



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 742**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/445** (2006.01)  
**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04793684 .4**  
96 Fecha de presentación : **29.10.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1680112**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54 Título: **N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinójirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso en el tratamiento de la resistencia a la insulina.**

30 Prioridad: **29.10.2003 EP 03078396**  
**06.07.2004 EP 04076936**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2011**

73 Titular/es: **GENZYME CORPORATION**  
**153 Second Avenue**  
**Waltham, Massachusetts 02451, US**

72 Inventor/es:  
**Aerts, Johannes, Maria, Franciscus, Gerardus**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 357 742 T3

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

## DESCRIPCIÓN

N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para el uso en el tratamiento de la resistencia a la insulina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la resistencia a la insulina en el que la síntesis de glucosilceramida y/o otros glicosfingolípidos tienen una función. La resistencia a la insulina crónica causa diabetes mellitus tipo II.

La incidencia de diabetes mellitus tipo II está aumentando espectacularmente. El defecto primario subyacente es una comprensión perjudicada de glucosa del flujo sanguíneo por músculo y tejido adiposo como el resultado de una sensibilidad reducida para movilizar los transportadores de GLUT4 a su superficie celular en respuesta a la insulina. Es ya conocido durante muchos años que concentraciones aumentadas del palmitato de ácido graso se asocian con homeóstasis de glucosa aberrante. No obstante, el mecanismo molecular por el que la lipotoxicidad causa la aparición y progresión de la diabetes es poco comprendido. Una comprensión ulterior en esta materia por lo tanto ayudará a mejorar/desarrollar medicamentos para tratar la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo II.

20 *Mecanismo molecular de lipopatogénesis*

Las actividades de investigación en glicoesfingolípidos y diabetes mellitus tipo II en el Departamento de Bioquímica del Centro Académico Médico/Universidad de Amsterdam han llevado recientemente a una nueva comprensión inesperada en la lipopatogénesis de la diabetes mellitus tipo II. El mecanismo subyacente está descrito en detalle más debajo.

*Función de glicoesfingolípidos en la resistencia a la insulina adquirida*

Una función está supuesta para (glico)esfingolípidos en la patogénesis de resistencia a la insulina. Este pensamiento proviene del hecho ignorado de que el palmitato es el bloque de construcción esencial de la fracción de ceramida en esfingolípidos: el primer paso de su biosíntesis implica la transferencia de palmitato a serina, catalizado por serina palmitoiltransferasa, véase figura 1. El índice de síntesis de esfingolípidos en el hígado es altamente dependiente de la concentración de palmitato. De manera importante, esto podría ser experimentalmente confirmado para células musculares cultivadas (células de músculo liso, mioblastos): la adición de 0.1, 0.5, 1.0 mM de palmitato en el medio de cultivo condujo a aumentos proporcionales en la síntesis de glicoesfingolípidos, como fue revelado por incorporación aumentada de serina radiomarcada en estas estructuras.

Este descubrimiento incitó un examen más detallado de la posibilidad de que en realidad los (glico)esfingolípidos median la lipotoxicidad en los músculos subyacente a la resistencia a la insulina. Ha sido destacado recientemente que GM3 (el gangliósido más simple en la superficie de la célula, véase figura 2) puede perjudicar la señalización de insulina. En este aspecto se observa que la concentración de GM3 en la superficie de la célula parece regular la absorción de glucosa en respuesta a la insulina interfiriendo negativamente con multi-agrupamiento de receptores de insulina. Por otra parte, concentraciones altas de GM3 se asocian con movilización reducida de GLUT4 a la superficie celular. Recíprocamente, la reducción de GM3 se asocia con una sensibilidad de insulina mejorada (véase Yamishita *et al.* Proc Natl Acad Sci USA (2003) 100, 3445-9 Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3; Tagami *et al.* (2002) J Biol Chem 277, 3085-92. El gangliósido GM3 participa en las condiciones patológicas de resistencia a la insulina). Postulamos que en condiciones de obesidad, los niveles de palmitato son elevados de manera crónica y que por lo tanto la formación de glicoesfingolípidos en adipocitos al igual que células musculares ocurrirá a índices aumentados, favoreciendo la resistencia a la insulina. La conexión entre concentración aumentada de palmitato en músculo como fuerza impulsora para la síntesis de glicoesfingolípidos local (incluyendo GM3) y resistencia a la insulina (véase figura 3) no ha sido aún reconocida por otros.

55 *Papel crucial de la glucosilceramida sintasa*

Se descubrió además que la concentración de GM3 y otros gangliósidos en la superficie celular depende de la actividad de la glucosilceramida sintasa (la síntesis de glucosilceramida), la etapa limitadora del índice en la síntesis de gangliósidos (véase figura 3). Esta enzima cataliza la formación de glucosilceramida de ceramida y UDP-glucosa. Los valores de Km de ambos de sus sustratos (ceramida y UDP-glucosa) están en la gama fisiológica. Mostramos que la glucosilceramida sintasa es una enzima reguladora clave respecto a la sensibilidad de insulina. Aumentos en su actividad han sido proporcionados y observados previamente en respuesta a citoquinas inflamatorias (TNF-alfa), hormonas esteroides, ácido graso saturado, e infección vírica (véase figura 4). Se ha descubierto ahora sorprendentemente que los cambios en la síntesis de glicosfingolípidos tienen un impacto en la promoción de resistencia a la insulina que puede finalmente desarrollarse en diabetes mellitus tipo II. Este descubrimiento de que la lipopatogénesis impacta en la resistencia a la insulina muestra que la inhibición de la actividad de la glucosilceramida sintasa ejerce un efecto provechoso anti-hiperglicémico.

**Resumen de la invención***Nuevo uso de inhibidores basados en iminoazúcar*

5 Se ha vuelto evidente que las desoxinojirimicinas, una categoría particular de iminoazúcares, son agentes adecuados para reducir la síntesis glicosfingolípidos por la inhibición de la síntesis de glucosilceramida. Además, la experiencia práctica ha sido obtenida con la seguridad de administración de iminoazúcar en seres humanos.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un inhibidor de glucosilceramida sintasa, dicho inhibidor siendo N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de resistencia a la insulina.

15 La glucosilceramida sintasa no es la única enzima que se inhibe por desoxinojirimicinas. De hecho varias enzimas "procesadoras de glucosa" en la superficie celular y en varios compartimentos intracelulares se inhiben por las desoxinojirimicinas (véase Butters *et al.* Chem. Rev. (2000), 100: 4683-96). Las consecuencias de administración de desoxinojirimicinas *in vivo* no siempre se correlacionan con la potencia *in vitro* contra las enzimas diana, debido a la accesibilidad diferente del fármaco a compartimentos diferentes de la célula. Por ejemplo n-butyl-desoxinojirimicina es un glicano potente que corta el inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* (sub- $\mu$ M  $K_i$ ) y sólo un inhibidor modesto de glucosilceramida sintasa (síntesis de glicosfingolípidos es inhibida sólo un 20-30% por 100 mg de TID n-butyl-desoxinojirimicina). Sin embargo, debido a la accesibilidad superior de la enzima última al fármaco (el dominio catalítico de glucosilceramida sintasa está enfrente del citosol, mientras que las  $\alpha$ -glucosidasas residen en el ER). N-butyl-desoxinojirimicina ha sido recientemente registrada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher de tipo 1 basado en su capacidad para inhibir la biosíntesis de glicosfingolípidos. Así la evaluación *in vivo* es esencial para establecer en qué medida son significantes las actividades inhibitorias potenciales de las desoxinojirimicinas.

25 Un inhibidor adecuado debería tener un valor IC50 *in vivo* para glucosilceramida sintasa inferior a 1 mM, como determinado por una medición *in vivo* de la actividad de glucosilceramida sintasa utilizando células cultivadas como se describe en los ejemplos. Preferiblemente el IC50 es inferior a 0.5 mM, más preferiblemente inferior a 0.1 mM e incluso más preferiblemente inferior a 0.05 mM.

30 Se prefiere que el inhibidor de glucosilceramida sintasa inhiba otras enzimas lo menos posible. En este contexto en particular las enzimas intestinales son de relevancia ya que inhibidores potentes de glicosidasas intestinales pueden causar dolencias intestinales severas y pueden no ser muy bien toleradas por muchos individuos. Así se prefiere que el derivado de desoxinojirimicina no sea un inhibidor potente de sucrosa intestinal, maltasa y/o lactasa. La inhibición de sucrosa, maltasa y/o lactasa que se localizan a la superficie de los enterocitos puede ser adecuadamente determinada en un ensayo *in vitro* utilizando homogenizados de intestino. Un derivado de desoxinojirimicina no se considera un inhibidor potente de sucrosa, maltasa y/o lactasa si el valor IC50 *in vitro* es 0.5 mM o más, preferiblemente superior a 1 mM, más preferiblemente superior a 2.5 mM, más preferiblemente superior a 5 mM para al menos una de sucrosa, maltasa y lactasa, preferiblemente para al menos dos de sucrosa, maltasa y lactasa, más preferiblemente para cada una de sucrosa, maltasa y lactasa como fue determinado por una medición *in vitro* de actividad de glucosidasa utilizando una preparación de membrana como se describe en los ejemplos.

45 Derivados de desoxinojirimicina mostrando un IC50 *in vivo* para glucosilceramida sintasa inferior a 1 mM y un valor IC50 *in vitro* para sucrosa, maltasa y/o lactasa, preferiblemente para al menos sucrosa, de 0.5 mM o más tienen la selectividad deseada para ser usados para el tratamiento de resistencia a la insulina con un nivel concomitante aceptable de efectos secundarios en forma de dolencias intestinales.

50 Otras enzimas que son preferiblemente inhibidas lo menos posible son la glucosilceramidasa lisosómica y enzima desramificante. Preferiblemente el valor IC50 para glucosilceramidasa, como fue establecido en células cultivadas debería exceder de 0.5 mM. Preferiblemente el valor IC50 para enzima desramificante debería exceder de 0.5 mM.

55 Un derivado de desoxinojirimicina que no se adecua para ser usado conforme a la presente invención es N-hidroxi-etil-desoxinojirimicina (miglitol). Su valor IC50 para glucosilceramida sintasa en células cultivadas excede 1mM y su valor IC50 para sucrosa está por debajo de 5 mM.

60 Derivados de desoxinojirimicina que pueden idóneamente ser usados de acuerdo con la presente invención están descritos en WO 98/02161 y J. Biol. Chem. 273, 26522-27(1998). El derivado de desoxinojirimicina comprende una cadena lateral apolar vinculada al átomo de nitrógeno de desoxinojirimicina. La cadena lateral apolar comprende una fracción grande hidrofóbica que se deriva de adamantanometanol, o, adamantanol y es capaz de insertarse en las bicapas lipídicas. La fracción grande hidrofóbica se vincula a dicho átomo de nitrógeno de la desoxinojirimicina mediante un separador que comprende un alcoxi polialquileo o cadena de polialquileo de 3 a 8 átomos de carbono. La palabra "separador" se refiere a cualquier fracción o grupo bivalente capaz de conectar un grupo hidrofóbico al átomo N de desoxinojirimicina.

65 *Diseño de un inhibidor específico*

En particular N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina; conocido precedentemente también como AMP-DNM, ha sido identificado como un inhibidor muy potente de la glucosilceramida sintasa (IC50 ~ 100 nM

en células cultivadas), que se explica por el hecho de que el moldeo molecular de la estructura enzimática revela que tiene un ajuste casi perfecto el sitio catalítico. N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina tiene varias características adicionales atractivas. Además el compuesto muestra una buena biodisponibilidad oral.

5 Por lo tanto, el derivado de desoxinojirimicina es N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina.

El presente uso se refiere al tratamiento de un individuo que sufre de resistencia a la insulina, con un medicamento comprendiendo el presente derivado de desoxinojirimicina, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 La selección de una forma de administración adecuada y formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas está incluida en las habilidades normales de las personas expertas en la técnica. Ejemplos de vías de administración adecuadas son inyecciones o infusiones parentales (intravenosa, subcutánea, intramuscular), ingestión oral, y aplicación tópica.

### 15 **Parte experimental**

Estudios en animales han indicado que N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina es bien tolerada y no supone ninguna patología abierta. En vista de ello, fue examinado si N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina es capaz de reducir los niveles de GM3 a la superficie de las células. Para este propósito, las células fueron expuestas durante 3 días a N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina, y expresión de GM3 fue evaluada por análisis FACS con un anticuerpo monoclonal específico al gangliósido. En varios tipos de células (incluyendo células musculares), la superficie de GM3 fue potentemente reducida. El valor de IC50 para la reducción de la superficie de GM3 fue aproximadamente 250 nM. Después la capacidad de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina para inhibir varias glicosidasas y glucosiltransferasas fue estudiada y comparada con aquella de otros iminoazúcares diseñados y conocidos. Como será claro de la tabla 1, N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina es, con diferencia, de todos los iminoazúcares investigados el inhibidor más potente y específico de la síntesis de glucosilceramida. Variaciones en la fracción hidrofóbica (adamantanometil, adamantanil, fenantril, colesteril y colestanil) y separador (3-8 átomos de carbono de longitud y presencia de fracción de carbonilo) indican que N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina es el inhibidor más óptimo.

Después, la capacidad de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina para inhibir la síntesis de varias glicosidasas y glucosiltransferasas fue estudiada y fue comparada con aquella de otros iminoazúcares diseñados y conocidos.

35 El valor de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina como supresor de hiperglicemia fue estudiado en modelos de ratón con obesidad.

Ratones C57BL/6J (ob<sup>-/-</sup>, db<sup>-/-</sup>, y +/+) fueron tratados por vía oral con 0, 25 o 100 mg N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina/kg de masa corporal diaria. La glucosa en sangre, ingesta de agua e ingesta de alimentos fueron controlados.

La administración de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina por alimento resultó en ratones obesos y con diabetes (dependiente de la dosis) en reducciones de glucosa en sangre e ingesta de agua. Véase Figuras 6-7. Incluso en ratones normales una pequeña reducción de la glucosa en sangre fue ya notada.

Además, una reducción más importante en glucosa miccional fue notada después de 2 semanas de tratamiento, particularmente en ratones ob<sup>-/-</sup> a la dosis máxima de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina. Véase figura 8.

50 Efectos similares a los presentados en las Figuras 5-8 fueron notados en varios experimentos independientes. Estos resultados son una prueba firme de que N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina se puede usar como un agente anti-hiperglicémico para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II.

55 En ratones FVB y C57BL/6J el efecto de administración oral de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina en (glico)esfingolípidos fue estudiada para convalidar el modo de acción de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina. Usando un método muy sensible y basado en HPLC precisa, los niveles de ceramida y de glucosilceramida en ratones tratados (100 mg de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina/kg) y no tratados unidos fueron comparados. Hígado, músculo y cerebro fueron analizados. Ningún cambio en la concentración de ceramida en cualquiera de estos tejidos fue notado. Concomitantemente la glucosilceramida del hígado fue reducida un 80% y la glucosilceramida muscular un 50%. Ningún cambio fue detectado en la concentración de galactosilceramida del cerebro. El análisis de TLC fue empleado para controlar los efectos en gangliósidos. Una reducción marcada fue notada en GM3 del hígado (véase figura 9). Una reducción fue también observada en GM3 muscular (no mostrada). Ningún cambio fue notado en gangliósidos del cerebro o sulfátido (figura 9).

65 Los descubrimientos en niveles de glicoesfingolípidos en el hígado son consistentes con el descubrimiento de que niveles en plasma de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina son 1  $\mu$ M (4 semanas 100 mg N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina/kg por vía oral, como fue determinado por el método enzimático).

Aparentemente, N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina penetra poco en el cerebro pero es capaz de alcanzar el tejido muscular.

En conclusión, los cambios en glicoesfingolípidos ejercidos por la administración oral de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina se correlacionan bien con el efecto anti-hiperglicémico del compuesto. Estos descubrimientos claramente muestran la fuerza atractiva de la presente invención.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención serán entendidos considerando los siguientes experimentos ilustrativos.

#### Ejemplo 1

En células cultivadas la mejora de señalización de insulina se revela por la expresión de superficie aumentada de GLUT4 por adipocitos y absorción de desoxiglucosa aumentada por adipocitos cultivados y células musculares bajo influencia de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina. Experimentos iniciales ya confirmaron este efecto.

#### Ejemplo 2

El aumento en sensibilidad de insulina bajo la influencia de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina en ratas alimentadas con dieta elevada en grasas y ratones obesos (deficitarias de leptina) puede ser determinado usando pinzamientos euglicémicos hiperinsulinémicos.

La realización de la función crucial de palmitato y glicoesfingolípidos en la resistencia a la insulina en músculo de pacientes de diabetes de tipo II dieron un fundamento para el desarrollo de un fármaco anti-hiperglicémico. N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina muestra características farmacológicas muy atractivas (biodisponibilidad, defecto de metabolismo) y su administración oral no supone ninguna patología abierta. De manera importante, N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina es capaz de interferir directamente en la cascada patológica disminuyendo los niveles de GM3 en el músculo de ratones. Sólo el metabolismo de glicoesfingolípidos es afectado, no lo es aquel de galactoesfingolípidos y esfingomielina. La inhibición de formación de glucosilceramida tampoco afecta las concentraciones de ceramida. La administración oral de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina resulta en la reducción deseada de glucosa en sangre y urinaria en ratones obesos que padecen de diabetes mellitus tipo II. Una prueba del concepto para el uso de N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina como agente anti-hiperglicémico fue así obtenida.

#### *Selección ulterior de iminoazúcar anti-hiperglicémico óptimo*

Otro enfoque para intervenir en la diabetes mellitus tipo II se basa en amortiguar la absorción de sacárido derivado de alimentos en el tracto gastrointestinal por inhibición de glicosidasas intestinales. Inhibidores sintéticos de sucrosa (acarbosa; n-hidroxietil-desoxinojirimicina) se basan en este concepto y son fármacos registrados contra la diabetes. N-hidroxietil-desoxinojirimicina es el agente más potente contra la diabetes que ejerce su actividad a través de la inhibición de sucrosa.

La gran desventaja de los inhibidores sintéticos potentes de glicosidasas intestinales como N-hidroxietil-desoxinojirimicina y acarbosa es, no obstante, que ellos pueden causar dolencias severas intestinales. Una inhibición potente de glicosidasa intestinal resulta en acumulación de azúcares osmóticos activos en el lumen gastrointestinal y favorece el crecimiento enterobacteriano, ambos contribuyendo a espasmos y diarrea. Los inhibidores potentes de glicosidasa intestinal N-hidroxietil-desoxinojirimicina y acarbosa no son por lo tanto muy bien tolerados por muchos individuos, dando como resultado una adaptabilidad pobre y aplicación limitada.

Puesto que una inhibición moderada de glicosidasas intestinales puede ejercer un efecto adicional provechoso en individuos con diabetes mellitus tipo II sin causar las dolencias intestinales indeseadas provocadas por inhibidores potentes, los iminoazúcares fueron examinados en este aspecto. Se descubrió que N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina es también capaz de inhibir la sucrosa intestinal (IC<sub>50</sub> -4.5 mM). La inhibición es, no obstante, mucho menos fuerte que la ejercida por N-butil desoxinojirimicina y N-hidroxietil-desoxinojirimicina. Descubrimientos similares fueron hechos respecto a la inhibición de maltasa-glicoamilasa. Nuevamente N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina se comportó favorablemente al compararse con N-hidroxietil-desoxinojirimicina y N-butil-desoxinojirimicina. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 10.

#### *Criterios usados para identificar un agente de iminoazúcar adecuado para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II*

Para identificar el agente más deseable basado en iminoazúcar para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II, el siguiente conjunto de criterios fue usado: el compuesto debería ser altamente biodisponible al ser administrado por vía oral (favoreciendo un carácter hidrofóbico como mostrado por N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina); el compuesto debería ser un inhibidor potente de glucosilceramida sintasa; el compuesto debería ser específico e inhibir mal la glicosidasa lisosómica, alfa-glucosidasa y glucosilceramidasa; el compuesto no debería ser un inhibidor agresivo de sucrosa intestinal; y el compuesto debería ser metabólicamente inerte. El cumplimiento de este criterio resulta en un agente anti-hiperglicémico bien tolerado, seguro y eficaz.

## ES 2 357 742 T3

La N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina usada de acuerdo con la presente invención reúne este criterio. N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina resultó ser un agente óptimo. Ellos son más atractivos que N-butil-desoxinojirimicina y N-hidroxietil-desoxinojirimicina en virtualmente cada aspecto.

### 5 *Producción de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina y otros iminoazúcares*

Todos los iminoazúcares N-sustituidos fueron sintetizados según el procedimiento general descrito en J. Biol. Chem, 273, 26522-27 (1998).

### 10 *Ensayos de actividad enzimática*

#### *Medición in vivo de la actividad de glucosilceramida sintasa utilizando células cultivadas*

Células (células de melanoma, fibroblastos o macrófagos) se cultivan en una incubadora de CO<sub>2</sub> en matraces de 15 25 cm<sup>2</sup> conteniendo 3 ml de medio RPMI con 50 mM de HEPES. Se añade 5 nmol de C6-NBD-Ceramida durante 1 hora. Las siguientes células son lavadas y recogidas por tripsinización. Los lípidos son extraídos y analizados después de HPTLC exactamente como se ha descrito anteriormente (van Weely S, Brandsma M, Strijland A, Tager JM, Aerts JM. Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease. Biochim Biophys Acta. 1993 Mar 24; 1181(1):55-62). La conversión de C6-NBD-Ceramida a C6-NBD-Glucosilceramida es una medida directa para la actividad de glucosilceramida sintasa. De forma similar la actividad 20 de glucosilceramida *in vivo* fue medida como se describe en J. Biol. Chem, 273, 26522-27 (1998).

Los valores de IC<sub>50</sub> de los inhibidores se determinan mediante la realización del ensayo descrito con células incubadas con cantidades variables del compuesto evaluado.

#### 25 *Medición in vitro de la actividad de glucosidasas utilizando una preparación de membrana*

Las actividades de sucrosa, lactasa y maltasa fueron determinadas usando membranas intestinales de rata recién aisladas. Homogenizados de membrana fueron preparados por lavado extensivo y homogenización usando una soni- 30 cación de Potter y de ultrasonido. Los homogenizados de membrana fueron incubados a 0.5 M fosfato potásico (pH 6.5) durante 120 min a 37°C con bien 25 mM de sacarosa, 25 mM de lactosa o 25 mM de maltosa. Las reacciones fueron detenidas por exposición de la muestra durante 2 minutos a 100°C. Después del centrifugado el contenido de glucosa del sobrenadante fue determinado espectrofotométricamente a 550 nM usando el procedimiento de GOD-PAP (Merck) según las instrucciones del fabricante.

#### 35 *Enzima desramificante*

La medición de la actividad de la enzima desramificante se basa en la determinación de la liberación de glucosa de dextrina límite. Como fuente enzimática se usan eritrocitos ya que ellos no contienen otras enzimas que puedan 40 degradar glicógeno o dextrina límite. La solución de sustrato es 0.9% de dextrina límite en tampón de sustrato (0.15 M de His/NaOH (pH 6.5) + 1 mM de EDTA). La mezcla del ensayo es como sigue. Eritrocito homogeneizado (20 ul), solución de sustrato (40 ul). Incubación durante 24 horas a 37°C. Reacción detenida tras 2 minutos de ebullición. Centrifugado durante 10.min a 10.000 r.p.m. El contenido de glucosa de una alícuota del sobrenadante se determina 45 con un equipo comercial (Sigma).

#### *Determinación de valores de IC<sub>50</sub>*

Los valores de IC<sub>50</sub> fueron determinados exponiendo preparaciones enzimáticas a varias diluciones de iminoazú- 50 cares y determinando la concentración en la que la actividad enzimática fue reducida al 50%.

#### *Análisis de lípidos*

Los lípidos fueron extraídos de tejido y plasma siguiendo el procedimiento bien conocido de Bligh & Dyer.

55 La fase (de cloroformo) inferior fue secada bajo vapor de nitrógeno. El residuo de lípido total fue desacetilado en 0.5 ml de NaOH 0.1 M en metanol en un horno de microondas SAM-155 durante 20 minutos al 75% de energía máxima. Posteriormente los lípidos fueron extraídos según el procedimiento de Folch, y la fase de cloroformo fue secada y los lípidos fueron resuspendidos en 250 ul de metanol. Glicolípidos desacetilados fueron derivatizados con O-ftalato y sometidos a cromatografía en fase líquida de alto rendimiento. El análisis de HPLC fue realizado usando 60 una columna C18 de Hypersil BDS con un sistema de solvente de metanol: 0.1 M de ácido bórico pH 3.8 (87.5:12.5, v/v).

La fase superior de la extracción de Bligh & Dyer fue usada para la detección de gangliósidos. Para este pro- 65 pósito, la fase superior fue secada y el residuo fue absorbido en 1 ml de NaCl 0.1M, pH 4.0. La solución fue pasada a través de un cartucho C18 Sep-Pak, lavada con agua y los gangliósidos fueron eluidos de forma cuantitativa con cloroformo:metanol (1:1). Gangliósidos individuales fueron separados en placas de sílice HPTLC usando cloroformo:metanol:agua (55:45:10 v/v/v) conteniendo 0.2% de cloruro de calcio. Gangliósidos fueron posteriormente visualizados pulverizando con la tinte de orcinol y cuantificados por densitometría.

## ES 2 357 742 T3

### Cultivo celular

Células (células de músculo liso transformadas, mioblastos, fibroblastos y hepatocitos de rata recién aislados) fueron cultivadas en medio RPMI en presencia del 10% suero de ternero fetal.

### Animales

Ratones (obeso-lep<sup>ob</sup> (C57B1/6)laHsd-Lep<sup>ob</sup>); diabetes lepr<sup>db</sup> (C57B1/6KsOlaHsd - Lepr<sup>db</sup>); tipo salvaje (C57B1/6J OlaHsd) y tipo salvaje FVB (FVB/NHanHsd) fueron obtenidos de Harlan Nederland. Los animales fueron alimentados con dieta AM-II con o sin N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina (Hope Farms Netherlands). Los ratones fueron mantenidos en grupos de cinco en cada jaula. El consumo de agua y la ingesta de alimentos fueron determinados tres veces por semana por jaula. La masa corporal de animales individuales fue determinada tres veces por semana. La glucosa en plasma fue determinada con el método de GOD-PAP (Merck), y la glucosa en la orina fue determinada usando tiras reactivas de GLUKETUR (Roche).

TABLA 1

valor de IC50 (µM) para inhibición de:						
Iminoazucar	GCsintasa	GlcCer-asa	Enzima desramificante	Sucrosa	Maltasa	Lactasa
	in vivo#	in vivo*				
N-butyl-desoxinojirimicina	35	2000	>500	500	>25000	9000
AMP-DNM	0.3	1200	>500	4500	>25000	18000
N-hidroxietil-desoxinojirimicina	No inhibitorio a 1 mM	Nd	Nd	100	Nd	Nd

#:GC sintasa fue determinada en células intactas que fueron alimentadas con C6-NBD-Cer y para la cual la formación de C6-NBD-GlcCer fue controlada.  
 \*GlcCer-asa fue determinada en células intactas que fueron alimentadas con C6-NBD-Glcer y para la cual la formación de C6-NBD0Cer fue controlada.  
 AMP-DNM: N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina  
 nd: no determinado

Los valores de IC50 (es decir, concentraciones de inhibidor dando como resultado 50% de inhibición) fueron determinados por variación de concentraciones de inhibidor. Nota: N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina penetra pocos lisosomas en células intactas y los valores de IC50 para la inhibición de glicosidasa lisosómica (glucocerebrosidasa, alfa-glucosidasa ácida) son al menos 20 veces superiores a los valores *in vitro*.

### Leyendas de las figuras

Figura 1: Vista de conjunto de formación de GM3: índice límite son palmitato y conversión de ceramida + UDP-glucosa a glucosilceramida.

Figura 2: Biosíntesis de glico esfingolípidos más importantes.

Figura 3: Concepto de músculo con lipo-patogénesis en diabetes mellitus tipo II: función reguladora clave para glucosilceramida sintasa.

Figura 4: Factores de riesgo para diabetes: promotores de formación GlcCer.

Figura 5: Efecto de administración diaria oral de x mg N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina/kg en ratones C57B16 (medias de 5 animales) (MZ-21= N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina).

Figura 6: Efecto de administración diaria oral de x mg N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina/kg en ratones C57B16 0b-/0b-(medias de 5 animales).

Figura 7: Efecto de administración diaria oral de x mg N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina/kg en ratones C57B16 db-/db-(medias de 5 animales).

Figura 8: Efecto de administración diaria de MZ21 en glucosa miccional después de 2 semanas de tratamiento.

Figura 9: Cambios en gangliósidos en tejidos de ratones tratados con N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina (2 semanas 100 mg/kg).

Figura 10: Estructuras de las citadas desoxinojirimicinas N-sustituidas.

## ES 2 357 742 T3

### REIVINDICACIONES

5 1. Uso de N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de resistencia a la insulina.

2. Uso según la reivindicación 1 donde N-(5-adamantano-1-il-metoxipentil)desoxinojirimicina, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es un inhibidor de glucosilceramida sintasa.

10 3. Uso según la reivindicación 1 o 2 donde el medicamento es para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II.

4. Uso según la reivindicación 1 - 3 donde el medicamento debe ser administrado por vía oral.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig 1

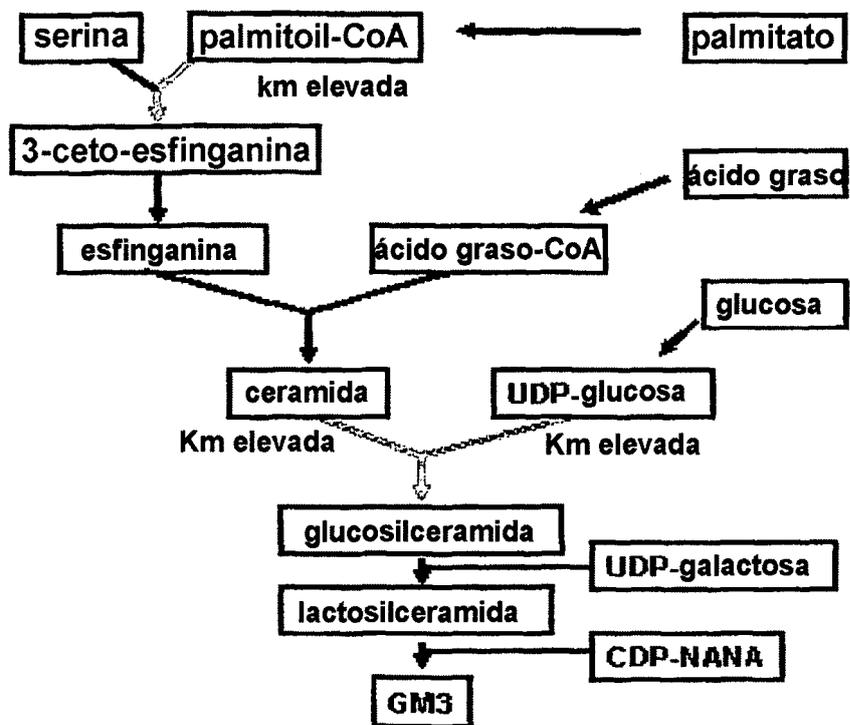


Fig 2

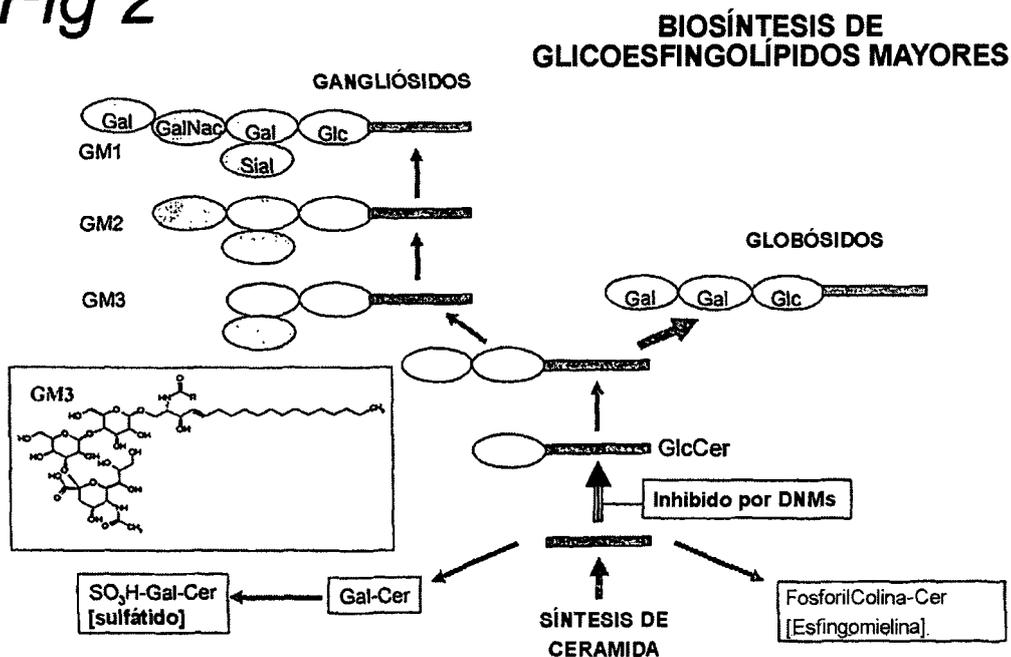


Fig 3

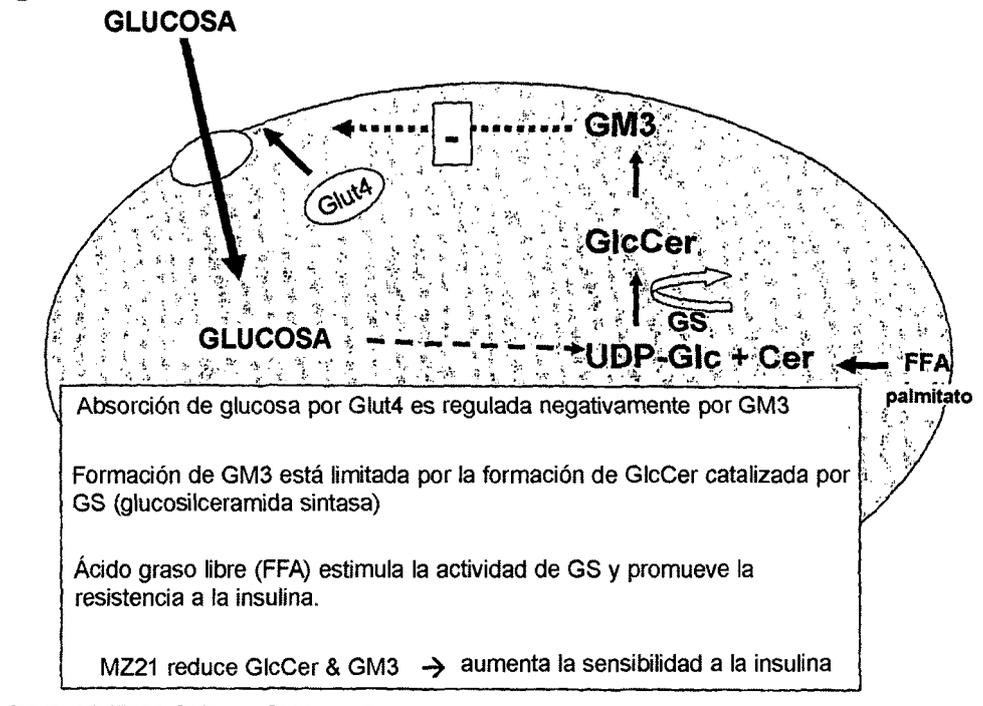


Fig 4

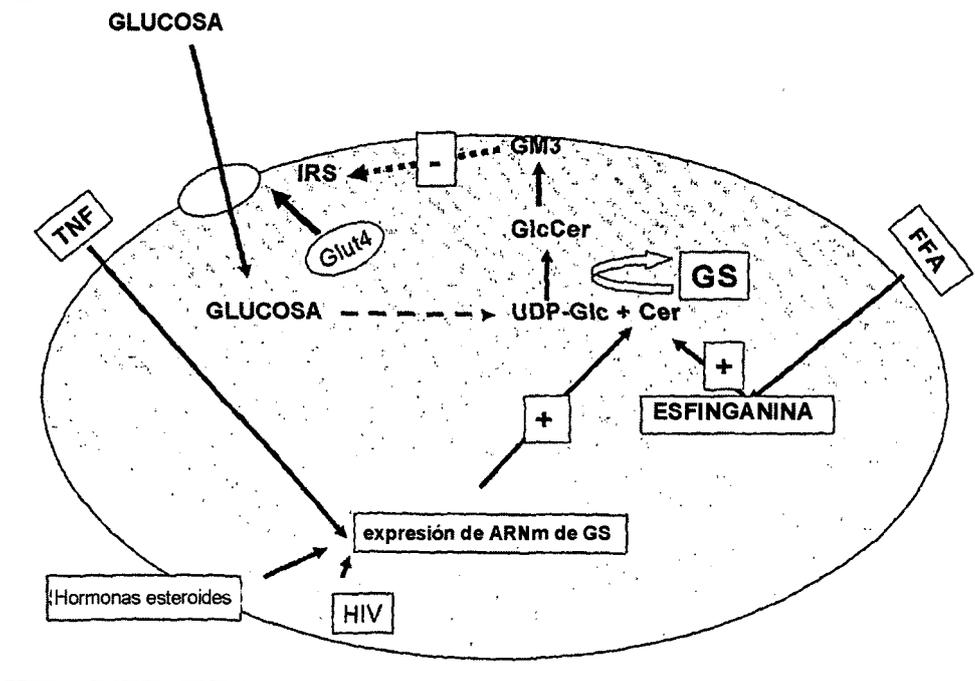


Fig 5

**Ratones BL/6J:**  
Cambios en glucosa en sangre,  
ingesta de agua e ingesta de alimento  
después de MZ21 oral diario

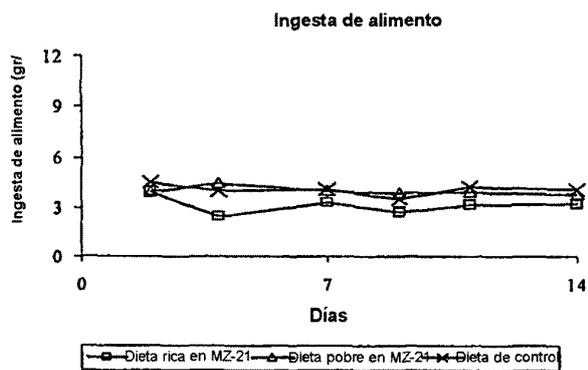
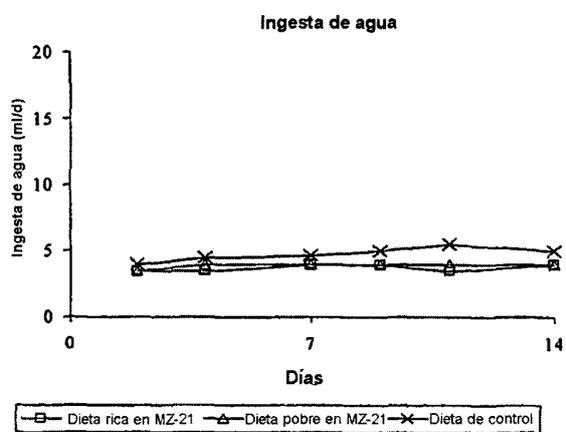
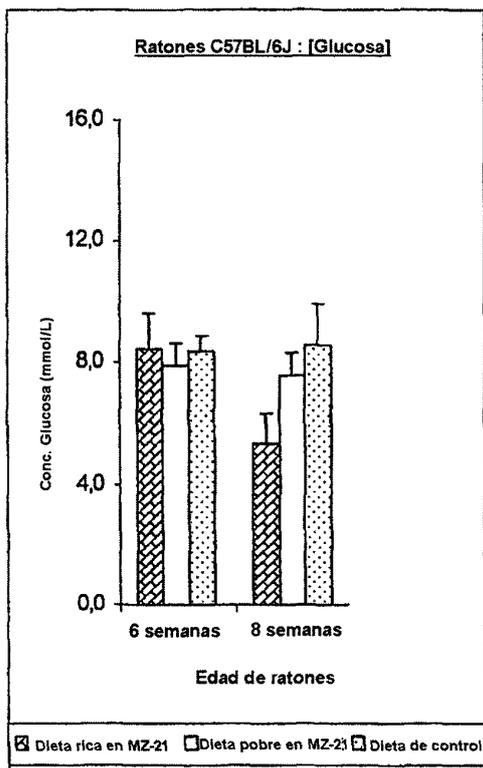


Fig 6

**Ratones Ob:**  
Cambios en la glucosa en sangre,  
ingesta de agua e ingesta de alimento  
después de MZ21 oral diario

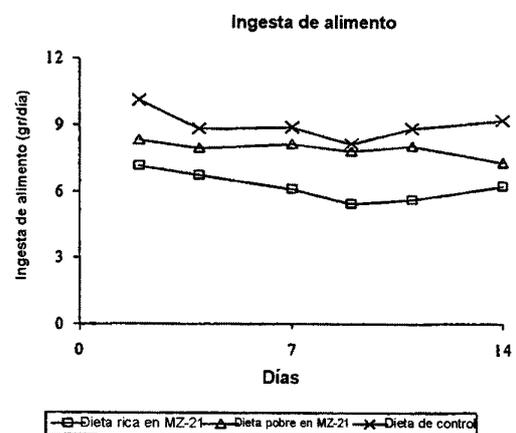
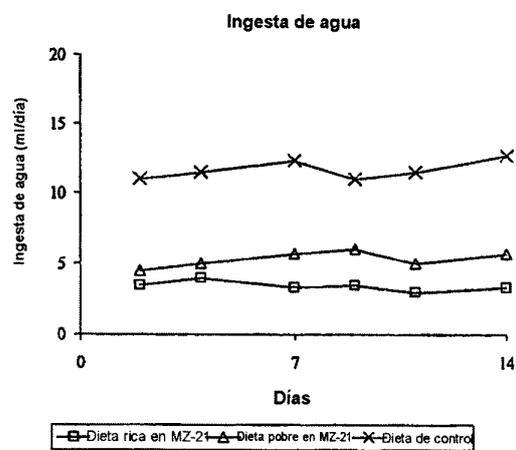
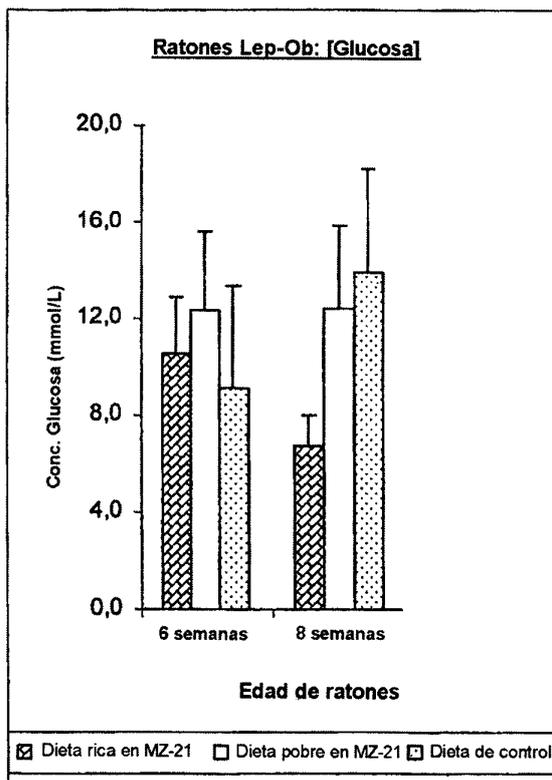
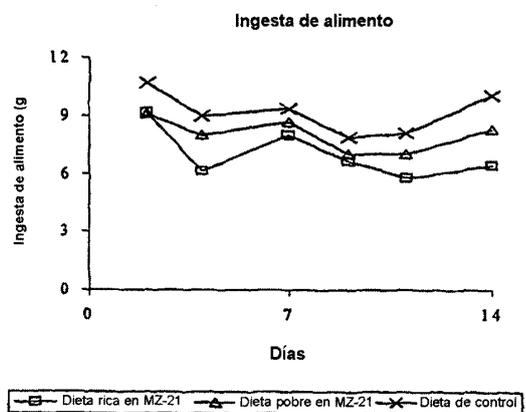
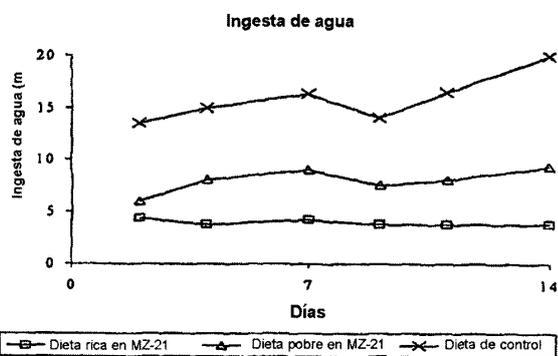
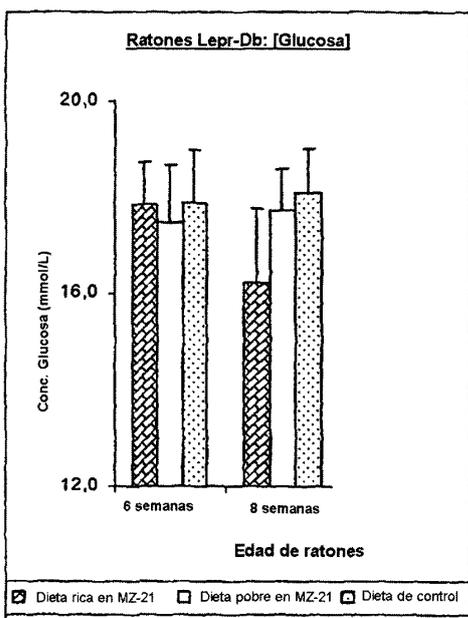


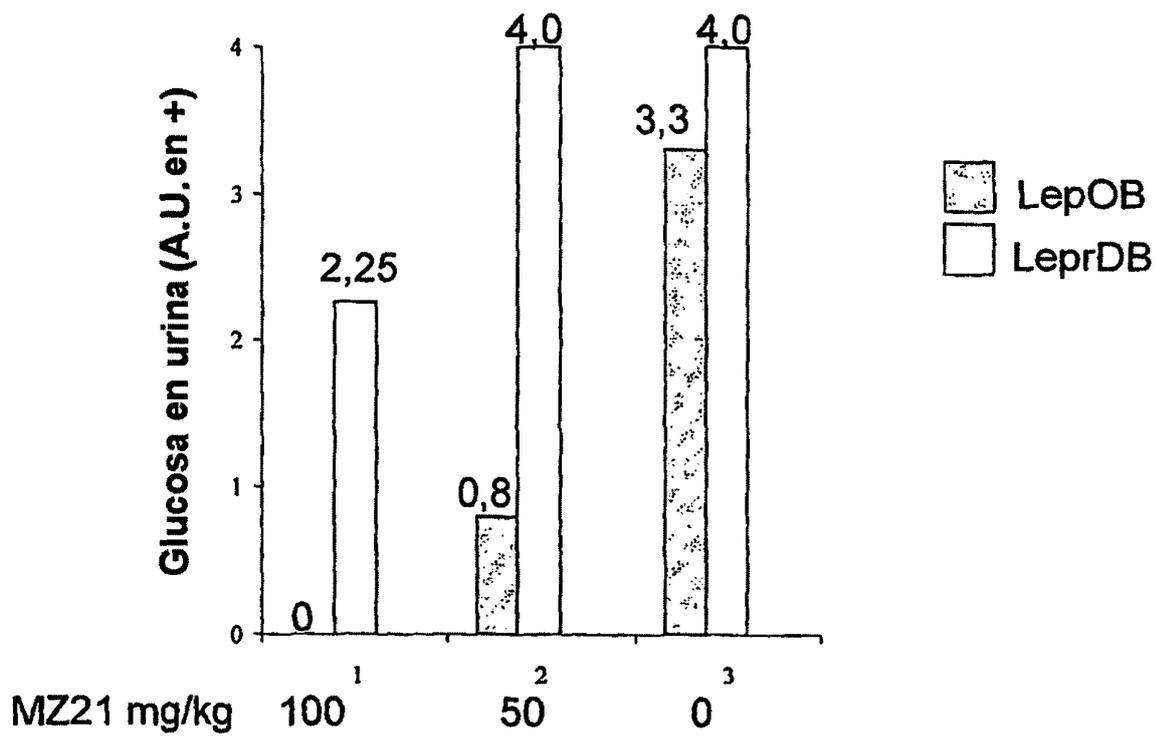
Fig 7

**Ratones Db:**  
Cambios en glucosa en sangre,  
ingesta de agua e ingesta de alimento  
después de MZ21 oral diario

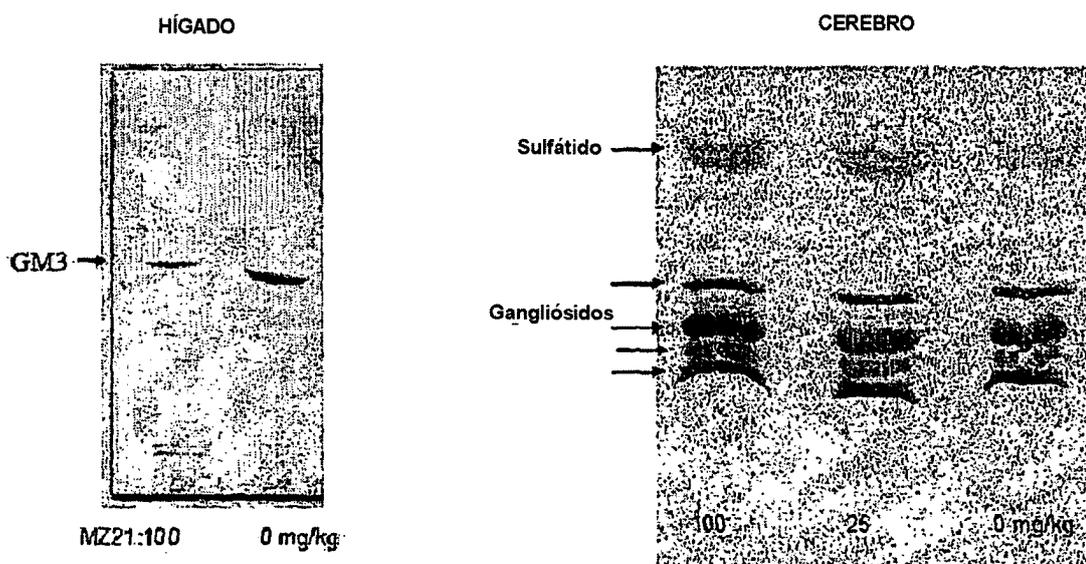


*Fig 8*

Efecto de MZ21 en glucosa urinaria



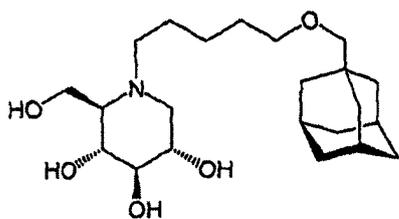
# Fig 9



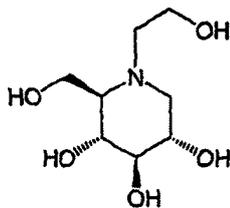
**MZ-21** reduce GM3 del hígado

MZ-21 no tiene efecto en gangliósidos del cerebro, arilsulfátido o galactosilceramida

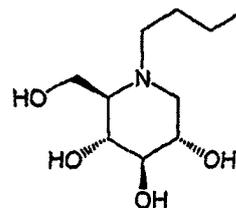
# Fig 10



N-(5-adamantano-1-il-metoxi-pentil)desoxinojirimicina



N-hidroxi-etil-desoxinojirimicina



N-butil-desoxinojirimicina