

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 391**

21 Número de solicitud: 201031008

51 Int. Cl.:  
**C07C 233/17** (2006.01)  
**A61K 31/164** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **29.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**19.01.2012**

71 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Universidad de Barcelona** (Titular al 16%) y  
**Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale INSERM** (Titular al 34 %)

72 Inventor/es: **Fabrias Domingo, Gemma;**  
**Abad Saiz, José Luis;**  
**Casas Brugulat, Josefina;**  
**Delgado Cirilo, Antonio;**  
**Levade, Thierry;**  
**Bedia, Carmen y**  
**Camacho Castillo, Luz del Carmen**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Método de diagnóstico de la enfermedad de Farber.**

57 Resumen:

Método de diagnóstico de la enfermedad de Farber.  
La presente invención se refiere a una familia de compuestos con un núcleo estructural de derivados de aminoalcohol y a su uso para la detección de la enfermedad de Farber aplicando un método de diagnóstico fuera del cuerpo humano en el que se emplean dichos compuestos unidos a un fluoróforo, cromóforo o luminóforo como sustratos de la enzima ceramidasa ácida, cuya funcionalidad se encuentra disminuida en pacientes con dicha enfermedad. Además la presente invención se refiere a un kit que comprende al menos uno de estos compuestos para utilizar en el diagnóstico de la enfermedad a partir de una muestra biológica aislada de un individuo.

ES 2 372 391 A1

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico de la enfermedad de Farber.

5 La presente invención se refiere a una familia de compuestos con un núcleo estructural de derivados de aminoalcohol y a su uso para la detección de la enfermedad de Farber aplicando un método de diagnóstico fuera del cuerpo humano en el que se emplean dichos compuestos unidos a un fluoróforo, cromóforo o luminóforo como sustratos de la enzima ceramidasa ácida, cuya funcionalidad se encuentra disminuida en pacientes con dicha enfermedad. Por tanto la presente invención se engloba dentro de la química y más específicamente de la química aplicada al diagnóstico de enfermedades y la determinación de actividades enzimáticas.

**Estado de la técnica anterior**

15 La enfermedad de Farber, también llamada lipogranulomatosis, es un desorden hereditario de almacenamiento de lípidos caracterizado por una acumulación de ceramidas en los lisosomas, debido a una carencia de la actividad enzimática que la degrada, la ceramidasa ácida. Esta enfermedad presenta una tríada de síntomas comunes: inflamación de las articulaciones, nódulos subcutáneos y ronquera. Algunas veces pueden aparecer hepatoesplenomegalia y malfuncionamiento del sistema nervioso. Se trata de una enfermedad muy grave en la que los pacientes mueren generalmente antes de los dos años de edad (Levade T, Sandhoff K, Schulze H, Medin JA. Acid ceramidase deficiency: Farber lipogranulomatosis (2009) in D. Valle *et al.* (eds): Scriver's OMMBID (Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease), New York, McGraw-Hill).

Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad de Farber se realiza básicamente por tres tipos de métodos:

- 25
- i) Determinación de la actividad ceramidasa ácida. Esto se ha realizado principalmente utilizando *N*-oleoil o *N*-lauroil esfingosinas marcadas radioactivamente sobre homogeneizados celulares. Estos sustratos se caracterizan por ser muy poco solubles y los ensayos deben realizarse en el seno de mezclas complejas de detergentes. Además, la separación y cuantificación de productos suponen un proceso largo y tedioso: extracción de lípidos, migración por cromatografía de capa fina (CCF), lectura de las placas en un *radiochromatoscanner* para la identificación de los productos y posterior separación de la sílice del soporte y cuantificación por centelleo líquido. Otro inconveniente de estos ensayos es que estas ceramidas pueden ser degradadas por otras ceramidases no lisosomales, que no son deficientes en la enfermedad de Farber.

30

35

  - ii) *Loading tests* o tests de carga. Estos consisten en la adición directa de esfingolípidos marcados radioactivamente al medio de cultivo celular, para el posterior análisis de su metabolismo. Las moléculas utilizadas en estos tests han sido la ceramida, el cerebrósido sulfato y la esfingomielina. Esta última ha demostrado ser la más adecuada para este fin puesto que las otras moléculas son metabolizadas parcialmente o casi totalmente por enzimas no lisosomales, mientras que la esfingomielina se dirige principalmente al lisosoma. Así pues, en este compartimento la esfingomielina es degradada a ceramida y mediante el estudio de los perfiles lipídicos se puede observar una potencial acumulación de este lípido en células de enfermos de Farber. El análisis de estos perfiles requiere el mismo proceso de separación y cuantificación que el método anterior, pero este test presenta la ventaja de necesitar menos cantidad de material biológico. Los inconvenientes de estos test son que estas moléculas radioactivas no están disponibles comercialmente y que las moléculas pueden ser degradadas parcialmente por enzimas no lisosomales.

40

45

  - iii) Cuantificación de los niveles de ceramida. Estos métodos tienen como objetivo medir la acumulación de ceramida que se produce en los lisosomas de las células de enfermos de Farber. Algunos autores han utilizado la derivatización de la ceramida, presente en fluidos corporales o tejidos, para dar lugar a moléculas que pueden ser detectadas, separadas y cuantificadas por cromatografía líquida (HPLC) o de gases (GCL) acoplada a detector de masas (MS). Otro método conocido para medir el almacenamiento de ceramida utiliza el enzima diacilglicerol quinasa (DAGk). Este enzima, además de fosforilar el diacilglicerol, tiene una gran afinidad por la ceramida. Aprovechando esto, la ceramida presente en el extracto lipídico se hace reaccionar con la DAGk en presencia de [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ -ATP, para dar lugar a ceramida-1-fosfato. La fase orgánica de esta reacción se hace migrar por CCF y la placa se expone a una película fotográfica o directamente se visualiza en un escáner que detecta el [<sup>32</sup>P]. La ceramida-1-fosfato producida refleja la cantidad de ceramida acumulada en los lisosomas de las células. La ventaja de este método es que tanto el ATP radioactivo como el enzima están disponibles comercialmente, pero el ensayo es largo y laborioso.

50

55

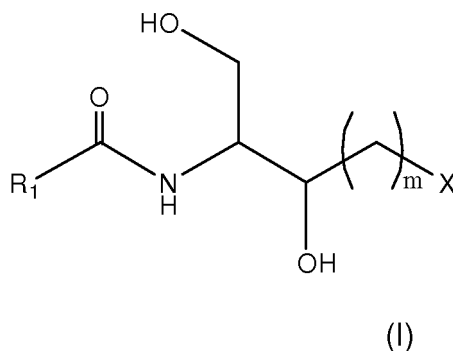
60

Así pues, los métodos existentes para el diagnóstico de la enfermedad de Farber utilizan en su mayoría moléculas radioactivas y tienen en común la complejidad de la extracción y separación de lípidos para su análisis, ya sea por CCF, HPLC o GLC. Todas estas desventajas hacen que el diagnóstico de la enfermedad de Farber esté reservado a un número limitado de laboratorios especializados.

**Descripción de la invención**

La presente invención describe una serie de compuestos y un método para determinar si un individuo padece la enfermedad de Farber que está basado en la hidrólisis enzimática de estos compuestos que son sustrato de la enzima ceramidasa ácida, enzima implicada en las disfunciones que provocan los síntomas de dicha enfermedad.

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



donde

$R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{24}$ , alqueniilo  $C_2-C_{24}$ , alquiniilo  $C_2-C_{24}$  o un grupo  $-R_2-Y-R_3$ , donde

$Y$  se selecciona entre S, O, N, NH, S(O), S(O<sub>2</sub>), C(O), NHC(O), C(O)NH, C(O)O, OC(O),

$R_2$ , se selecciona entre alquilo  $C_1-C_a$ , alqueniilo  $C_2-C_a$ , alquiniilo  $C_2-C_a$ ,

$R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_b$ , alqueniilo  $C_2-C_b$ , alquiniilo  $C_2-C_b$ , siendo  $a+b \leq 24$ ,

$m$  es un valor entre 1 y 10,

$X$  es un fluoróforo, cromóforo o luminóforo,

con la condición de que cuando  $X$  es umbeliferona y  $m$  es 2,  $R_1$  es distinto de  $-(CH_2)_{14}CH_3$ .

El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 24 átomos de carbono, preferiblemente de 10 a 12, y que se unen al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, decilo, dodecilo etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, carbonilo, ciano, acilo, alcoxicarbonil, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término “alqueniilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo etc. Los radicales alqueniilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

El término “alquiniilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonada, lineal o ramificada, que tiene uno o más triples enlaces carbono-carbono y que está unido al resto de la molécula por un enlace simple por ejemplo, etinilo, 1-propinilo, etc. El grupo alquiniilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azido, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro, mercapto y alquiltio.

“Fluoróforo” se refiere a un grupo químico de pequeño tamaño que forma parte de una molécula mayor, el cual puede ser excitado por la luz para emitir fluorescencia. En algunas realizaciones, los fluoróforos producen fluorescencia eficientemente por excitación con luz de longitud de onda desde unos 200 nanómetros a unos 800 nanómetros. La intensidad y la longitud de onda de la radiación emitida dependen del fluoróforo y del entorno químico del mismo. El fluoróforo puede ser seleccionado, sin limitación, de entre acridina, antracenos, alofococianina, BODIPY, cianinas, cumarinas, fluorescamina, fluoresceina, FAM (carboxifluoresceina), HEX (hexaclorofluoresceina), JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceina), Oregon Green, ficocianina, ficoeritirina, rodamina, ROX (carboxi-X-rodamina), TAMRA (carboxitetrametilrodamina), TET (tetracloro-fluoresceina), Texas red, tetrametilrodamina y xanthinias.

## ES 2 372 391 A1

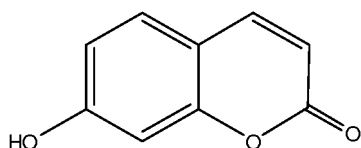
“Luminóforo” se refiere a un átomo o grupo químico que emite luz que no deriva del aumento de temperatura, y puede estar causada por cambios químicos, bioquímicos o cristalográficos. El luminóforo puede ser seleccionado, sin limitación, de entre rodol, rodamina, resorufina o derivados de los mismos.

5 “Cromóforo” se refiere a un grupo químico que absorbe energía de excitación y la emite en un rango de longitudes de onda que produce color. El cromóforo puede ser seleccionado, sin limitarse a, arstocianinas, carotenos, licopenos, colorantes azoicos, fotocromos etc.

Preferiblemente, m es un valor entre 2 y 4. Más preferiblemente m es 2.

10 Preferiblemente,  $R_1$  es un alquilo  $-(CH_2)_nCH_3$ , donde n es un valor entre 1 y 24. Más preferiblemente n es 10.

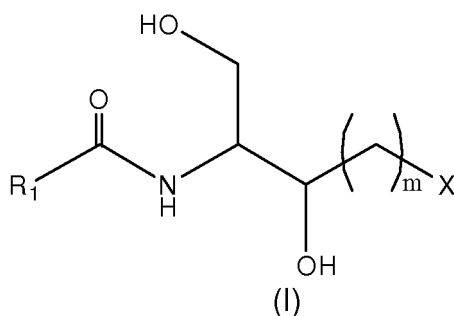
Preferiblemente X es umbeliferona. La umbeliferona o 7-hidroxicumarina es un compuesto orgánico derivado de la cumarina por sustitución de su átomo de hidrógeno en posición 7 por un grupo hidroxilo, que tiene la siguiente estructura:



25 Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método de diagnóstico para determinar si un individuo padece la enfermedad de Farber que comprende:

a) obtención de una muestra biológica aislada del individuo,

30 b) adición de un compuesto de fórmula (I):



45 donde

$R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{24}$ , alqueno  $C_2-C_{24}$ , alquino  $C_2-C_{24}$  o un grupo  $-R_2-Y-R_3$ , donde Y se selecciona entre S, O, N, NH, S(O), S(O)<sub>2</sub>, C(O), NHC(O), C(O)NH, C(O)O, OC(O),  $R_2$ , se selecciona entre alquilo  $C_1-C_a$ , alqueno  $C_2-C_a$ , alquino  $C_2-C_a$ ,  $R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_b$ , alqueno  $C_2-C_b$ , alquino  $C_2-C_b$ , siendo  $a+b \leq 24$ ,

m es un valor entre 1 y 10,

55 X es un grupo fluorogénico, cromogénico o luminogénico a la muestra obtenida en (a),

c) incubación de la mezcla obtenida en (b)

60 d) oxidación de la mezcla obtenida en (c)

e) detección de la señal (fluorescencia, color o luminiscencia) emitida en la mezcla obtenida en (d).

65 En una realización preferida,  $R_1$  es un alquilo  $-(CH_2)_nCH_3$ , donde n es un valor entre 1 y 24.

En una realización más preferida, n es 10.

## ES 2 372 391 A1

En otra realización preferida, m es un valor entre 2 y 4. En una realización más preferida, m es 2.

En una realización preferida, X es umbeliferona.

5 En una realización preferida, la etapa (c) de incubación se puede detener mediante la adición de metanol seguida de una oxidación que puede ser realizada añadiendo mezclas oxidantes conocidas, tal como, pero sin limitarse a,  $\text{NaIO}_4$  disuelto en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6.

10 Preferiblemente, la muestra obtenida en la etapa (a) es un fluido corporal y más preferiblemente, el fluido es sangre. De la sangre se pueden extraer leucocitos y linfocitos mediante técnicas conocidas y realizar las modificaciones requeridas para utilizar estos extractos para la realización del método descrito.

15 Preferiblemente, la muestra obtenida en la etapa (a) es tejido epitelial. La obtención de la muestra de tejido y de las células se realiza por métodos estándar conocidos por cualquier experto en la materia.

En una realización preferida, el tiempo de incubación en el paso (c) es entre 0,5 y 5 horas.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Farber que comprende la comparación de los datos obtenidos mediante el método según se ha descrito anteriormente con una muestra control.

25 El método de detección de la enfermedad de Farber descrito en la presente invención se basa en una reacción enzimática de hidrólisis sobre un compuesto de fórmula (I) como se ha descrito anteriormente. Estos compuestos son sustratos de la enzima ceramidasa ácida, que se encuentra mutada en individuos que padecen esta enfermedad, por lo que su funcionalidad en las células es mínima o nula. En un primer paso del método, se obtiene una muestra biológica del individuo (sangre, tejido etc.) de la que se han extraído las células adecuadas para determinar la actividad de la ceramidasa por los métodos habituales. Este extracto celular se pone en contacto con el sustrato de fórmula (I) y se incuba la mezcla durante un tiempo variable de entre 1 a 5 horas. En caso de que la enzima ceramidasa sea funcional, se producirá la hidrólisis de la cadena N-acilo presente en el compuesto de fórmula (I). Este cambio estructural hace que, después de una reacción de oxidación, el fluoróforo emita fluorescencia, que puede ser medida por los métodos conocidos, tal como un espectrofotómetro adecuado. En caso de que la ceramidasa esté mutada y no sea funcional, la muestra no presentará fluorescencia o ésta será mínima. En base a esta relación entre la actividad ceramidasa y los datos de fluorescencia obtenidos, un experto en la materia puede proceder a determinar si el individuo problema padece la enfermedad de Farber.

35 Preferiblemente, es recomendable determinar también la actividad ceramidasa en al menos una muestra control que puede ser un extracto celular del mismo tipo de células procedente de un individuo normal para el mismo experimento y el mismo día. Así, la probabilidad de que un individuo padezca la enfermedad de Farber aumenta cuando la actividad de ceramidasa en la muestra problema es aproximadamente un 25% menor a la actividad ceramidasa determinada en la muestra control.

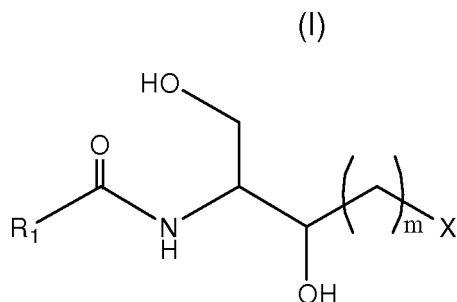
40 El método descrito en la presente invención posee una serie de ventajas respecto a los métodos conocidos en la actualidad:

- 45 ■ El sustrato utilizado no es radioactivo, por lo tanto, no se requieren instalaciones ni equipos específicos ni autorizaciones especiales.
- El sustrato utilizado es soluble en disoluciones acuosas a las concentraciones necesarias, con lo que no se requiere el uso de detergentes para su solubilización.
- 50 ■ El sustrato utilizado es estable en condiciones adecuadas de almacenamiento.
- El sustrato utilizado es específico para la ceramidasa ácida y, por lo tanto, para el diagnóstico de la enfermedad de Farber al no presentar interferencias con otras amido hidrolasas.
- 55 ■ La detección se basa en la medida de fluorescencia, color o luminiscencia mediante instrumental común y asequible en los laboratorios.
- No se necesita separar el producto del sustrato, con lo que se evitan procedimientos tediosos de extracción y de separación (CCF, HPLC, GCL).
- 60 ■ Se evita el uso de disolventes orgánicos halogenados, con lo que el método genera menos residuos contaminantes que los otros descritos y suponen un menor riesgo ocupacional.
- 65 ■ El ensayo es muy sensible, con un límite de detección de 50 pmoles de producto formado, y requiere muy poca cantidad de proteína (10-20  $\mu\text{g}$ ).

## ES 2 372 391 A1

- El ensayo puede ser miniaturizado y utilizado para el cribado masivo de muestras y para la realización de múltiples medidas de forma simultánea.
- El ensayo puede aplicarse a varios tipos de muestras biológicas, como por ejemplo linfocitos de sangre y fibroblastos de piel.
- El ensayo es rápido, requiriéndose menos de 4 horas desde la preparación de la muestra hasta la obtención de los resultados.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



donde

$R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{24}$ , alquenilo  $C_2-C_{24}$ , alquinilo  $C_2-C_{24}$  o un grupo  $-R_2-Y-R_3$ , donde Y se selecciona entre S, O, N, NH, S(O), S(O<sub>2</sub>), C(O), NHC(O), C(O)NH, C(O)O, OC(O),  $R_2$ , se selecciona entre alquilo  $C_1-C_a$ , alquenilo  $C_2-C_a$ , alquinilo  $C_2-C_a$ ,  $R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_b$ , alquenilo  $C_2-C_b$ , alquinilo  $C_2-C_b$ , siendo  $a+b \leq 24$ ,

m es un valor entre 1 y 10,

X es un grupo fluorogénico, cromogénico o luminogénico,

para el diagnóstico de la enfermedad de Farber en una muestra biológica aislada de un individuo.

Preferiblemente,  $R_1$  es un alquilo  $-(CH_2)_nCH_3$ , donde n es un valor entre 1 y 24. Más preferiblemente, n es 10.

Preferiblemente, m es 2.

En una realización preferida, X es umbeliferona.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a un kit útil para determinar si un individuo padece la enfermedad de Farber a partir de una muestra aislada de dicho individuo, que comprende el compuesto de fórmula (I) y al uso de este kit para el diagnóstico de la enfermedad de Farber en una muestra biológica aislada de un individuo. Otros componentes del kit pueden ser disoluciones amortiguadoras, conservantes, oxidantes y en general, componentes que contribuyan a la adecuada conservación de los reactivos y a que la reacción base del ensayo se realice de la forma más eficiente posible.

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

### Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la actividad enzimática sobre los compuestos 2-7, después de 3 horas de incubación de las células en cultivo (línea FD1 AcCer10X) con 40  $\mu$ M de sustrato. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con triplicados. S se refiere al sustrato descrito en Bedia *et al.*, Chembiochem. 2007, 8, 642-8.

Fig. 2. Muestra la actividad enzimática sobre los compuestos 2-7, después de 3 horas de incubación de las células en cultivo (línea FD1 AcCer10X) con distintas concentraciones de cada sustrato. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes con triplicados.

Fig. 3. Muestra el efecto de la concentración de proteína en la hidrólisis del sustrato 5, después de 3 horas de incubación a 37°C en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de sustrato y diferentes cantidades de sobrenadante de homogeneizados celulares (línea FD1 AcCer10X). Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

5 Fig. 4. Muestra la hidrólisis del sustrato 5 en función del tiempo de incubación, en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de sustrato y de 25  $\mu\text{g}$  de proteína del homogeneizado celular (línea FD1 AcCer10x). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

10 Fig. 5. Muestra la hidrólisis del sustrato 5 en función del pH de la mezcla de reacción, en los homogeneizados celulares de tres líneas celulares con diferente grado de actividad ceramidasa ácida: FD1 AcCer10X (sobrexpresan ceramidasa ácida), linfoblastos normales y fibroblastos FD1 (Farber). Los ensayos se realizaron a 37°C durante 3 horas en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de sustrato y de 10-25  $\mu\text{g}$  de proteína. Para la incubación se utilizaron diferentes disoluciones amortiguadoras sin detergentes: disolución amortiguadora de glicina-HCl (pH 2,5 a 3), disolución amortiguadora de acetato (pH 3,5 a 5,5), disolución amortiguadora de fosfato sódico (pH 6 a 8,1) y disolución amortiguadora de glicina-NaOH (pH 8,9 a 9,8). Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

20 Fig. 6. Muestra el análisis cinético de la hidrólisis del sustrato 5. Diferentes concentraciones del sustrato de 2,5 a 80  $\mu\text{M}$  fueron incubadas en presencia de 10-25  $\mu\text{g}$  de proteína del homogeneizado celular (línea FD1 AcCer10x), en el seno de una disolución amortiguadora de acetato pH 4,5 durante 3 horas a 37°C. En la figura se muestra la representación de Lineweaver-Burk y los parámetros cinéticos resultantes, los cuales son el promedio de cinco experimentos independientes.

25 Fig. 7. Muestra la medición de la actividad ceramidasa ácida en diferentes líneas de fibroblastos Farber y fibroblastos control. Todas las mediciones han sido realizadas con el sustrato 5 y una cantidad fija de proteína, en las condiciones estándar descritas. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.

30 Fig. 8. Muestra la medición de la actividad  $\beta$ -galactosidasa lisosomal en diferentes líneas de fibroblastos Farber y fibroblastos control. Todas las mediciones han sido realizadas con el sustrato 5 y una cantidad fija de proteína, en las condiciones estándar descritas. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.

Fig. 9. Muestra la medición de la actividad ceramidasa ácida en diferentes líneas de linfoblastos Farber y linfoblastos control. Todas las mediciones han sido realizadas con el sustrato 5 y una cantidad fija de proteína, en las condiciones estándar descritas. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.

35 Fig. 10. Muestra la medición de la actividad  $\beta$ -galactosidasa lisosomal en diferentes líneas de linfoblastos Farber y linfoblastos control. Todas las mediciones han sido realizadas con una cantidad fija de proteína, en las condiciones estándar descritas. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes.

## 40 Ejemplos

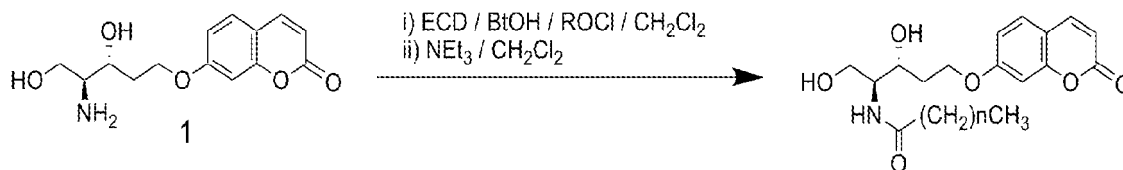
A continuación se ilustrará la invención mediante ejemplos y ensayos realizados por los inventores, sin ser limitativos, que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del método de la presente invención.

45

### A. Preparación de los compuestos de fórmula (I)

50 *Metodología general:* A una disolución del aminodiol cumarínico 1 (56 mg, 0.2 mmol), obtenido tal como se describe en la literatura [Bedia *et al.*, ChemBiochem. 2007, 8, 642-8.], y  $\text{NET}_3$  (60  $\mu\text{L}$ /0.4 mmol), en 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  bajo atmósfera de argón a temperatura ambiente, se adiciona una disolución del correspondiente ácido activado en 4 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Dicho ácido activado se prepara previamente disolviendo en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ECD/HOBT/ácido en proporciones 0.32 mmol:0.25 mmol:0.25 mmol). La reacción se controla por cromatografía en capa fina eluyendo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1) observándose tras 1 h la desaparición total del producto partida. La mezcla de reacción se lava con 2 mL de una disolución acuosa saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se evapora y el crudo resultante se purifica por cromatografía en columna flash utilizando un gradiente de 0 a 10% de MeOH en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para obtener los productos en forma de sólidos blancos (rendimientos 74-80%). Un esquema de este procedimiento se muestra a continuación:

60



## ES 2 372 391 A1

(1'S,2'R)N-[1-hidroxi-2-hidroxi-4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butil]butanoilamida (compuesto 2, n=2)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 5 7.62 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.35 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 6.85-6.82 (m, 2H), 6.48 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.24 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 4.34-4.16 (m, 2H), 4.06 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 3.3 y J<sub>2</sub> = 8.0 Hz), 3.92 (m, 1H), 3.86-3.72 (m, 2H), 3.18 (brs, 1H), 2.22 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.04 (m, 2H), 1.68 (sext, J = 7.5, 2H), 0.95 (t, 3H, J = 7.5 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 174.2, 162.2, 161.7, 155.7, 143.9, 128.9, 113.1, 112.9, 112.6, 101.5, 70.0, 65.8, 62.2, 54.7, 38.7, 33.5, 19.3, 13.8.

10 (1'S,2'R)N-[1-hidroxi-2-hidroxi-4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butil]octanoilamida (compuesto 3, n=6)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 5 7.63 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 7.34 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 6.85-6.76 (m, 2H), 6.53 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.22 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 4.30-4.14 (m, 2H), 4.06 (brd, 2H, J = 9.6 Hz), 3.93 (m, 2H), 3.84-3.76 (m, 1H), 3.41 (brs, 1H), 2.24 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.04 (m, 2H), 1.68 (quint, J = 7.5, 2H), 1.38-1.16 (br, 8H), 0.86 (t, 3H, J = 7.5 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 174.4, 162.2, 161.7, 155.7, 143.9, 128.9, 113.1, 112.8, 112.6, 101.4, 69.9, 65.7, 62.2, 54.7, 36.9, 33.5, 31.7, 29.3, 29.1, 25.9, 22.7, 14.2.

20 (1'S,2'R)N-[1-hidroxi-2-hidroxi-4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butil]decanoilamida (compuesto 4, n=8)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 5 7.64 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.37 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.84-6.82 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.36 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.25 (d, 1H, J = 9.5 Hz), 4.32-4.14 (m, 2H), 4.06 (brd, 2H, J = 9.6 Hz), 3.92 (sext, 1H, J = 3.5 Hz), 3.82 (brd, 1H), 3.43 (brd, 1H, J = 5.5 Hz), 2.75 (brs, 1H), 2.25 (t, 2H, J = 8.0 Hz), 2.05 (m, 2H), 1.70-1.52 (4H), 1.38-1.16 (br, 12H), 0.87 (t, 3H, J = 7.0 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 174.4, 162.2, 161.7, 155.7, 143.8, 128.9, 113.1, 112.9, 112.6, 101.5, 70.0, 65.8, 62.3, 54.7, 36.9, 33.5, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.4, 25.9, 22.8, 14.2.

30 (1'S,2'R)N-[1-hidroxi-2-hidroxi-4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butil]dodecanoilamida (compuesto 5, n=10)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 5 7.63 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.36 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.84-6.82 (m, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.41 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.24 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 4.32-4.14 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 3.92 (sext, 1H, J = 3.5 Hz), 3.82 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 11.5 Hz, J<sub>2</sub> = 3.5 Hz), 2.24 (t, 2H, J = 8.0 Hz), 2.05 (m, 2H), 1.64 (quint, 2H, J = 7 Hz), 1.38-1.18 (br, 16H), 0.87 (t, 3H, J = 7.0 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 174.4, 162.2, 161.7, 155.7, 143.8, 128.9, 113.1, 112.9, 112.6, 101.5, 70.0, 65.8, 62.2, 54.7, 36.9, 33.5, 32.0, 29.7, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 25.9, 22.8, 14.2.

(1'S,2'R)N-[1-hidroxi-2-hidroxi-4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butil]tetradecanoilamida (compuesto 6, n=12)

45 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 5 7.63 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.37 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.84-6.82 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.34 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.26 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 4.32-4.14 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 3.92 (sext, 1H, J = 3.5 Hz), 3.82 (m, 1H), 3.40 (t, 1H, J = 6.0 Hz), 2.70 (brs, 1H), 2.24 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.06 (m, 2H), 1.65 (quint, 2H, J = 7 Hz), 1.38-1.18 (br, 20H), 0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz).

<sup>13</sup>C RMN (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>) δ 174.3, 162.2, 161.7, 155.7, 143.8, 128.9, 113.1, 112.9, 112.6, 101.5, 70.1, 65.8, 62.3, 54.7, 36.9, 33.5, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.5, 29.4, 25.9, 22.8, 14.2.

(1'S,2'R)N-[1-hidroxi-2-hidroxi-4-(2-oxo-2H-cromen-7-iloxi)butil]tetracosanoilamida (compuesto 7, n=22)

55 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>) 5 7.63 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 7.37 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.84-6.82 (m, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.34 (d, 1H, J = 7.2 Hz), 6.26 (d, 1H, J = 9.6 Hz), 4.34-4.15 (m, 2H), 4.07 (m, 2H), 3.92 (sext, 1H, J = 3.5 Hz), 3.81 (m, 1H), 3.41 (d, 1H, J = 6 Hz), 2.81 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.25 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.06 (m, 2H), 1.65 (quint, 2H, J = 7 Hz), 1.38-1.18 (br, 40H), 0.88 (t, 3H, J = 7.0 Hz).

60 <sup>13</sup>C RMN (75 MHz; DMSO) δ 172.2, 161.9, 160.1, 155.3, 144.1, 129.3, 112.5, 112.2, 112.1, 101.1, 67.0, 65.6, 60.6, 55.0, 35.4, 32.8, 31.1, 29.8, 29.8, 29.6, 29.5, 25.2, 21.9, 13.7.

65



## B. Ensayos biológicos

*Medición de la actividad ceramidasa ácida*

5 Esta actividad se puede medir *in vitro* con homogeneizados celulares y sobre células vivas intactas.

Para la medición de la actividad ceramidasa ácida *in vitro*, las células son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sónica. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y se guardan los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y después de los cálculos, el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a cantidades iguales de proteína. El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético, 0,5  $\mu\text{l}$  de la disolución de sustrato de la ceramidasa ácida 4 mM en etanol (concentración final de sustrato 20  $\mu\text{M}$ ; concentración final de etanol 0,5%), y una cantidad de proteína fija (entre 10 y 25  $\mu\text{g}$ ) en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0,2 M. La placa se incuba a 37°C durante 3 horas sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición en cada pocillo de 50  $\mu\text{l}$  de metanol y después 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de  $\text{NaIO}_4$  de 2,5 mg/ml en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6. La placa se mantiene a 37°C protegida de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

20 Las líneas celulares utilizadas para caracterizar el sustrato son FD1 (línea celular Farber con actividad ceramidasa ácida nula) y FD1 AcCer10X (línea Farber corregida para sobreexpresar la ceramidasa ácida). Las demás líneas celulares Farber y líneas control, ya sean fibroblastos como linfoblastos (Epstein-Barr virus-transformed lymphoid cell lines), proceden del Laboratoire de Biochimie Métabolique, Institut Federatif de Biologie, CHU Purpan, Toulouse, France.

25 Para la medición de la actividad ceramidasa ácida en células en cultivo, las células se siembran a una densidad de 200000 células/ml (0.1 ml/pocillo). Después de 24 h, se añade el sustrato disuelto en etanol o en DMSO (0.1  $\mu\text{l}$ , 40 mM) para tener una concentración final de 40  $\mu\text{M}$ . Se incuba a 37°C durante 3 h en el incubador de  $\text{CO}_2$  y luego se añaden secuencialmente 25  $\mu\text{l}$  de MeOH y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de  $\text{NaIO}_4$  de 2,5 mg/ml en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6. La placa se mantiene a 37°C protegida de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm). Las muestras blanco se preparan añadiendo el sustrato inmediatamente antes de la adición de MeOH y  $\text{NaIO}_4$ .

35 *Hidrólisis de los compuestos en función del grupo N-acilo*

Estos experimentos se pueden realizar en células en cultivo. Para ello, las células se siembran a una densidad de 200000 células/ml (0.1 ml/pocillo). Después de 24 h, se añaden los sustratos disueltos en etanol o en DMSO (0.1  $\mu\text{l}$ , 40 mM). El experimento se puede realizar a una concentración fija final de sustrato (por ejemplo, 40  $\mu\text{M}$ ) o variable, entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Se incuba a 37°C durante 3 h en el incubador de  $\text{CO}_2$  y luego se añaden secuencialmente 25  $\mu\text{l}$  de MeOH y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de  $\text{NaIO}_4$  2,5 mg/ml en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6. La placa se mantiene a 37°C protegida de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm). Las muestras blanco se preparan añadiendo el sustrato inmediatamente antes de la adición de MeOH y  $\text{NaIO}_4$ .

45 *Hidrólisis del sustrato en función de la concentración de proteína*

Para determinar el efecto de la concentración de proteína sobre la hidrólisis del sustrato, las células en cultivo de la línea FD1 AcCer10X son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sónica. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y se guardan los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a diferentes cantidades de sobrenadante de homogeneizados celulares. El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético, 0,5  $\mu\text{l}$  de la disolución de sustrato de ceramidasa ácida 4 mM en etanol (concentración final de sustrato 20  $\mu\text{M}$ ; concentración final de etanol 0,5%), y distintas cantidades de proteína entre 2.5 y 180  $\mu\text{g}$  en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0,2 M. La placa se mantiene a 37°C durante 3 horas sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de metanol y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de 2,5 mg/ml de  $\text{NaIO}_4$  en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6 en cada pocillo. La placa se protege de la luz durante dos horas y posteriormente se lee en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

60 *Hidrólisis del sustrato en función del tiempo de incubación*

Para determinar la hidrólisis del sustrato en función del tiempo de incubación, las células en cultivo son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sonicen. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y guardamos los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y después de los cálculos, el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a cantidades iguales de proteína. La mezcla de incubación del ensayo se lleva

## ES 2 372 391 A1

a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético, 0,5  $\mu\text{l}$  de la disolución de sustrato de ceramidasa ácida 4 mM en etanol (concentración final de sustrato 20  $\mu\text{M}$ ; concentración final de etanol 0,5%), y 25  $\mu\text{g}$  de proteína en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0,2 M. La placa se incubaba a 37°C durante distintos tiempos sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de metanol y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de 2,5 mg/ml de  $\text{NaIO}_4$  en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6 en cada pocillo. La placa se protege de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

### 10 *Hidrólisis del sustrato en función del pH*

Para determinar la hidrólisis del sustrato en función del pH de la disolución amortiguadora de reacción, se utilizan tres líneas celulares con diferente grado de actividad ceramidasa ácida: FD1 AcCer10X (sobrexpresan ceramidasa ácida), linfoblastos normales y fibroblastos FD1 (Farber). Las células en cultivo son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sónica. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y guardamos los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y después de los cálculos, el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a cantidades iguales de proteína. La mezcla de incubación del ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74  $\mu\text{l}$  de diferentes disoluciones amortiguadoras sin detergentes: disolución amortiguadora de glicina-HCl (pH 2,5 a 3), disolución amortiguadora de acetato (pH 3,5 a 5,5), disolución amortiguadora de fosfato sódico (pH 6 a 8,1) y disolución amortiguadora de glicina-NaOH (pH 8,9 a 9,8), 0,5  $\mu\text{l}$  de la disolución de sustrato de ceramidasa ácida 4 mM en etanol (concentración final de sustrato 20  $\mu\text{M}$ ; concentración final de etanol 0,5%), y una cantidad de proteína fija (entre 10 y 25  $\mu\text{g}$ ) en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0,2 M. La placa se incubaba a 37°C durante 3 horas sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de metanol y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de 2,5 mg/ml de  $\text{NaIO}_4$  en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6 en cada pocillo. La placa se protege de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

### 30 *Análisis cinético de la hidrólisis del sustrato*

Para efectuar el análisis cinético de la hidrólisis del sustrato, las células en cultivo (línea FD1 AcCer10x) son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sónica. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y se guardan los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y después de los cálculos, el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a cantidades iguales de proteína. El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético, 0,5  $\mu\text{l}$  de la disolución de sustrato de ceramidasa ácida a distintas concentraciones en etanol (concentración final de sustrato de 2,5 a 80  $\mu\text{M}$ ; concentración final de etanol 0,5%), y una cantidad de proteína fija (entre 10 y 25  $\mu\text{g}$ ) en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0,2 M. La placa se incubaba a 37°C durante 3 horas sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de metanol y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de 2,5 mg/ml de  $\text{NaIO}_4$  en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6 en cada pocillo. La placa se protege de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

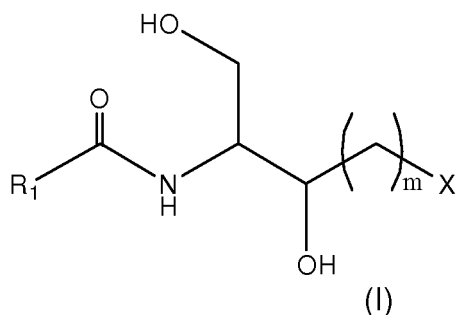
### 45 *Medición de la actividad ceramidasa ácida y la actividad $\beta$ -galactosidasa lisosomal en diferentes líneas de células Farber y células control*

Las células en cultivo son recolectadas y se lavan dos veces con PBS. Sobre los precipitados celulares se añaden 100  $\mu\text{l}$  de una disolución acuosa de sacarosa 0,2 M y se sónica. Los homogeneizados celulares se centrifugan durante 3 minutos a 15000 g y se guardan los sobrenadantes. Estos se utilizan para cuantificar las proteínas de cada muestra, y después de los cálculos, el ensayo de actividad ceramidasa ácida se realiza a cantidades iguales de proteína. El ensayo se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Cada pocillo contiene 74  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de acetato de sodio/ácido acético, 0,5  $\mu\text{l}$  de la disolución de sustrato de ceramidasa ácida 4 mM en etanol (concentración final de sustrato 20  $\mu\text{M}$ ; concentración final de etanol 0,5%), y una cantidad de proteína fija (entre 10 y 25  $\mu\text{g}$ ) en un volumen de 25  $\mu\text{l}$  de sacarosa 0,2 M. La placa se incubaba a 37°C durante 3 horas sin agitación. Pasado este tiempo, la reacción se para mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de metanol y 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de 2,5 mg/ml de  $\text{NaIO}_4$  en disolución amortiguadora de glicina/NaOH de pH 10,6 en cada pocillo. La placa se protege de la luz durante dos horas y posteriormente se mide la fluorescencia en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

La actividad  $\beta$ -galactosidasa lisosomal se mide con los mismos extractos proteicos utilizados para la medición de la actividad ceramidasa ácida. El ensayo se basa en el método fluorogénico ya publicado en la literatura<sup>2</sup> con algunas modificaciones con el fin de adaptarlo al formato de placas de 96 pocillos. Así pues, una cantidad fija de proteína (entre 5 y 10  $\mu\text{g}$ ) en un volumen de 10  $\mu\text{l}$ , se mezcla en un pocillo junto con 20  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio 0,5 M pH 4,5, 20  $\mu\text{l}$  de EDTA 20 mM, 40  $\mu\text{l}$  del sustrato 4-metilumbelliferil- $\beta$ -D-galactopiranosido 3 mM (concentración final 400  $\mu\text{M}$ ) y 10  $\mu\text{l}$  de agua ultra pura. Esta mezcla se incubaba a 37°C durante 30 minutos y seguidamente se añaden 100  $\mu\text{l}$  de disolución amortiguadora de glicina/NaOH a pH 10,6. Posteriormente la fluorescencia se mide en un fluorímetro de placas (longitud de onda de excitación 340 nm, emisión 460 nm).

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula



20 donde

25  $R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{24}$ , alqueno  $C_2-C_{24}$ , alquino  $C_2-C_{24}$  o un grupo  $-R_2-Y-R_3$ , donde Y se selecciona entre S, O, N, NH, S(O), S(O<sub>2</sub>), C(O), NHC(O), C(O)NH, C(O)O, OC(O),  $R_2$ , se selecciona entre alquilo  $C_1-C_a$ , alqueno  $C_2-C_a$ , alquino  $C_2-C_a$ ,  $R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_b$ , alqueno  $C_2-C_b$ , alquino  $C_2-C_b$ , siendo  $a+b \leq 24$ ,

m es un valor entre 1 y 10,

X es un fluoróforo, cromóforo o luminóforo,

30 con la condición de que cuando X es umbeliferona y m es 2,  $R_1$  es distinto de  $-(CH_2)_{14}CH_3$ .

2. Compuesto según la reivindicación 1 donde m es un valor entre 2 y 4.

35 3. Compuesto según la reivindicación 2 donde m es 2.

4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde  $R_1$  es un alquilo  $-(CH_2)_nCH_3$ , donde n es un valor entre 1 y 24.

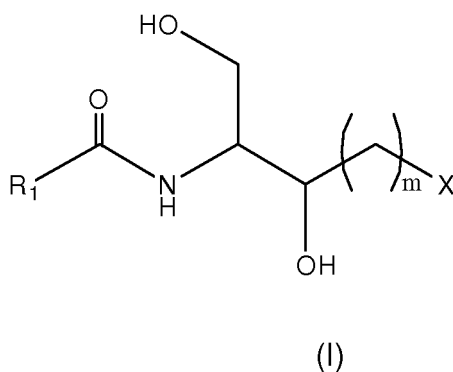
40 5. Compuesto según la reivindicación 4 donde n es 10.

6. Compuesto según las reivindicaciones anteriores donde X es umbeliferona.

45 7. Método de diagnóstico para determinar si un individuo padece la enfermedad de Farber que comprende:

a) Obtención de una muestra biológica aislada de un individuo

b) adición de un compuesto de fórmula (I):



## ES 2 372 391 A1

donde

$R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{24}$ , alqueniilo  $C_2-C_{24}$ , alquiniilo  $C_2-C_{24}$  o un grupo  $-R_2-Y-R_3$ , donde Y se selecciona entre S, O, N, NH, S(O), S(O<sub>2</sub>), C(O), NHC(O), C(O)NH, C(O)O, OC(O),  $R_2$ , se selecciona entre alquilo  $C_1-C_a$ , alqueniilo  $C_2-C_a$ , alquiniilo  $C_2-C_a$ ,  $R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_b$ , alqueniilo  $C_2-C_b$ , alquiniilo  $C_2-C_b$ , siendo  $a+b \leq 24$ ,

m es un valor entre 1 y 10,

X es un fluoróforo, cromóforo o luminóforo

a una muestra biológica aislada de un individuo,

c) incubación de la mezcla obtenida en (b)

d) oxidación de la mezcla obtenida en (c)

e) detección de la fluorescencia producida en la mezcla obtenida en (d).

8. Método según la reivindicación 7 donde m es un valor entre 2 y 4.

9. Método según la reivindicación 8 donde m es 2.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde  $R_1$  es un alquilo  $-(CH_2)_nCH_3$ , donde n es un valor entre 1 y 24.

11. Método según la reivindicación 10 donde n es 10.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 donde X es umbeliferona.

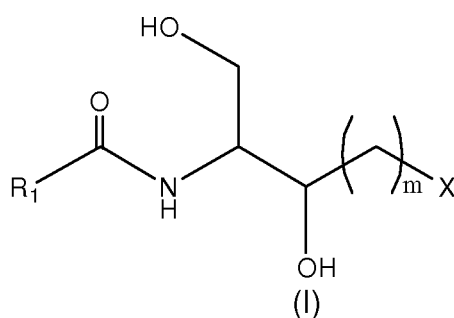
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 donde la muestra biológica aislada es un fluido corporal.

14. Método según la reivindicación 13 donde el fluido corporal es sangre.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 donde la muestra biológica aislada es tejido epitelial.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 donde el tiempo de incubación en el paso (b) es entre 0,5 y 5 horas.

17. Uso de un compuesto de fórmula (I):



donde

$R_1$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_{24}$ , alqueniilo  $C_2-C_{24}$ , alquiniilo  $C_2-C_{24}$  o un grupo  $-R_2-Y-R_3$ , donde Y se selecciona entre S, O, N, NH, S(O), S(O<sub>2</sub>), C(O), NHC(O), C(O)NH, C(O)O, OC(O),  $R_2$ , se selecciona entre alquilo  $C_1-C_a$ , alqueniilo  $C_2-C_a$ , alquiniilo  $C_2-C_a$ ,  $R_3$  se selecciona entre alquilo  $C_1-C_b$ , alqueniilo  $C_2-C_b$ , alquiniilo  $C_2-C_b$ , siendo  $a+b \leq 24$ ,

m es un valor entre 1 y 10,

X es fluoróforo, cromóforo o luminóforo,

para el diagnóstico de la enfermedad de Farber en una muestra biológica aislada de un individuo.

## ES 2 372 391 A1

18. Uso según la reivindicación 17 donde m es un valor entre 2 y 4.

19. Uso según la reivindicación 18 donde m es 2.

5 20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 donde  $R_1$  es un alquilo  $-(CH_2)_nCH_3$ , donde n es un valor entre 1 y 24.

21. Uso según la reivindicación 20 donde n es 10.

10 22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 donde X es umbeliferona.

23. Un kit útil para determinar si un individuo padece la enfermedad de Farber a partir de una muestra aislada de dicho individuo, que comprende el compuesto de fórmula (I).

15 24. Uso de un kit según la reivindicación 23 para el diagnóstico de la enfermedad de Farber en una muestra biológica aislada de un individuo.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

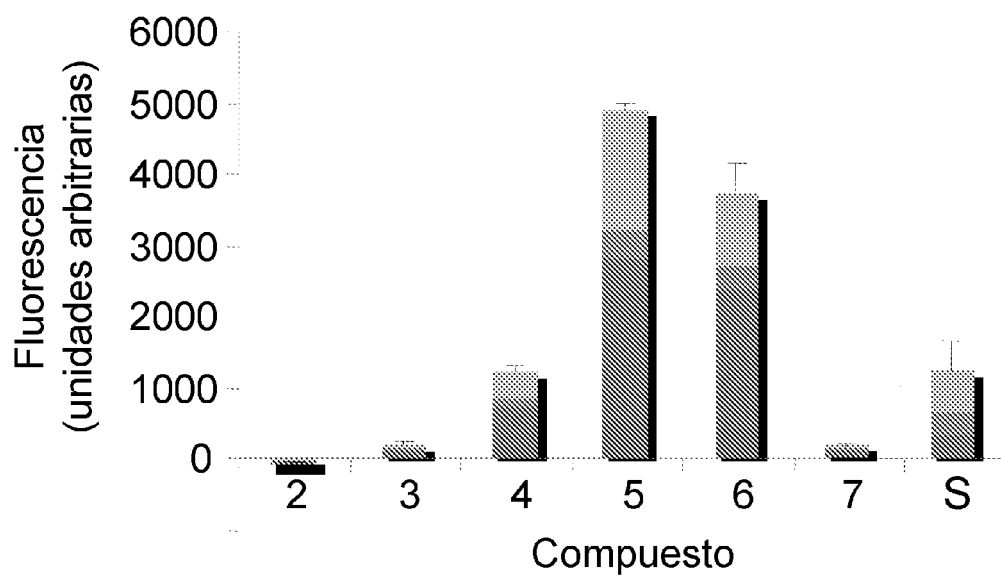


FIG. 1

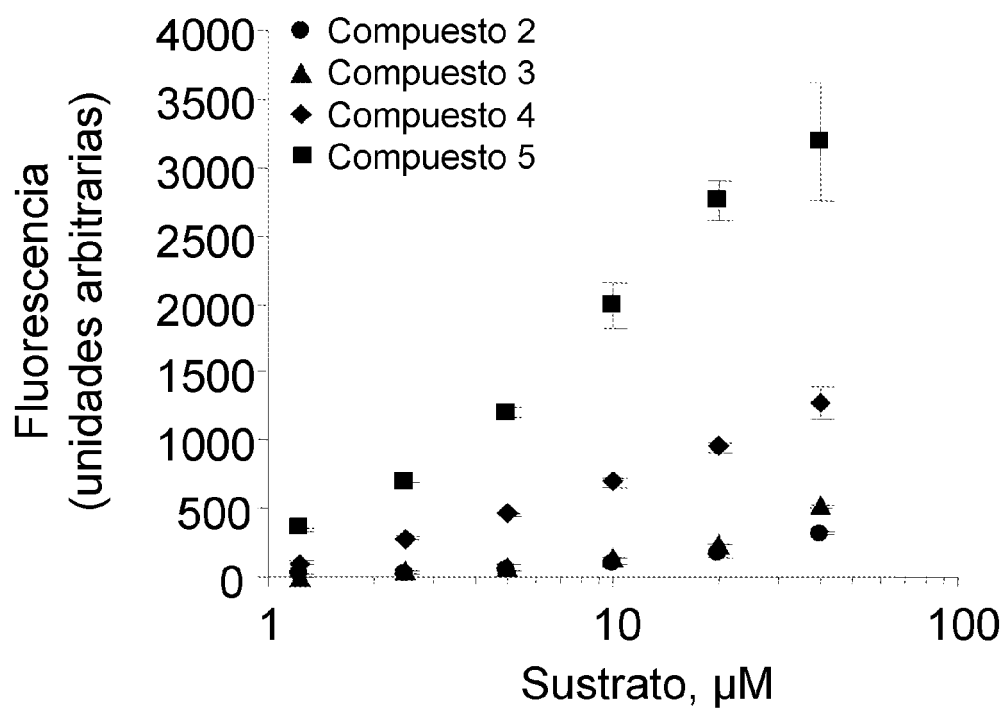


FIG. 2

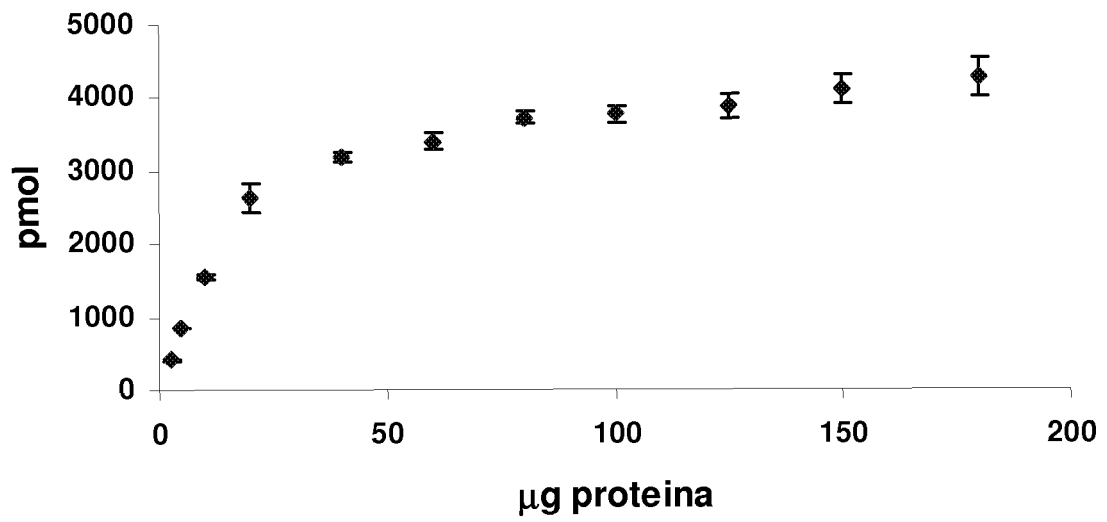


FIG. 3

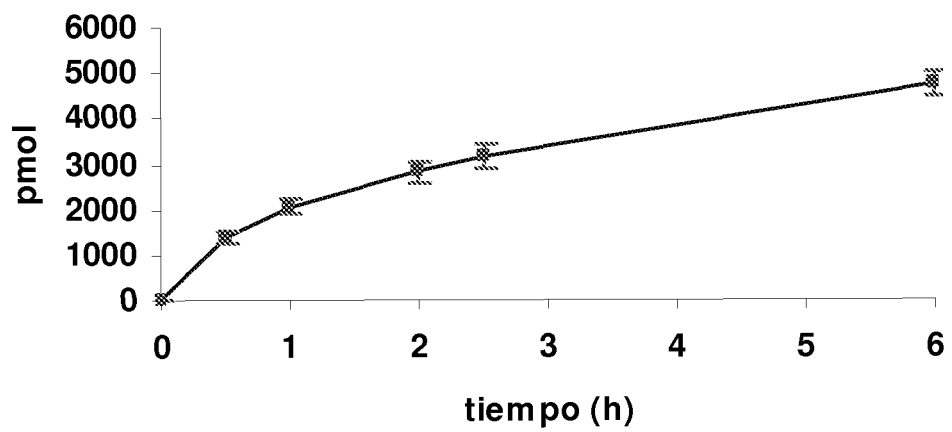


FIG. 4

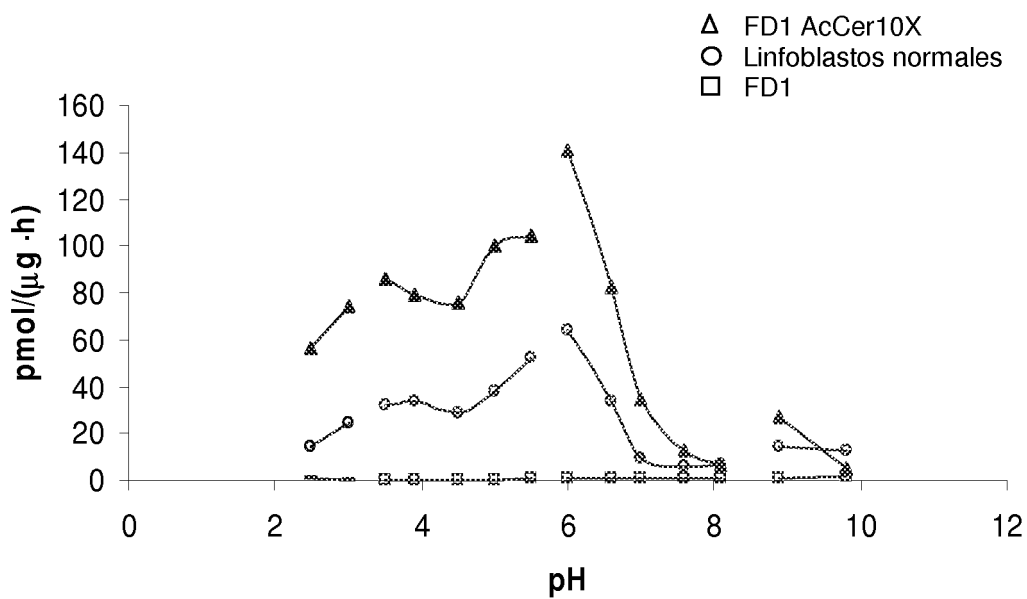


FIG. 5

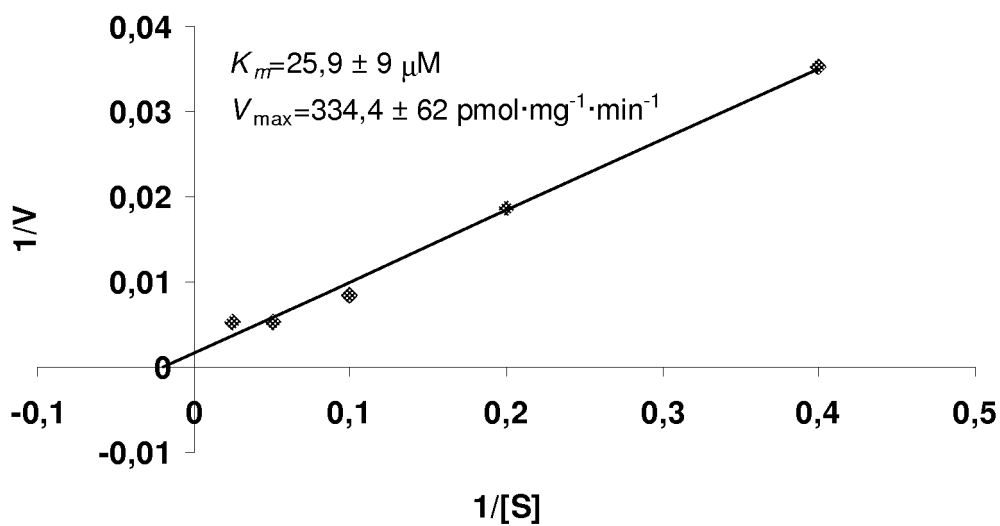


FIG. 6



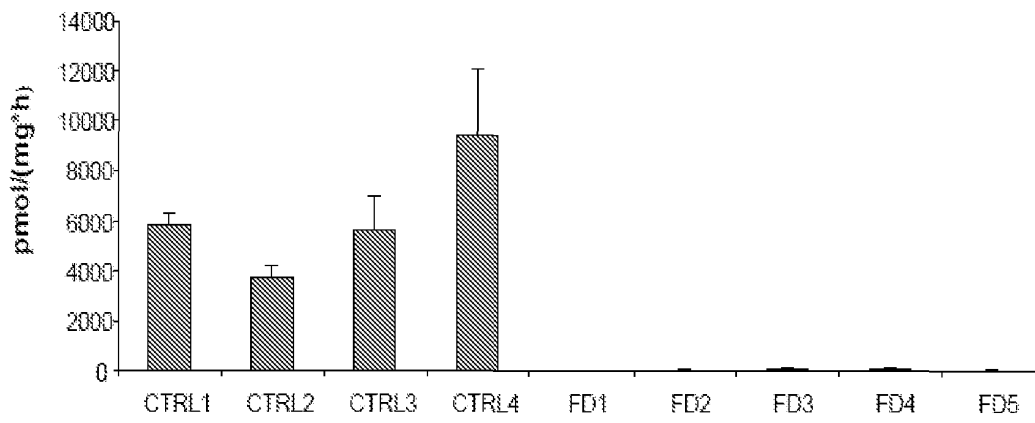


FIG. 7

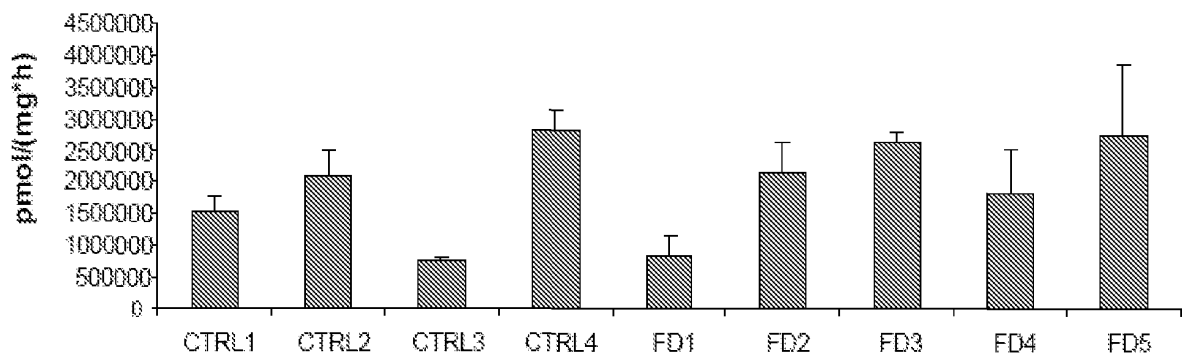


FIG. 8

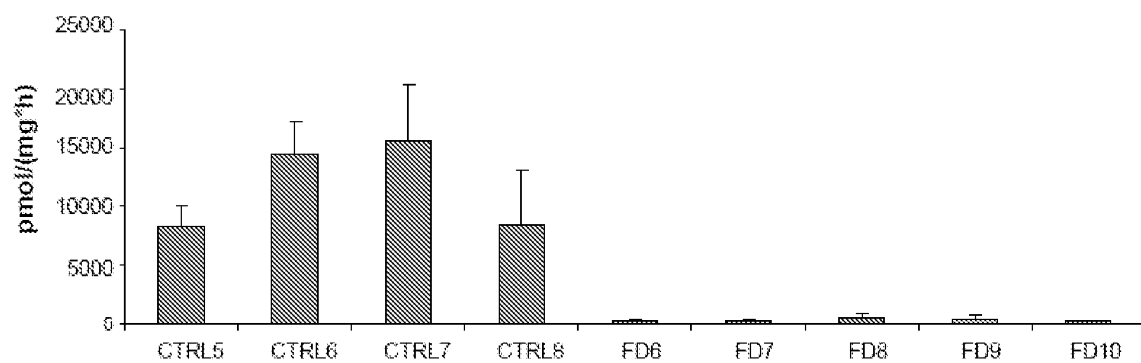


FIG. 9

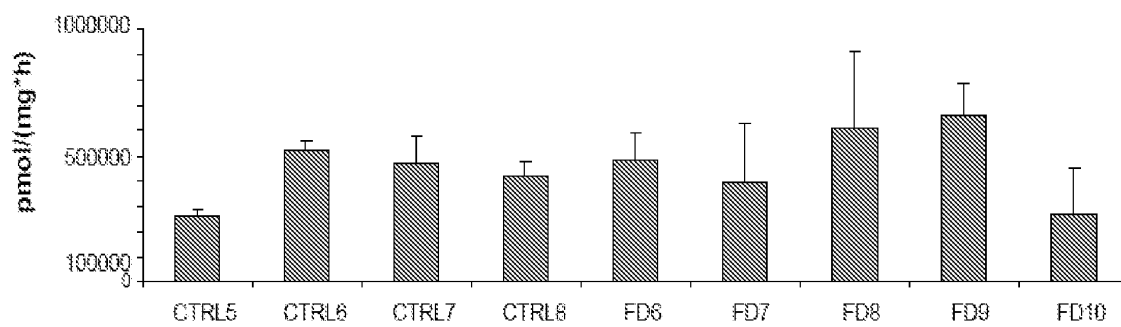


FIG. 10



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031008

②② Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C07C233/17** (2006.01)  
**A61K31/164** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BEDIA, C. et al. "Synthesis of a Novel Ceramide Analogue and its Use in a High-Throughput Fluorogenic Assay for Ceramidases". ChemBioChem, 2007, Vol. 8, páginas 642-648. Ver páginas 643, columnas 1 y 2, Figura 3; página 647, columna 2, párrafos 2 y 3.	1-24
A	NIEWENHUIZEN, W. F. et al. "Synthesis of a novel fluorescent ceramide analogue and its use in the characterization of recombinant ceramidase from Pseudomonas aeruginosa PA01". Chemistry and Physics of Lipids, 2002, Vol. 114, páginas 181-191. Ver página 183, Figura 1, compuesto 10; página 182, resumen; página 183, columna 1, párrafos 4-6; página 189, Discusión.	1-24
A	GRIJALVO, S. et al. "Design, synthesis and activity as acid ceramidase inhibitors of 2-oxooctanoyl and N-oleoylethanolamine analogues". Chemistry and Physics of Lipids, 2006, Vol. 144, páginas 69-84. Ver página 69, resumen; páginas 79 y 80, Resultados, Esquemas 1 y 2.	1-24
A	TANI, M. et al. "Specific and Sensitive Assay for Alkaline and Neutral Ceramidases Involving C12-NBD-Ceramide". The Journal of Biochemistry, 1999, Vol. 125, N. 4, Páginas 746-749. Ver página 746, Resumen.	1-24
A	KUDOH, T. et al. "Diagnosis of Metachromatic Leukodystrophy, Krabbe Disease, and Farber Disease after Uptake of Fatty Acid-labeled Cerebroside Sulfate into Cultured Skin Fibroblast". The Journal of Clinical Investigation, 1982, Vol. 70, Páginas 89-97. Ver página 89, Resumen.	1-24

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
23.09.2011

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/4

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

C07C, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.09.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BEDIA, C. et al. "Synthesis of a Novel Ceramide Analogue and its Use in a High-Throughput Fluorogenic Assay for Ceramidases". ChemBioChem, 2007, Vol. 8, páginas 642-648.	2007
D02	NIEWENHUIZEN, W. F. et al. "Synthesis of a novel fluorescent ceramide analogue and its use in the characterization of recombinant ceramidase from Pseudomonas aeruginosa PA01". Chemistry and Physics of Lipids, 2002, Vol. 114, páginas 181-191.	2002

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud se refiere a compuestos de fórmula general I en los que cuando X es umbeliferona y m es 2, R<sub>1</sub> es distinto de (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>; a un método de diagnóstico de la enfermedad de Farber basado en la detección de fluorescencia de los productos obtenidos tras incubar una muestra biológica aislada de un individuo con los compuestos de fórmula I; al uso de un compuesto de fórmula I para el diagnóstico de la enfermedad de Farber y a un kit para determinar si un individuo padece la enfermedad de Farber que comprende el compuesto de fórmula I.

El documento D01 divulga un compuesto coincidente con los de fórmula general I definidos en la solicitud en el que X es umbeliferona, m es 2 y R<sub>1</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>CH<sub>3</sub>. Dicho compuesto se utiliza para determinar la actividad de ceramidasa en muestras biológicas aisladas de individuos con la enfermedad de Farber mediante un método fluorimétrico. El seguimiento de la actividad ceramidasa se realiza incubando las muestras biológicas con el compuesto señalado anteriormente, oxidando la mezcla obtenida y midiendo la fluorescencia de los productos de oxidación resultantes (páginas 643, columnas 1 y 2, Figura 3; página 647, columna 2, párrafos 2 y 3).

El documento D02 divulga un compuesto diolamida funcionalizado con un grupo fluoróforo (página 183, Figura 1, compuesto 10). Dicho compuesto se utiliza para el estudio y la detección de ceramidasa. El compuesto definido anteriormente reacciona con las ceramidasa hidrolizándose y liberando un grupo altamente fluoróforo y fácilmente detectable (página 183, Figura 1, compuesto I). La deficiencia de ceramidasa está asociada a la enfermedad de Farber (página 182, resumen; página 183, columna 1, párrafos 4-6; página 189, Discusión).

Ninguno de los documentos anteriores, considerados los más cercanos en el estado de la técnica, divulgan ni dirigen al experto en la materia hacia compuestos de fórmula general I como los definidos en la solicitud, ni igualmente hacia ningún método de diagnóstico de la enfermedad de Farber basado en el uso de dichos compuestos.

Por lo tanto la invención definida en las reivindicaciones 1-24 de la solicitud es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).