato de etila:tolueno) como um sólido incolor (rendimento: 72%). $R_f = 0,53$ (5:9,5, acetato de etila: tolueno), $[\alpha]_D^{25} = + 24,6$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 7,70-7,15 (m, 15H), 5,65 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 5,36-5,31 (m, 2H), 4,83 (d, $J=4,5$ Hz, 1H), 4,17-4,06 (m, 4H), 3,84 (dd, $J=7,5, 4,5$ Hz, 1H), 3,58 (dd, $J=9,2, 2,2$ Hz, 1H), 3,38 (dd, $J=9,7, 2,1$ Hz, 1H), 3,16 (br, d, $J=4,5$ Hz, 2H), 2,13-1,94 (m, 6H), 1,61-1,17 (m, 76H), 1,04 (s, 9H), 0,91-0,83 (m, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,2, 140,3-127,0 (m, 17C), 109,2, 107,6, 81,5, 77,7, 76,8, 75,8, 75,6, 73,0, 70,9,

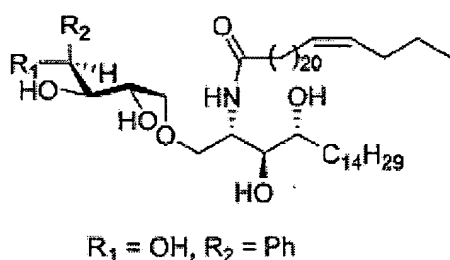
60,2, 48,1, 36,8, 31,8, 29,7, 29,6, 29,5, 29,4, 29,35, 29,31, 29,2, 28,9, 28,0, 27,15, 27,11, 27,0, 26,8, 26,4, 25,7, 25,6, 22,8, 22,6, 14,1, 13,8. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1214,3 $[M + Na]^+$.

(b) O procedimento de 14(c) acima foi repetido usando o produto de (a) acima e purificado por meio de cromatografia de flash (4:6 de acetato de etila: éter de petróleo) dando



como sólido incolor (rendimento: 98%). $R_f = 0,31$ (3:7, acetato de etila: éter de petróleo), $[\alpha]_D^{25} = +14,9$ (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7,40-7,26 (m, 5H), 5,66 (d, $J=9,0$ Hz, 1H), 5,37-5,33 (m, 2H), 4,88 (dd, $J=5,5, 2,7$ Hz, 1H), 4,23-3,96 (m, 5H), 3,60 (dd, $J=10,0, 4,0$ Hz, 1H), 3,39 (dd, $J=9,5, 2,2$ Hz, 1H), 3,23 (dd, $J=10,5, 5,2$ Hz, 1H), 3,13 (dd, $J=10,5, 4,0$ Hz, 1H), 3,09 (d, $J=2,7$ Hz, 1H), 2,12 (dt, $J=10,5, 7,5, 3,5$ Hz, 2H), 2,05-1,96 (m, 4H), 1,60-1,25 (m, 76H), 0,92-0,85 (m, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 172,4, 139,6, 130,0, 129,5, 128,2, 126,1, 109,2, 107,8, 80,9, 77,6, 76,6, 76,0, 73,0, 72,0, 71,1, 48,1, 36,8, 31,8, 29,7, 29,67, 29,60, 29,5, 29,38, 29,33, 29,27, 29,24, 28,8, 27,9, 27,1, 27,0, 26,9, 26,4, 25,69, 25,67, 22,8, 22,6, 14,0, 13,7. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 976,7 $[M + Na]^+$.

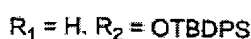
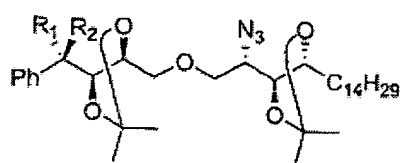
(c) O procedimento de 14(d) acima foi repetido usando o produto de (b) acima para se obter um sólido incolor



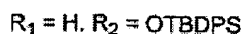
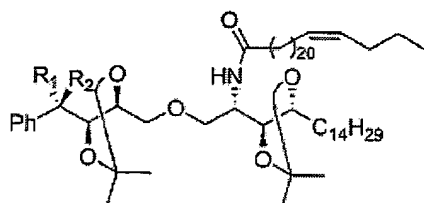
referido a seguir como Composto 16 ([±]4-(5)-Fenil Treitol-22-(Z)-Ceramida'), (rendimento: 67%). RMN ¹H (250 MHz, C₅D₅N): δ 8,43 (d, J=8,7 Hz, 1H), 7,70-7,16 (m, 5H), 5,39- 5,28 (m, 3H), 5,08-5,02 (m, 1H), 4,89-4,79 (m, 1H), 4,23-4,07 (m, 5H), 4,05-3,95 (m, 2H), 2,30 (br. t, J=7,5 Hz, 2H), 1,99-1,87 (m, 4H), 1,80-1,67 (m, 4H), 1,17-1,13 (m, 60H), 0,78-0,73 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 897,1 [M + Na]⁺. Calc. anal. para C₅₄H₉₉NO₇ (873,74): C, 74,18; H, 11,41; N, 1,60. Encontrado: C, 74,16; H, 11,49; N, 1,68.

Composto 17: 4-(R)-Fenil Treitol-22-(Z)-Ceramida

(a) O procedimento de 1(b) foi repetido usando-se ácido 22-(Z)-hexacosênico com o produto de 15(b) acima, p. ex.



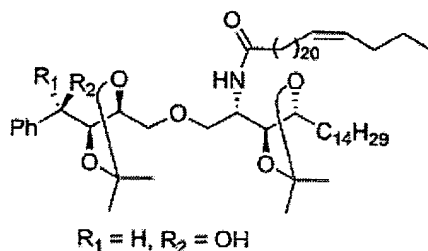
para dar



que foi purificado por meio de cromatografia de flash (5: 9,5, acetato de etila: tolueno) como um sólido incolor (rendimento: 75%). R_f = 0,57 (5:9,5, acetato de etila: tolueno), [α]²⁵_D = - 6,0 (c 1,0, CHCl₃). RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃): δ 7,75-7,18 (m, 15H), 5,68 (d, J=8,0 Hz, 1H), 5,40-5,33 (m, 2H), 4,72 (d, J=6,5 Hz, 1H), 4,12-4,00 (m, 3H), 3,93 (dd, J=8,0, 6,5 Hz, 1H), 3,79-3,72 (m, 1H), 3,53 (br. d, J=9,5 Hz, 1H), 3,24 (br. d, J=9,5 Hz, 1H), 3,02-2,91 (m, 2H), 2,16-1,96 (m, 6H), 1,60-1,25 (m, 76H), 1,04 (s, 9H), 0,92-0,85 (m, 6H). RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃): δ 172,3, 139,6-127,2 (m, 17C), 109,1, 107,7, 80,6, 77,7, 77,1, 76,9, 75,7,

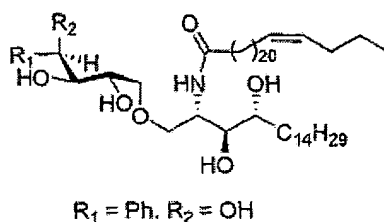
72,1, 70,8, 48,1, 36,9, 31,9, 29,74, 29,70 29,6, 29,5, 29,39, 29,35, 29,30, 29,2, 29,0, 28,0, 27,2, 26,9, 26,7, 26,4, 25,8, 25,7, 22,8, 22,6, 14,1, 13,7. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 1214,4 $[M + Na]^+$.

(b) O procedimento de 15(c) foi repetido usando o produto de (a) acima e purificado por meio de cromatografia de flash (4:6 de acetato de etila: éter de petróleo) dando



puro como um sólido incolor (rendimento: 98%). $R_f = 0,32$ (3:7, acetato de etila: éter de petróleo). $[\alpha]_D^{25} = + 5,5$ (c 1,0, $CHCl_3$). RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 7,39-7,30 (m, 5H), 5,56 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 5,37-5,32 (m, 2H), 4,68 (t, $J = 4,5$ Hz, 1H), 4,13-3,94 (m, 5H), 3,59 (dd, $J = 9,5, 3,5$ Hz, 1H), 3,32 (dd, $J = 9,5, 3,5$ Hz, 1H), 3,20 (dd, $J = 10,5, 5,2$ Hz, 1H), 3,10 (dd, $J = 10,2, 3,8$ Hz, 1H), 2,92 (d, $J = 4,5$ Hz, 1H), 2,11 (dt, $J = 10,5, 7,5, 3,5$ Hz, 2H), 2,03-1,95 (m, 4H), 1,60-1,24 (m, 76H), 0,91-0,84 (m, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 172,3, 139,6, 130,0, 129,5, 128,4, 126,9, 109,8, 107,7, 81,8, 77,6, 76,7, 75,8, 74,9, 71,7, 71,1, 48,0, 36,8, 31,8, 29,7, 29,69, 29,60, 29,5, 29,38, 29,32, 29,28, 29,27, 29,24, 28,9, 27,9, 27,29, 27,22, 27,1, 26,4, 25,7, 25,6, 22,8, 22,6, 14,0, 13,7. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 976,6 $[M + Na]^+$.

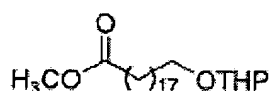
(c) O procedimento de 15(d) foi repetido usando o produto de (b) acima para se obter um sólido incolor



referido a seguir como Composto 17 ('4-(R)-Fenil Treitol-22-(Z)-Ceramida'), (rendimento: 63%). RMN ^1H (250 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$): δ 8,42 (d, $J=8,7$ Hz, 1H), 7,73-7,16 (m, 5H), 5,38- 5,30 (m, 3H), 5,05-5,00 (m, 1H), 4,19-3,98 (m, 7H), 3,92-3,86 (m, 1H), 2,28 (br, t, $J=7,5$ Hz, 2H), 1,98-1,87 (m, 4H), 1,80-1,65 (m, 4H), 1,17-1,12 (m, 60H), 0,78-0,71 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 897,4 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. Calc. anal. para $\text{C}_{54}\text{H}_{99}\text{NO}_7$ (873,74): C, 74,18; H, 11,41; N, 1,60. Encontrado: C, 74,11; H, 11,51; N, 1,66.

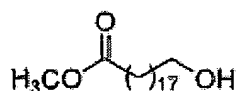
Síntese de ácido (19Z, 22Z)-Hexacosadienóico

(a) O procedimento para 'Síntese ácido 22-(Z)-Hexacosanóico', etapa (a) acima foi repetido a partir de ácido 11-bromoundecanóico dando



com 97% de rendimento. RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 4,58 (t, $J=3,2$ Hz, 1H), 3,92-3,83 (m, 1H), 3,78-3,72 (m, 1H), 3,65 (s, 3H), 3,52-3,46 (m, 1H), 3,42-3,36 (m, 1H), 2,30 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 1,88-1,15 (m, 10 H), 1,25 (br, s, 28H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 174,2, 98,7, 67,6, 62,2, 51,3, 34,0, 30,7, 29,7, 29,63, 29,60, 29,5, 29,45, 29,40, 29,2, 29,1, 26,2, 25,4, 24,9, 19,6. MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 436,1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

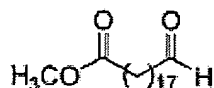
(b) O procedimento da 'Síntese ácido 22-(Z)-hexacosanóico', etapa (b) acima, foi repetido para (a) acima dando



com 98% de rendimento, RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 3,67 (s, 3H), 3,63 (t, $J=6,5$ Hz, 2H), 2,30 (t, $J=7,5$ Hz, 1H), 1,64-1,51 (m, 4H), 1,25 (br, s, 26H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 174,3, 63,0, 51,4, 34,0, 32,7, 29,63, 29,60, 29,5, 29,58, 29,56, 29,4, 29,2, 29,1, 25,7, 24,9.

MALDI-MS (modo positivo, CHCA): m/z 351,9 $[M + Na]^+$.

(c) O procedimento da 'Síntese ácido 22-(Z)-hexacosanóico', etapa (c) acima, foi repetido para (b) acima dando



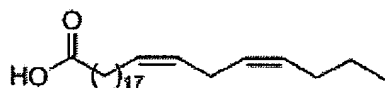
com 90% de rendimento. RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 9,76 (s, 1H), 3,66 (s, 3H), 2,39 (dt, $J=14,0, 7,5, 2,0$ Hz, 2H), 2,26 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 1,66-1,56 (m, 4H), 1,25 (br, s, 26H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 202,6, 173,4, 50,7, 43,4, 33,5, 29,29, 29,23, 29,08, 29,01, 28,9, 28,79, 28,76, 24,5, 21,6, ESI-MS (modo positivo) (326,2): 349,3 $[M + Na]^+$.

(d) O procedimento da 'Síntese ácido 22-(Z)-hexacosanóico', etapa (d) acima, foi repetido para (c) acima dando



com 98% de rendimento. RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$): δ 5,37-5,34 (m, 4H), 3,66 (s, 3H), 2,78 (t, $J=6,2$ Hz, 2H), 2,30 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 2,08-1,99 (m, 4H), 1,64-1,58 (m, 2H), 1,42-1,25 (m, 30H), 0,91 (t, $J=7,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, $CDCl_3$): δ 174,1, 130,0, 129,7, 128,0, 127,8, 51,2, 34,0, 29,64, 29,60, 29,55, 29,51, 29,4, 29,27, 29,22, 29,1, 27,1, 25,5, 24,8, 22,7, 13,7.

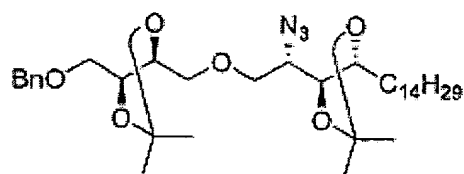
(e) O produto de (d) acima (1,23 g, 3,022 mmol) em THF (10 ml) e hidróxido de potássio 2 N (12 ml) foi aquecido em refluxo durante 8 h, e acidificado com ácido clorídrico 2 N (\sim pH 1-2). Extraído com éter de dietila (2 x 30 ml), secado e concentrado dando sólido incolor que foi recristalizado de ácido acético glacial dando cristais incolores (rendimento: 52%), e o licor-mãe foi concentrado e purificado por meio de cromatografia de flash dando



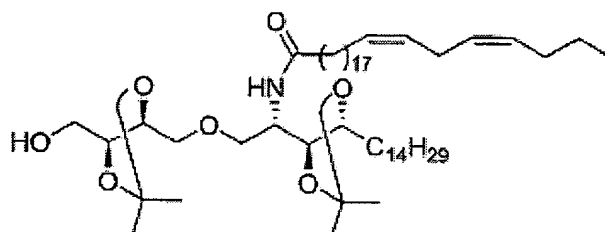
ácido (19Z,22Z)-Hexacosadienóico como cristais incolores com 42% de rendimento. RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 5,37-3,32 (m, 4H), 2,76 (t, $J=6,2$ Hz, 2H), 2,33 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 2,06-1,98 (m, 4H), 1,67-1,55 (m, 2H), 1,32-1,23 (m, 30H), 0,90 (t, $J=7,5$ Hz, 3H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 180,1, 130,1, 129,8, 128,1, 127,9, 34,0, 29,6, 29,59, 29,55, 29,4, 29,3, 29,2, 29,0, 27,2, 25,6, 24,6, 22,8, 13,8, ESI-MS (modo negativo) (392,3): 391,4 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Composto 18: Treitol-(19Z,22Z)Ceramida

(a) O procedimento de 1(b) acima foi repetido usando ácido (19Z,22Z)-Hexacosadienóico e o produto de 3(b), p. ex.



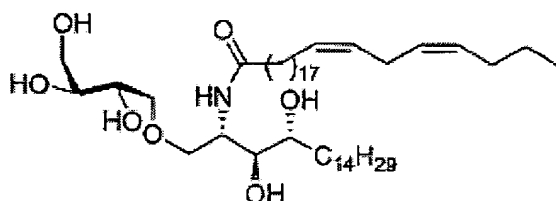
para dar



líquido incolor, que solidifica ao descansar, (rendimento: 71%). $R_f = 0,24$ (3:7, acetato de etila: éter de petróleo), $z [\alpha]_D^{25} = +13,6$ (c 1,0, CHCl_3). RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3): δ 5,73 (d, $J=9,5$ Hz, 1H), 5,43-5,33 (m, 4H), 4,24-4,15 (m, 1H), 4,08-3,99 (m, 3H), 3,92-3,86 (m, 1H), 3,80-3,65 (m, 5H), 3,60-3,54 (m, 2H), 2,77 (t, $J=6,2$ Hz, 2H), 2,14 (dt, $J=10,5, 7,5, 3,0$ Hz, 2H), 2,07-1,99 (m, 4H), 1,61-1,24 (m, 74H), 0,93-0,84 (m, 6H). RMN ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3): δ 172,5, 130,0, 129,7, 128,0, 127,8, 109,2, 107,9, 79,1, 77,6, 76,6, 76,1, 71,8, 71,6, 62,3, 48,1, 36,8,

31,8, 29,6, 29,5, 29,4, 29,36, 29,30, 29,26, 29,21, 28,9, 27,8, 27,1, 26,9, 26,4, 25,67, 25,63, 25,5, 22,7, 22,6, 14,0, 13,7. MALDI-MS (modo positivo, DHB): m/z 899,1 $[M + Na]^+$.

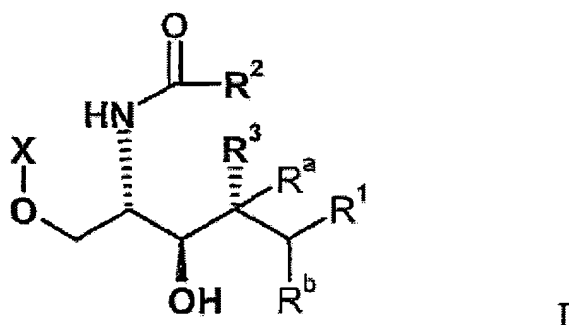
(b) O procedimento de 1(c) acima foi seguido usando o produto de (a) acima dando



sólido incolor (rendimento: 67%), referido a seguir como Composto 18 ('Treitol-(19Z,22Z)-Ceramida'). RMN 1H (250 MHz, C_5D_5N): δ 8,65 (d, $J=8,5$ Hz, 1H), 5,66-5,55 (m, 4H), 5,30-5,24 (m, 1H), 4,63-4,45 (m, 1H), 4,42-4,32 (m, 9H), 4,18 (d, $J=5,5$ Hz, 2H), 3,01 (t, $J=62$ Hz, 2H), 2,54 (t, $J=7,5$ Hz, 2H), 2,28-2,14 (m, 4H), 2,03-1,87 (m, 4H), 1,48-1,36 (m, 58H), 1,02-0,97 (m, 6H). MALDI-MS (modo positivo, Matriz CHCA): m/z 819,8 $[M + Na]^+$.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que é de fórmula I:



em que

R^1 representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal C' de CD1d humana,

R^2 representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal A' de CD1d humana, de tal forma que R^1 preencha pelo menos pelo menos 30% do volume ocupado do canal C' comparado com o volume ocupado pelo $nC_{14}H_{29}$ terminal da cadeia esfingosina da α -galactosilceramida quando ligado à CD1d humana e R^2 preenche pelo menos 30% do volume ocupado do canal A' comparado com o volume ocupado pelo $nC_{25}H_{51}$ terminal da cadeia acila da α -galactosilceramida quando ligado à CD1d humana

R^3 representa hidrogênio ou OH,

R^a e R^b representa, cada um, hidrogênio e, adicionalmente, quando R^3 representa hidrogênio, R^a e R^b em conjunto podem formar uma ligação simples,

X representa ou $-CHA(CHOH)_nY$ ou $-P(=O)(O''OCH_2(CHOH)_mY$, sendo que Y representa CHB_1B_2 ,

n representa um número inteiro de 1 a 4, m representa 0 ou 1,

A representa hidrogênio,

um de B_1 e B_2 representa H, OH ou fenila, e o outro

representa hidrogênio ou um de B_1 e B_2 representa hidroxila e o outro representa fenila,

adicionalmente, quando n representa 4, então A , em conjunto com um de B_1 e B_2 , em conjunto, formam uma ligação simples e o outro de B_1 e B_2 representa H, OH ou OSO_3H

e sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R^1 preenche pelo menos 35% do volume ocupado do canal C' como definido na reivindicação 1.

3. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que R^2 preenche pelo menos 40% do volume ocupado do canal A' como definido na reivindicação 1.

4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que R^1 representa uma cadeia de hidrocarboneto linear saturada ou insaturada contendo de 5 a 14 átomos de carbono na cadeia.

5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que R^1 representa uma cadeia de hidrocarboneto linear saturada ou insaturada contendo de 11 a 14 átomos de carbono na cadeia.

6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que R^2 representa uma cadeia de hidrocarboneto linear saturada ou insaturada contendo de 8 a 25 átomos de carbono na cadeia.

7. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um ou ambos de R^1 ou R^2 contém uma ou mais duplas ligações.

8. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 7, caracterizado pelo fato de que um ou ambos

de R^1 ou R^2 contém uma, duas ou três duplas ligações.

9. Composto de acordo com a reivindicação 7 ou reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as duplas ligações são *cis* (Z).

10. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que X representa $CHA(CHOH)_nCHB_1B_2$.

11. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que X representa $CH_2(CHOH)_nCHB_1B_2$.

12. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que n representa 1, 2 ou 3.

13. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que R^3 representa hidrogênio.

14. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que R^a e R^b , ambos, representam hidrogênio.

15. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um de B_1 e B_2 representa hidrogênio e o outro representa hidróxi.

16. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que é para uso como um medicamento.

17. Método para proteger um indivíduo mamífero contra, ou tratar, um vírus, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade farmacologicamente eficaz de um

composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15 que apresenta atividade farmacêutica contra, ou no tratamento de, um referido vírus, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma.

18. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 15 em mistura com um excipiente, carreador ou adjuvante farmacêuticamente aceitável.

FIGURA 1

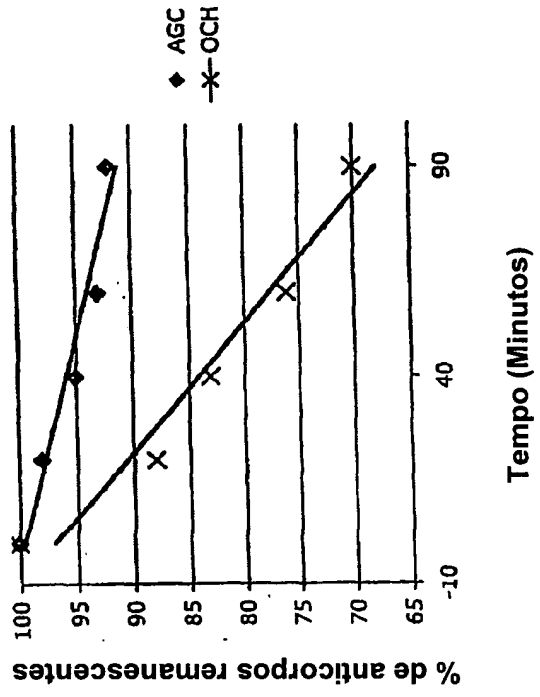


FIGURA 2

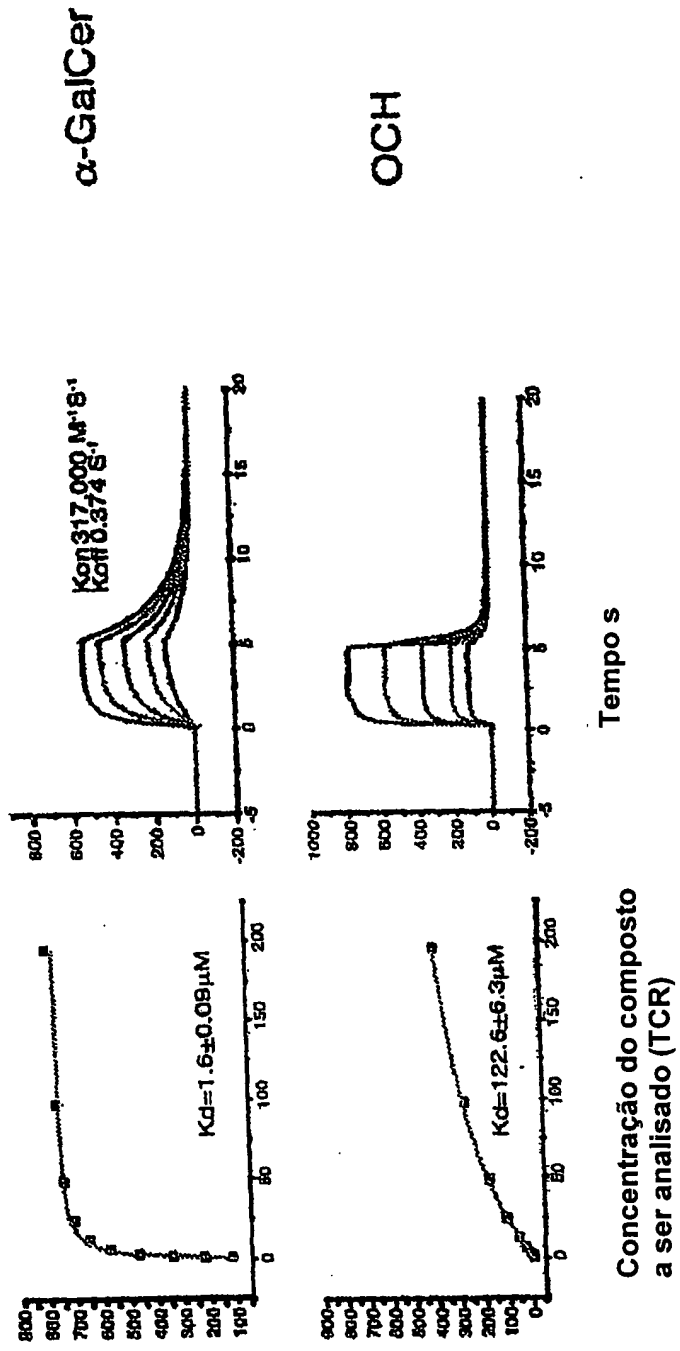
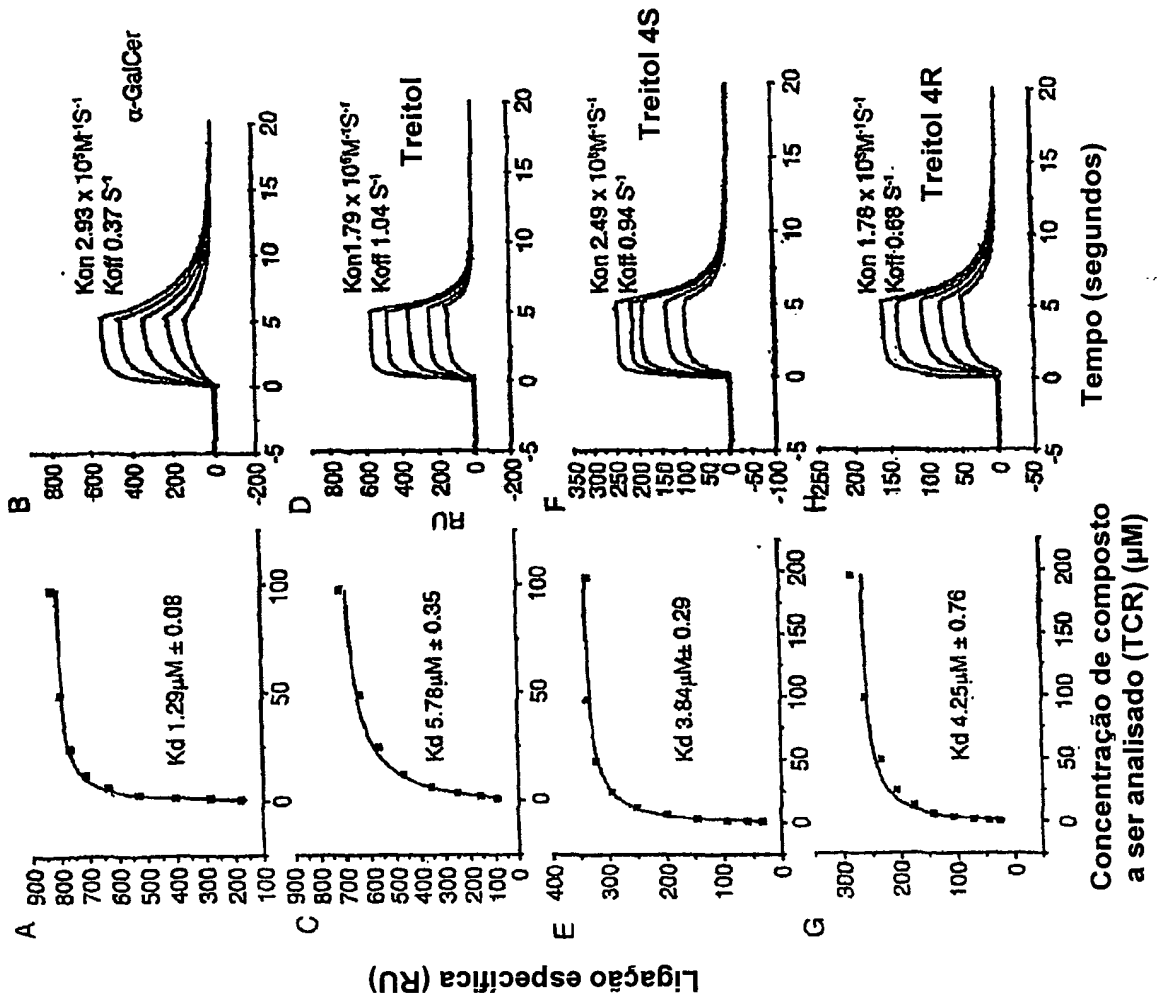


FIGURA 3



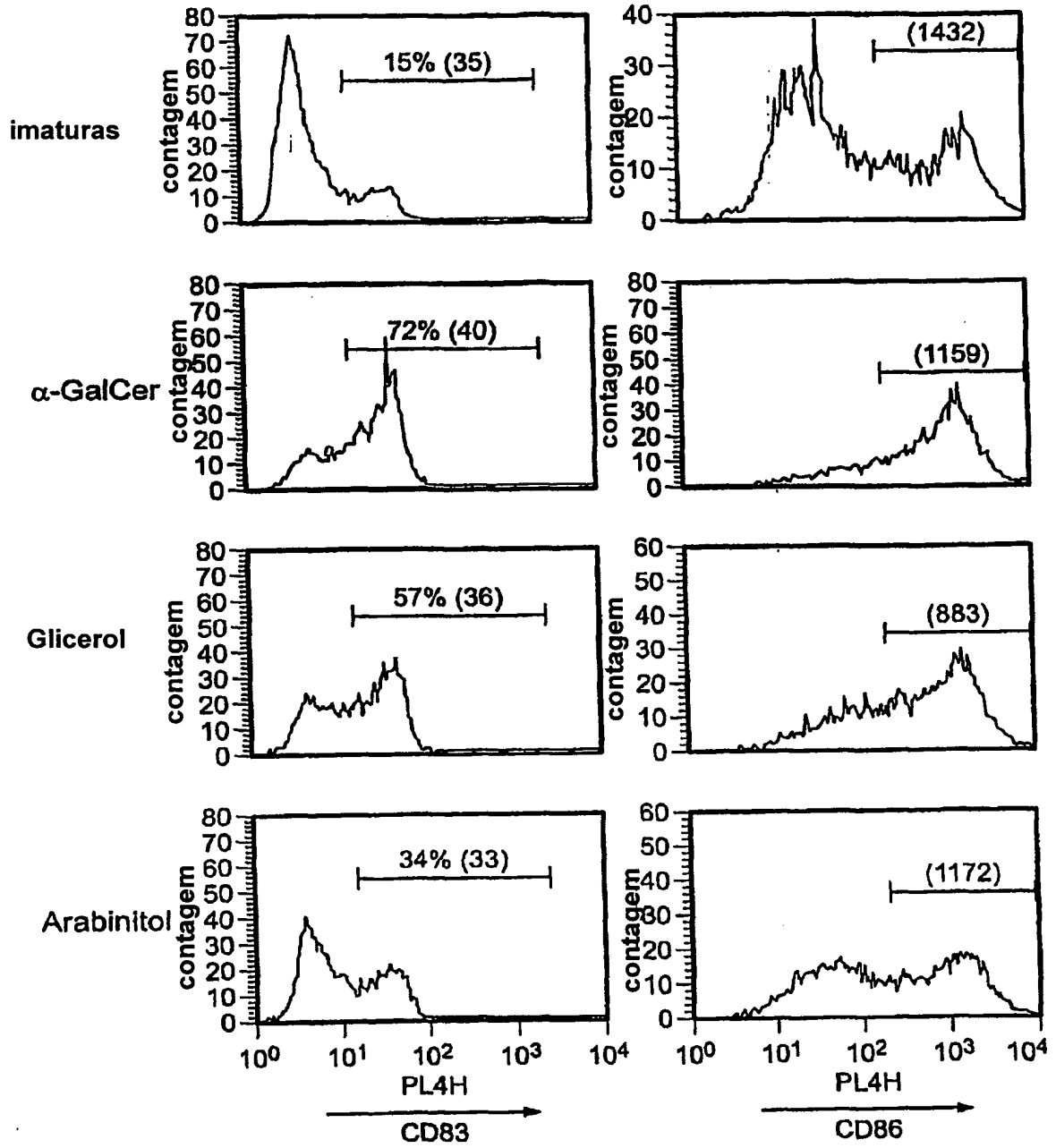


FIGURA 4A-1

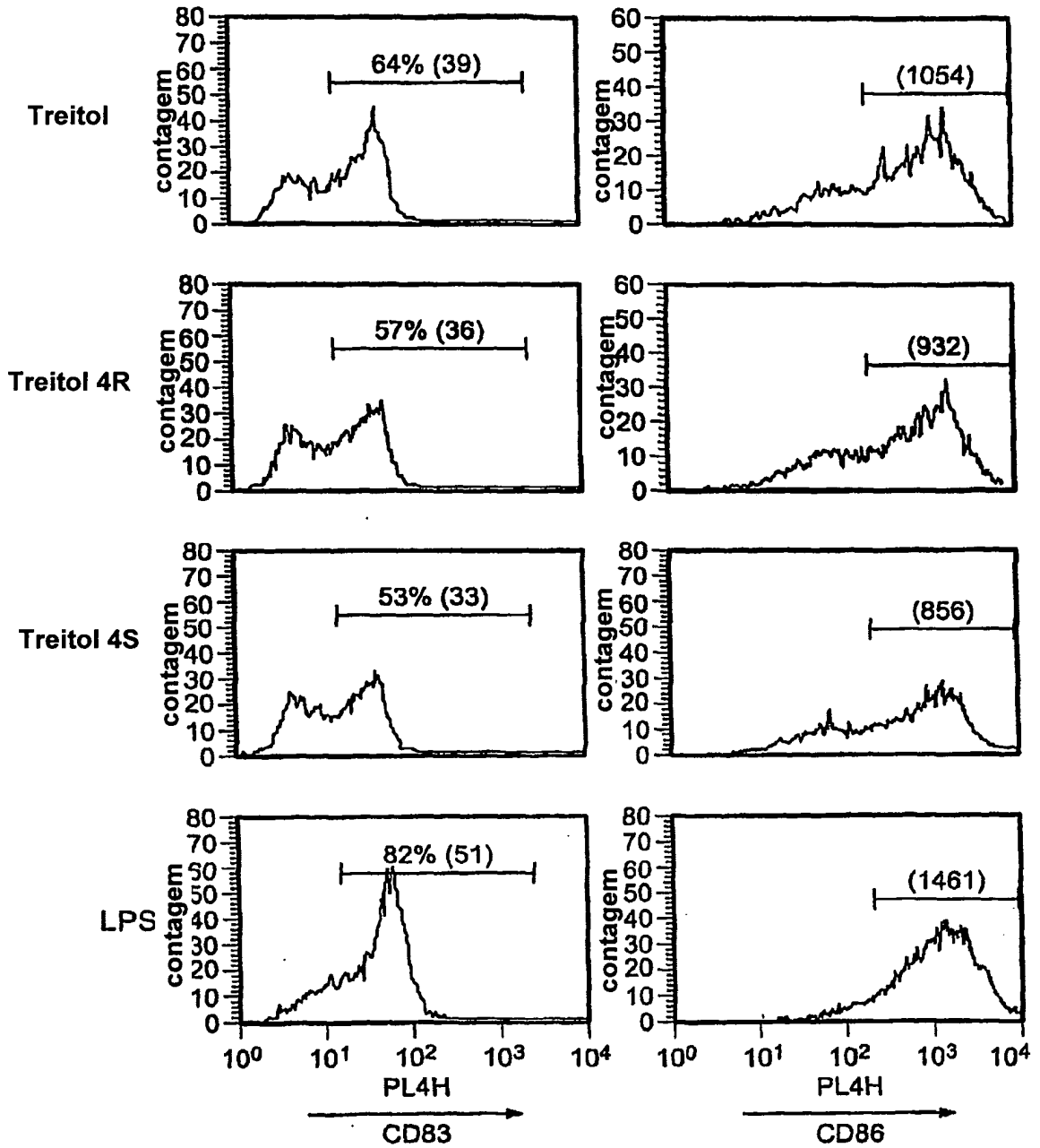


FIGURA 4A-2

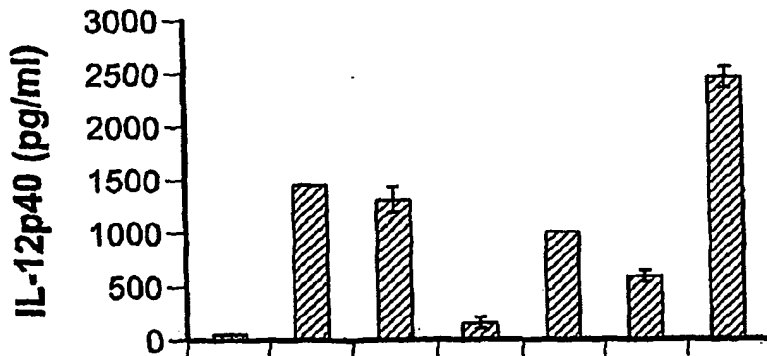


FIG. 4B

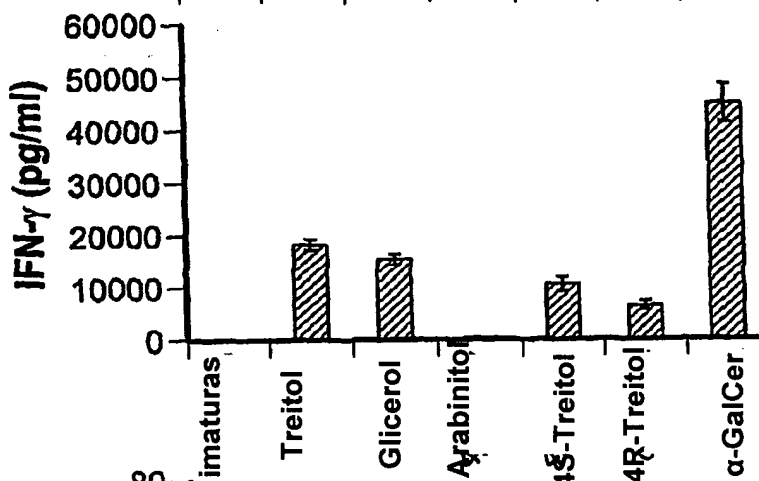


FIG. 4C

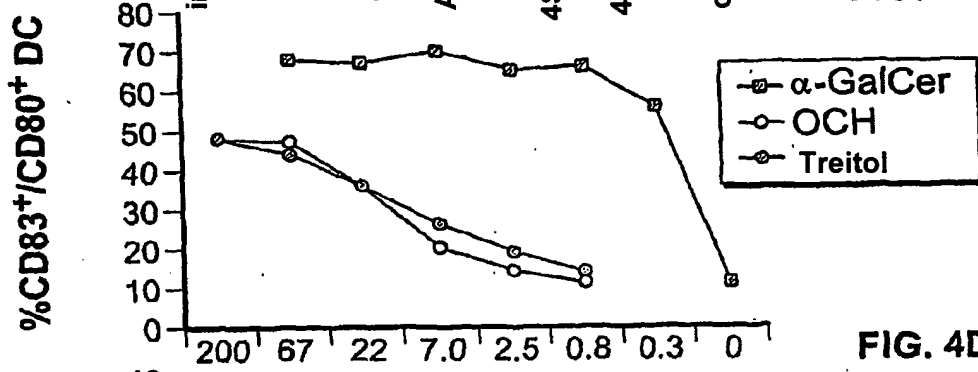


FIG. 4D

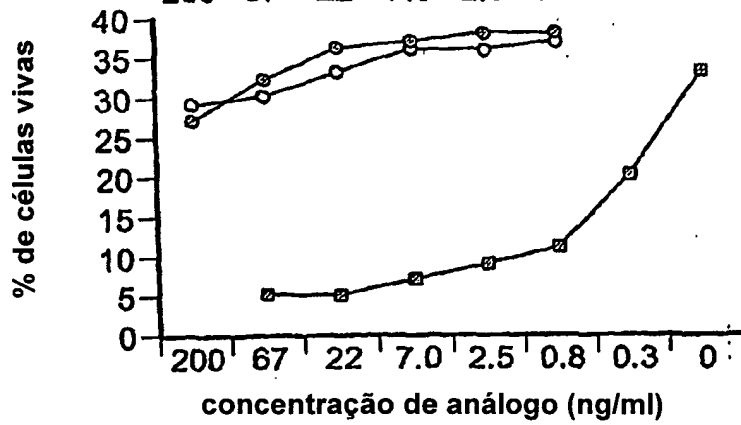
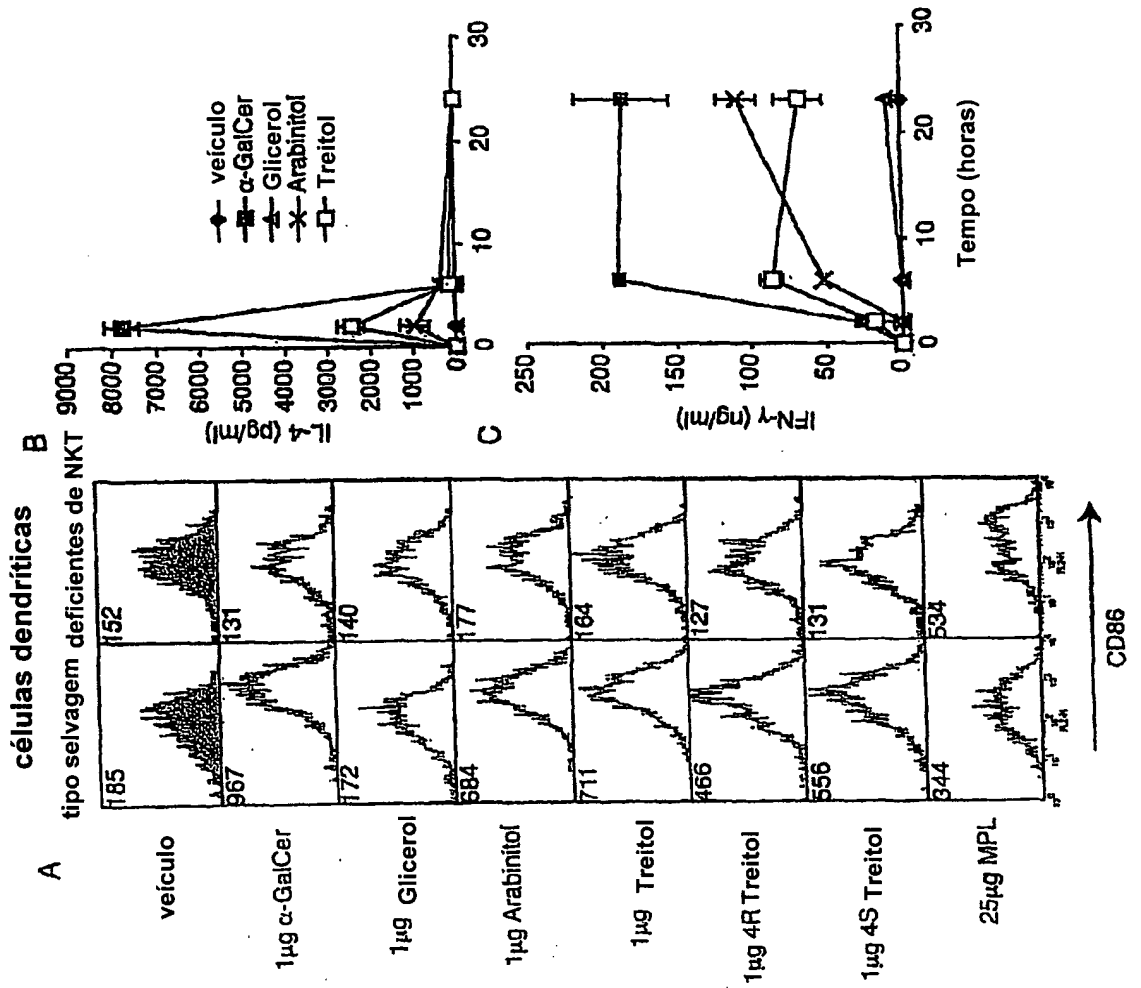


FIG. 4E

Fig 5



Células B

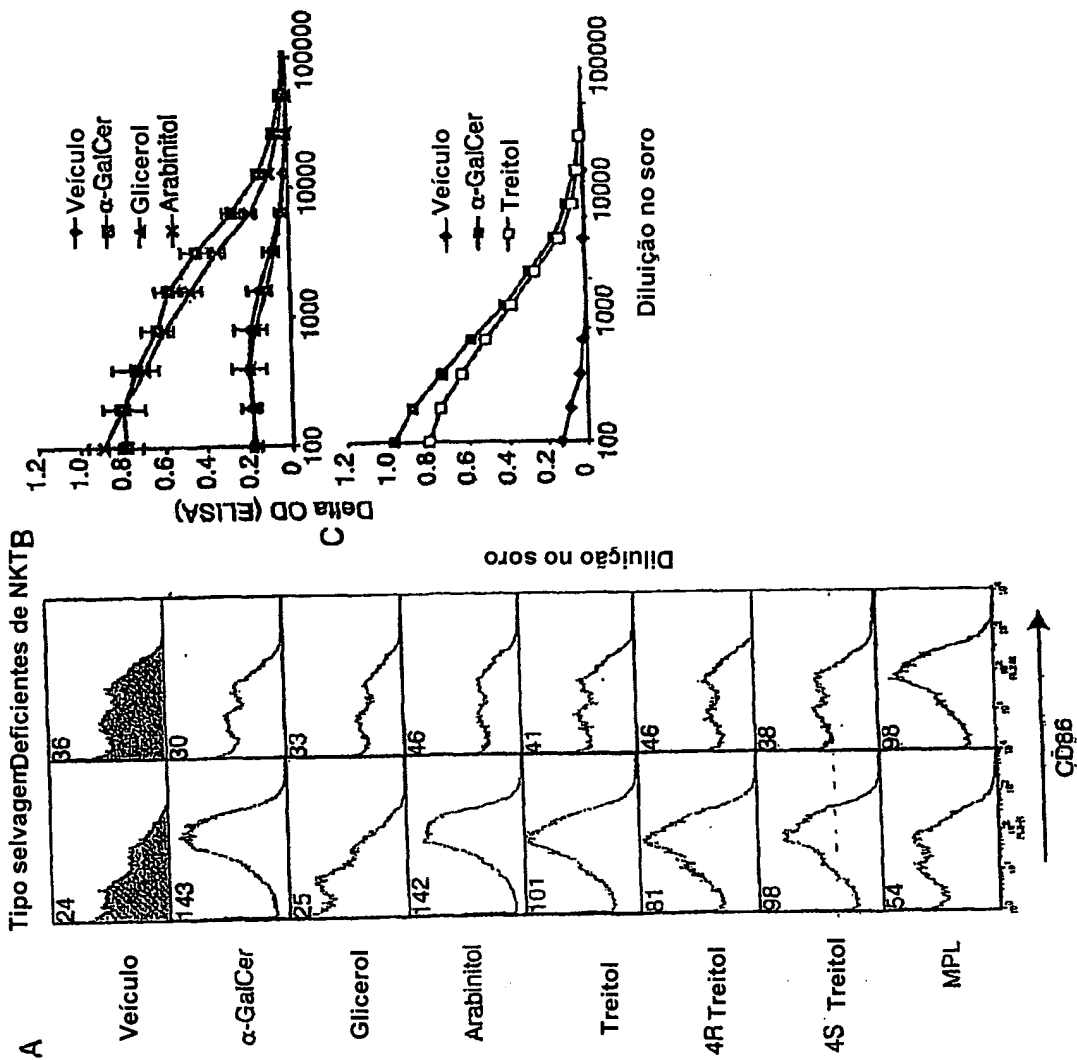


Fig 7

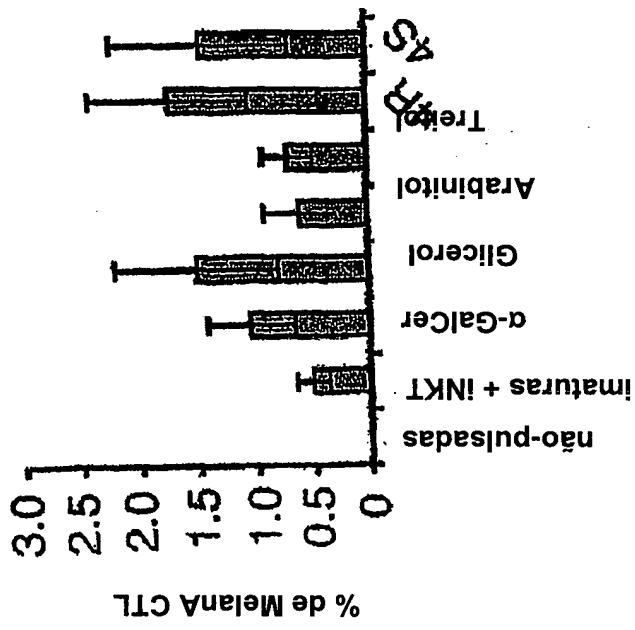
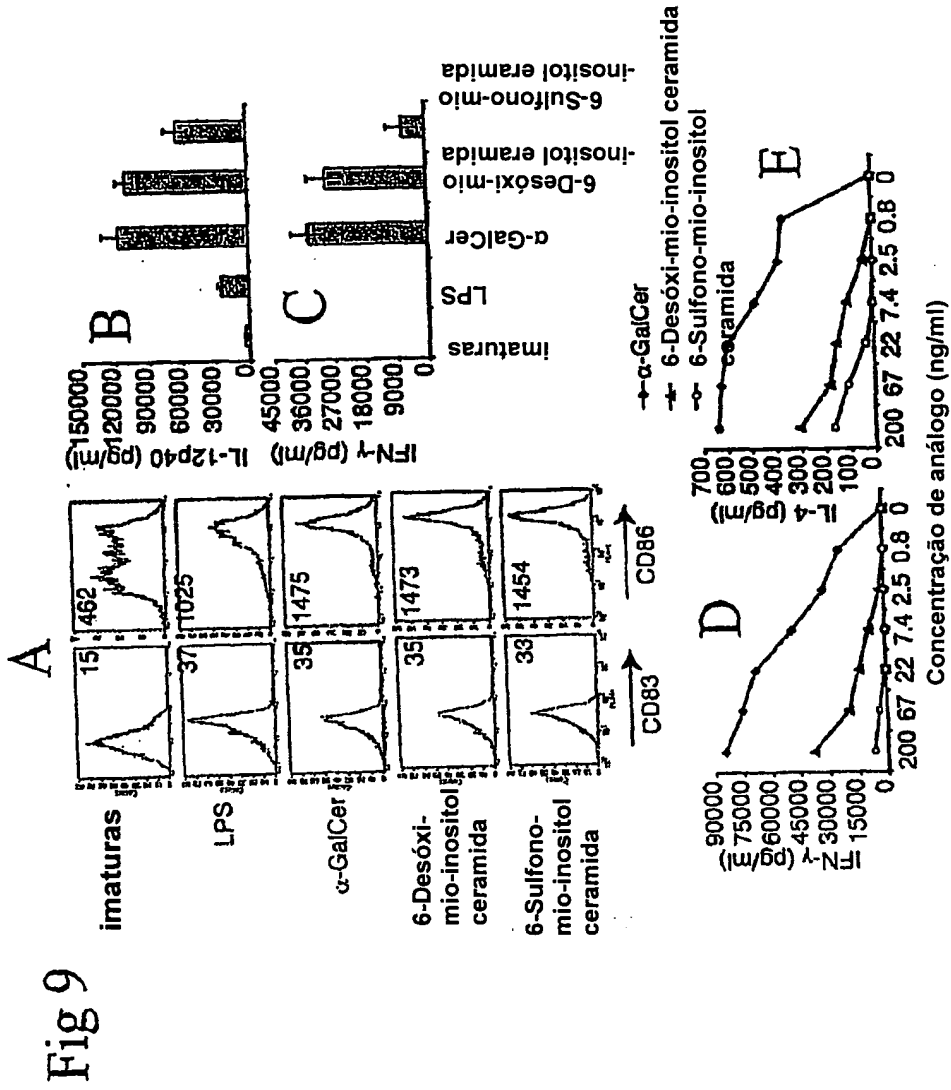
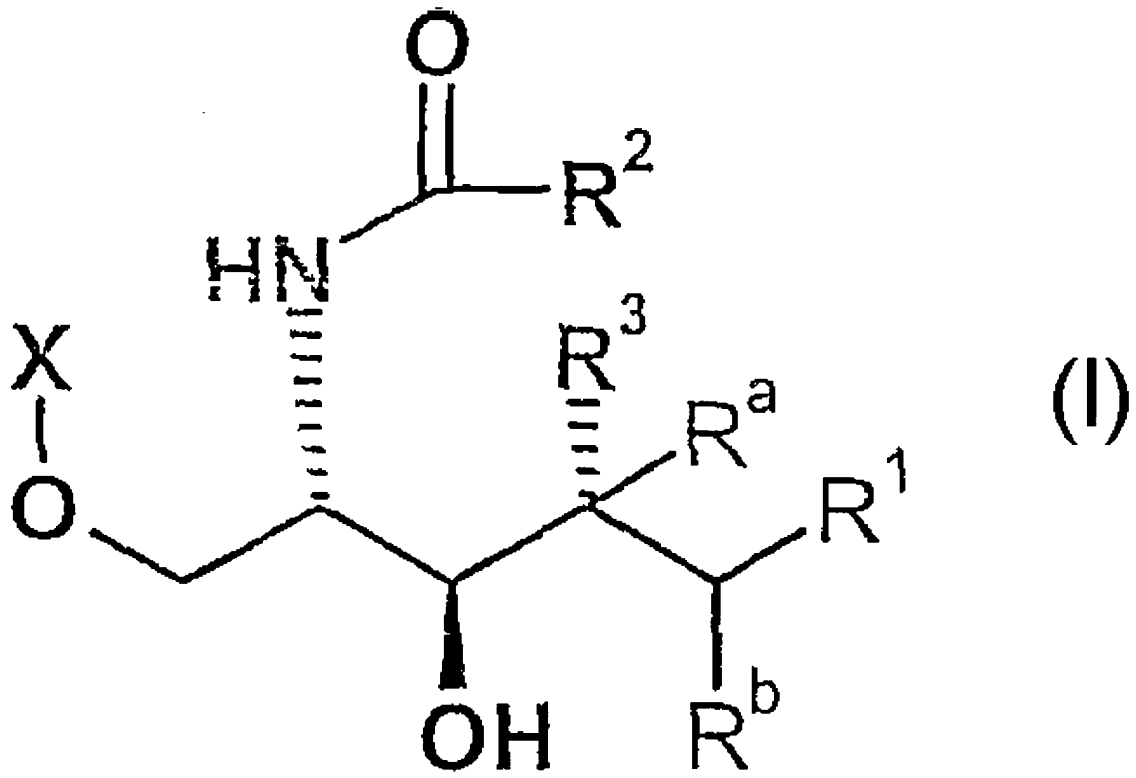


Fig 8

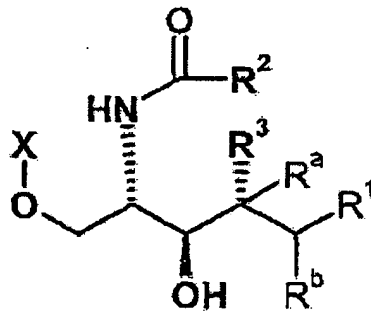




RESUMO

“COMPOSTO, MÉTODO PARA PROTEGER UM INDIVÍDUO MAMÍFERO CONTRA, OU TRATAR, UM VÍRUS, INFECÇÃO MICROBIANA, PARASITA, UMA DOENÇA AUTO-IMUNE, CÂNCER, ALERGIA OU ASMA, E, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA”

Descreve-se um composto de fórmula I,



I

sendo que R_1 representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal C' de CD1d humana, R_2 representa uma porção hidrofóbica adaptada para ocupar o canal A' de CD1d humana, de tal forma que R_1 preencha pelo menos pelo menos 30% do volume ocupado do canal C' comparado com o volume ocupado pelo $nC_{14}H_{29}$ terminal da cadeia esfingosina de α -galactosilceramida quando ligado a CD1d humana e R_2 preenche pelo menos 30% do volume ocupado do canal A' comparado com o volume ocupado pelo $nC_{25}H_{51}$ terminal da cadeia acila da α -galactosilceramida quando ligado a CD1d humana R_3 representa hidrogênio ou OH, R^a e R^b representa, cada um, hidrogênio, e, adicionalmente, quando R^3 representa hidrogênio, R^a e R^b em conjunto, podem formar uma ligação simples, X representa ou $-CHA(CHOH)_nY$ ou $-P(=O)(O^-)OCH_2(CHOH)_mY$, sendo que Y representa CHB_1B_2 , n representa um número inteiro de 1 a 4, m representa 0 ou 1, A representa hidrogênio, um de B_1 e B_2 representa H, OH ou fenila, e o outro representa hidrogênio ou um de B_1 e B_2 representa hidroxila e o outro representa fenila, adicionalmente, quando n representa 4, então A juntamente com um de B_1 e B_2 forma, em conjunto, uma ligação

simples, e o outro de B_1 e B_2 representa H, OH ou OSO_3H e sais farmacologicamente aceitáveis do mesmo; os compostos de fórmula I são indicados para uso no tratamento de um vírus, infecção microbiana, parasita, uma doença auto-imune, câncer, alergia ou asma.