

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 845**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/45** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07812295 .9**
- 96 Fecha de presentación: **25.06.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2040548**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2009**

54 Título: **Método para el tratamiento de trastornos neurológicos mejorando la actividad de beta-glucocerebrosidasa**

30 Prioridad:  
**23.06.2006 US 815952 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.10.2012**

73 Titular/es:  
**AMICUS THERAPEUTICS, INC.  
6 CEDAR BROOK DRIVE  
CRANBURY, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:  
**WUSTMAN, Brandon**

74 Agente/Representante:  
**Pérez Barquín, Eliana**

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).

**ES 2 387 845 T3**

## DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de trastornos neurológicos mejorando la actividad de  $\beta$ -glucocerebrosidasa

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE.UU. nº de serie 60/815,952, presentada el 23 de junio de 2006, cuya descripción se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva en su totalidad.

10 **Campo de la invención**

- La invención se refiere a métodos para aumentar la actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucocerebrosidasa para el tratamiento de alfa-sinucleinopatías como la enfermedad de Parkinson y para el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick tipo C. la invención proporciona acompañantes farmacológicos específicos para  $\beta$ -glucocerebrosidasa, que aumentan el tránsito citosólico y la actividad enzimática de  $\beta$ -glucocerebrosidasa, presumiblemente estabilizando la enzima.

15 **Antecedentes de la invención**

20 Agregación de proteínas en enfermedades neurodegenerativas

- En las neuronas, los sistemas proteasomal y lisosomal funcionan de forma concertada para mantener la homeóstasis de proteínas degradando proteínas deterioradas, mal plegadas o en exceso. Muchas enfermedades neurodegenerativas asociadas con la agregación patológica de proteínas o lípidos muestran una función proteasomal y lisosomal impedida, incluida la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Gaucher, Tay Sachs, Farber, Niemann-Pick tipos A, B y C, gangliocidosis  $G_{M1}$ , gangliocidosis  $G_{M2}$  y MPS-I. La agregación de proteínas en neuronas es particularmente grave ya que las neuronas son incapaces de regenerarse a partir de una neurodegeneración o apoptosis que surge de la tensión neuronal u otras causas asociadas con la agregación.

- 30 *Agregación de proteínas y lisosomas.* El sistema lisosomal es crítico para prevenir la acumulación de agregados de proteínas que son difíciles de degradar por los proteasomas. La importancia de los lisosomas en la degradación de agregados de proteínas está apoyada por numerosos informes de proteínas lisosomales y marcadores autofágicos que se localizan conjuntamente en la misma estructura con agregados de proteínas encontrados en cerebros humanos (Bjorkoy et al, J Cell Biol. 2005;171(4):603-14; Tribl et al., Mol Cell Proteomics, 2005; 4(7): 945-57; Wong et al., Mol Genet Metab, 2004. 82(3): 192-207; Zhou, J Biol Chem. 2004. 279(37): 39155-64). En particular, la neutralización de los compartimentos ácidos (lisosomas) conduce a la acumulación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -syn) y exacerba la toxicidad de  $\alpha$ -syn en células neuronales post-mitóticas (Lee, J Neurosci, 2004; 24(8): 1888-96). La agregación patológica de  $\alpha$ -syn está asociada con la enfermedad de Parkinson y otras  $\alpha$ -sinucleinopatías. Últimamente, la disfunción de lisosomas ha sido descrita para modelos de ratones transgénicos que acumulan  $\alpha$ -syn (Meredith et al., Brain Res, 2002; 956(1):156-65; Rockenstein et al, J Neurosci Res, 2005; 80(2): 247- 59).

- 45 *Agregación de proteínas y proteasomas.* El proteasoma es integral en la degradación de proteínas citosólicas. La degradación de mediación proteasomal comienza con la modificación de sustratos mediante cadenas de poliubiquitina, que dirige a diana la proteólisis mediante el proteasoma 26S, un complejo de proteasa multicatalítico. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la ubiquitina es un componente de muchas de las estructuras de inclusión filamentosas de enfermedades neurodegenerativas, sugiriendo la activación de una respuesta neuronal común en este tipo de procedimiento de enfermedad (Lowe et al., Neuropathol Appl Neurobiol. 1990; 16: 281 - 91). Diversos estudios genéticos, que incluyen la identificación de mutaciones en genes asociados con la enfermedad de Parkinson familiar (SNCA) y la presencia de inclusiones citoplásmicas proteináceas en neuronas negras dopaminérgicas sobrantes en casos esporádicos de enfermedad de Parkinson, han sugerido una función importante para el sistema de ubiquitina-proteasoma y la degradación de proteínas aberrantes en esta enfermedad (Betarbet et al., Exp Neurol. 2005; 191 Suppl 1: S 17-27).

- 55 Puesto que está bien establecido que la acumulación o agregación de numerosas proteínas y lípidos mal plegados en una célula, incluidas las neuronas, conduce al retículo endoplásmico y tensión celular, cantidades aumentadas de poliubiquitina, una proteína de "tensión" celular, sugieren que el sistema proteasomal está sobreactivado. Sin embargo, una teoría alternativa para las interrupciones en la homeostasis neuronal en las enfermedades de agregación del CNS (sistema nervioso central) es debida a la supresión de la trayectoria de ubiquitina/proteasoma (Rocca et al., Molecular Biology of the Cell. 2001; 12: 1293-1301). Diversos estudios tanto in vivo como in vitro han asociado la agregación de  $\alpha$ -syn y la tensión oxidativa, que son ambas características de la enfermedad de Parkinson a un sistema comprometido de ubiquitina-proteasoma y patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Lev et al., Neurosci Lett. 2006; 399(1-2):27-32). Específicamente, la exposición a especies de oxígeno reactivo (ROS) combinada con la inhibición proteasomal aumentó la formación de agregados de  $\alpha$ -syn sobre la inhibición proteasomal sola. Además de ello, los defectos estructurales y funcionales en proteasomas 26/20S con acumulación y agregación de proteínas anormales potencialmente citotóxicas, han sido identificados en partes compactas de la

sustancia negra de pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica. Además, las mutaciones en SNCA que provocan que la proteína se pliegue mal y resista a la degradación proteasomal están altamente asociadas con la enfermedad de Parkinson familiar. Se mostró también que la  $\alpha$ -syn agregada inhibe la función proteasomal interaccionando con S6', una subunidad del proteasoma (Snyder et al., J Mol Neurosci. 2004; 24(3):425-42).  
 5 Finalmente, la función proteasomal está disminuida en cerebros de sujetos con enfermedad de Parkinson así como en cerebros de individuos y animales que carecen de parkina, que es una E3 ubiquitina ligasa y es una parte integral del sistema proteasomal de ubiquitina.

De este modo, parece que un defecto en el manejo de proteínas por el proteasoma es un factor común en las  
 10 diversas formas esporádicas y familiares de la enfermedad de Parkinson. Esta misma conclusión se extrajo a partir de experimentos en los que se añadieron combinaciones de un inhibidor de proteasomas con agentes que inducen un mal plegado de proteínas a un cultivo de neuronas dopaminérgicas (Mytilineou et al., J Neural Transm. 2004; 111(10-11):1237-51). La pérdida preferencial de neuronas de dopaminas y la muerte celular estuvieron considerablemente aumentadas cuando se combinaron los dos.

Incluso unos niveles bajos de inhibición de proteasomas puede conducir a una infra-regulación del sistema de  
 15 proteasomas de ubiquitina y la activación del sistema lisosomal o respuesta autofágica (Ding et al., J Neurochem, 2003; 86(2):489-97; Iwata et al., Proc Natl Acad Sci U SA, 2005; 102(37):13135-40; Butler et al., Rejuvenation Res. 2005; 8(4):227-37). Se ha propuesto que un desequilibrio entre los acompañantes de ER endógenos y proteínas deterioradas/desnaturalizadas/mal plegadas, que conduce a la acumulación de estas últimas, puede dar lugar a una senescencia, inhibición del proteasoma (que conduce a la apoptosis) o necrosis, dependiendo de la gravedad del desequilibrio (Soti et al., Aging Cell. 2003; 2; 39-45). Esta hipótesis se denomina "hipótesis de acumulación de proteínas tóxicas".

#### 25 Defectos de lípidos y enfermedades neurodegenerativas

Es bien conocido que la acumulación de lípidos está asociada con la neurodegeneración, como es evidente a partir  
 30 de trastornos de almacenamiento lisosomal como enfermedades de Gaucher, Tay Sachs, Farber, Niemann-Pick tipos A, B y C, gangliocidosis G<sub>m1</sub> y MPS-I. Sin embargo, se ha observado también otra acumulación de lípidos en enfermedades neurológicas en las que no hay deficiencias en las hidrolasas lisosomales. Como un ejemplo, las acumulaciones patológicas de lactosilceramidas, GlcCer, G<sub>M2</sub>-gangliósido y acialo-G<sub>M2</sub> se encuentran en la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, que es una enfermedad de almacenamiento de colesterol lisosomal que no está asociada con una esfingomielinasa deficiente debido a mutaciones en sentido equivocado en el gen que codifica la enzima (Vanier et al., Brain Pathology. 1998; 8:163-74). Esta acumulación puede estar provocada por  
 35 otros mecanismos, como un tránsito defectuoso de lípidos. Un sistema de tránsito endosomal sano es crítico para la función neuronal (Buckley et al., J Physiol, 2000; 525(Pt 1):11-9). La interrupción del metabolismo de glicoesfingolípidos, incluido GlcCer, impide el tránsito celular y provoca el secuestro y acumulación de colesterol (Pagano et al., Traffic, 2000; 1(11): 807-15; Sillence et al., J Lipid Res, 2002; 43(11):1837-1845; Helms et al., Traffic, 2004; 5(4):247-54). Los glicolípidos acumulados forman "montones de lípidos que pueden secuestran proteínas  
 40 importantes para mantener el tránsito normal en el sistema endosomal (Pagano, *supra*). Además de ello, el tránsito defectuoso de lípidos observados en fibroblastos a partir de células tipo C de Niemann-Pick puede ser invertido mediante tratamiento con un potente inhibidor de la biosíntesis de glicoesfingolípidos (Lachmann et al., Neurobiol Dis, 2004; 16(3):654-8), destacando adicionalmente la implicación de GlcCer y otros lípidos en la patología de esta enfermedad.

Además, la asociación con montones de lípidos es necesaria para una localización normal de  $\alpha$ -syn en su ubicación  
 45 celular nativa, las sinapsas (Fortin et al., J Neurosci, 2004; 24(30):6715-23). Las mutaciones asociadas con la patología de la enfermedad de Parkinson interrumpen esta asociación. Por tanto, los cambios en la composición de montones de lípidos que pueden interrumpir también esta asociación podrían contribuir a la enfermedad de  
 50 Parkinson impidiendo la localización y distribución normal de  $\alpha$ -syn también.

#### Asistencia de glicoesfingolípidos para sembrar agregación de proteínas

La  $\alpha$ -sinucleína tiene una afinidad elevada por gangliósidos, un  $\alpha$ -syn de tipo salvaje forma complejos estables de  
 55 SDS con gangliósidos que tienen GlcCer en su núcleo (Zimran et al., N Engl J Med, 2005; 352(7):728-31). Las formas solubles de alfa-Sin y proteína  $\beta$ -amiloido se unen fuertemente a G<sub>M1</sub>, sembrando potencialmente la agregación aggregation (Yanagisawa et al., Neurobiol Aging, 1998; 19(1 Suppl):S65-7; Yanagisawa et al., Nat Med, 1995; 1(10):1062-6; Lee et al., J Biol Chem, 2002; 277(1): 671-8; Hayashi et al., J Neurosci. 2004; May 19;24(20):4894-902). Recientemente, unos experimentos basados en células han demostrado que las mutaciones de la enzima lisosomal  $\beta$ -glucocerebrosidasa (GCasa) pueden aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad de  
 60 Parkinson (Aharon-Peretz, et al., N Engl J Med, 2004; 351(19): 1972-7; Goker-Alpan et al., J Med Genet, 2004; 41(12):937-40; Clark et al., Mov Disord, 2005; 20(1):100-3; Eblan et al., Mov Disord, 2005; 31 :31). Aunque los portadores de alelos mutantes no parece que acumulen niveles significativos de glucosilceramida (histiológicamente), los cambios tenues en el metabolismo de glicoesfingolípidos podrían aumentar el riesgo de  
 65 enfermedad de Parkinson en estos individuos, por ejemplo, interrumpiendo las respuestas autofágicas respecto a

agregados normales o inhibiendo los proteasomas. Además, los pacientes con enfermedad de Gaucher de tipo 1 (debida a deficiencias de GCASa) y Parkinsonismo/demencia exhibían inclusiones positivas a  $\alpha$ -syn en neuronas CA2-4 del hipocampo; un paciente tenía estructuras de Lewy de tipo tronco encefálico y tipo cortical y uno tenía una pérdida neuronal considerable de neuronas de sustancia negra (Wong et al., Mol. Genet. Metabol. 2004; 38: 192-207).

Análogamente, in vitro, algunas vesículas unifamiliares grandes de lípidos cerebrales se asociaron fácilmente con fragmentos de exon 1 de Huntingtina N-terminal solubles, la proteína patológica que se acumula en la enfermedad de Huntington y estimularon la fibrillogénesis de agregados de Huntingtina mutante (Suopanki et al., J Neurochem. 2006; 96(3):870-84). Finalmente, en un modelo de ratón de enfermedad de Sandhoff (gangliocidosis  $G_{M2}$ ), la  $\alpha$ -syn y  $\beta$ -sinucleína se acumulan en las neuronas además de los gangliósidos  $G_{M2}$  (Suzuki et al., Neuroreport., 2003; 14(4):551-4). Por tanto, la manipulación del metabolismo de gangliósidos podría afectar a la propensión de las proteínas a formar agregados.

Lo que antecede sugiere que las interacciones de lípidos in vivo podrían tener una influencia en el mal legado de las proteínas y puede desempeñar una función significativa en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas.

#### Acumulación e inflamación de lípidos y/o proteínas

La inflamación se ha reconocido de forma creciente que desempeña una función importante en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Han sido descritos estigmas inflamatorios e inmunes, o incluso autoinmunes, en cerebros post-mortem de pacientes de enfermedad de Parkinson. Los agregados de  $\alpha$ -syn podrían activar las células microgliales, dando lugar a una inflamación crónica que conduce a la neurodegeneración (Wersinger et al., Curr Med Chem. 2006;13(5):591-602).

#### Acompañantes farmacológicos derivados de inhibidores de enzimas específicas, enzimas mutantes de rescate y enzimas de tipo salvaje mejoradas

Se ha mostrado anteriormente que la unión de inhibidores de moléculas pequeñas de enzimas asociadas con LCD pueden aumentar la estabilidad de enzimas mutantes y las correspondientes enzimas de tipo salvaje (véanse las patentes de EE.UU. nº 6.274.597, 6.583.158, 6.589.964, 6.599.919, 6.916.889 y 7.141.582, todas incorporadas como referencia a la presente memoria descriptiva). En particular, se descubrió que la administración de derivados de moléculas pequeñas de glucosa y galactosa, que son inhibidores competitivos selectivos y específicos para diversas enzimas lisosomales dianas, aumentó eficazmente la estabilidad de las enzimas en células in vitro y, por tanto, aumentaron la cantidad de la enzima en el lisosoma, según se determino midiendo la actividad enzimática. Por tanto, aumentando la cantidad de enzima en el lisosoma, se espera que aumente la hidrólisis de los sustratos enzimáticos. La teoría original que subyace en esta estrategia era como sigue: como la proteína de enzima mutante es inestable en el ER (Ishii et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática es retardada en la trayectoria de transporte normal (ER  $\rightarrow$  aparato de Golgi  $\rightarrow$  endosomas  $\rightarrow$  lisosoma) y se degradó prematuramente. Por lo tanto, un compuesto que se una y aumente la estabilidad de una enzima mutante puede servir como un "acompañante" para la enzima y aumentar la cantidad que puede existir en el ER y desplazarse a los lisosomas. Además, como el plegado y el tránsito de proteínas de tipo salvaje es incompleto, siendo degradadas hasta un 70% de algunas proteínas de tipo salvaje en algunos casos antes de alcanzar su ubicación celular final, los acompañantes pueden ser usados para estabilizar enzimas de tipo salvaje y aumentar la cantidad de enzima que puede salir del ER y hacerlas transitar hasta las ubicaciones celulares nativas.

Puesto que se conoce que algunos inhibidores enzimáticos se unen específicamente al centro catalítico de la enzima (el "sitio activa", dando lugar a la estabilización de la conformación enzimática in vitro, estos inhibidores se propuso de forma algo paradójica, que eran acompañantes eficaces que podrían ayudar a restaurar la salida del ER, haciéndolos transitar hasta los lisosomas, y la actividad hidrolítica. Estos acompañantes farmacológicos específicos se denominaron "acompañantes específicos de sitios activos (ASSC)" o "acompañantes farmacológicos específicos" ya que se unían en el sitio activo de la enzima de una forma específica y no tenían un efecto general sobre todas las proteínas.

Un método para tratar la enfermedad de Parkinson en individuos que tienen mutaciones en GCASa lisosomal y, por tanto, una reducción en la actividad de GCasa, se describe en la solicitud de EE.UU. en tramite nº de serie 11/449.528, presentada el 8 de junio de 2006. Aunque el rescate de enzimas lisosomales mutantes puede invertir la patología de ciertas enfermedades, continúa habiendo una necesidad de reducir la patología de enfermedades que no incluyen mutaciones enzimáticas lisosomales particulares, pero para las que sería ventajoso un aumento de las enzimas lisosomales.

#### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un tratamiento o prevención de un trastorno neurológico en un individuo, en el que el trastorno neurológico está asociado con la agregación de proteínas y lípidos en las células del sistema

nervioso central, administrando una cantidad eficaz de un acompañante farmacológico específico para GCasa, pero en el que el trastorno neurológico no está asociado con una GCasa mutante.

5 En una realización, la presente invención proporciona un método para mejorar el plegado intracelular y el tratamiento y, por tanto, la actividad de GCasa de tipo salvaje exponiendo las neuronas a una cantidad eficaz de acompañante farmacológico específico para GCasa.

En un aspecto de esta realización, el trastorno neurológico que va a ser tratado es una  $\alpha$ -sinucleinopatía.

10 En realizaciones específicas, la  $\alpha$ -sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson, enfermedad de estructuras de Lewy, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Hallervorden-Spatz o demencia frontotemporal.

En otro aspecto de esta realización, el trastorno neurológico que va a ser tratado es la enfermedad de Parkinson.

15 En otro aspecto de esta realización, el trastorno neurológico que va a ser tratado es enfermedad de tipo C de Niemann-Pick (NPCD).

En una realización de la invención, el acompañante farmacológico es un inhibidor reversible de GCasa.

20 En una realización específica de este aspecto de la invención, el acompañante farmacológico es isofagomina o una sal de la misma.

En una realización adicional, el aumento de la actividad enzimática de GCasa es al menos, pero sin limitación, de 1,2, 1,5, 2, 3 o 5 veces sobre los niveles basales.

25 En una realización alternativa en la que el trastorno neurodegenerativo es la enfermedad de tipo C de Niemann-Pick, el segundo agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en alopreganolona, una estatina, un fenofibrato, niacina; ezitiniva, una resina de unión, un acompañante farmacológico específico para  $\beta$ -hexosaminidasa A o  $\beta$ -galactocidasa, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nogirimicina, nastatina, 30 4-epi-isofagomina y 1-desoxigalactonogirimicina.

La presente invención se refiere también al tratamiento o prevención de un trastorno neurodegenerativo en un individuo que tiene o que está en riesgo de desarrollar un trastorno neurodegenerativo, en que el individuo no tiene una mutación en el gen que codifica GCasa, administrando al individuo un acompañante farmacológico que se une a 35 GCasa.

La invención proporciona también una terapia de combinación con el acompañante de GCasa y los otros agentes terapéuticos para el tratamiento del trastorno neurológico. Además, la invención proporciona composiciones de 40 materia que comprende una mezcla de un acompañante farmacológico de GCasa y otro agente terapéutico. En una realización en la que el trastorno neurológico es la enfermedad de Parkinson, Parkinsonismo o demencia con estructuras de Lewy, el segundo agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en levodopa un anticolinérgico, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa (COMT), un agonista de receptores de dopamina, un inhibidor de monoaminaoxidasa (MAOI), un inhibidor de descarboxilasa periférica y un antiinflamatorio.

#### 45 **Breve descripción de los dibujos**

El archivo de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. As copias de la publicación de la patente o solicitud de patente con dibujo(s) en color se proporcionarán por la oficina tras una petición y pago de la 50 tasa necesaria.

Figura 1. La figura 1 muestra el aumento de GCasa en el bazo, pulmón, cerebro e hígado de ratones C57BL6 normales tratados con 200 mg/kg/día de tartrato de isofagomina (IFG; AT2101) durante 4 semanas.

55 Figura 2. La figura 2 muestra cambios en la actividad de GCasa a continuación de la administración de tartrato de isofagomina a voluntarios sanos.

Figura 3A-C. La figura 3 muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para  $\alpha$ -sinucleína en la corteza de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína tratados o sin tratar con tartrato de IFG. La figura 3A muestra los resultados de un testigo tratado con vehículo; las figuras 3B y 3C muestran los resultados de ratones tratados con 2 mg/kg diarios durante 3 mese. 60

Figura 4A-C. La figura 4 muestra resultados cualitativos de la tinción inmunohistoquímica para  $\alpha$ -sinucleína en el hipocampo de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína tratados o sin tratar con tartrato de IFG. La figura 4A muestra los resultados de un testigo tratado con vehículo; las figuras 4B y 4C muestran resultados de 65 ratones tratados con 2 mg/kg diarios durante 3 meses.

Figura 5A-D. La figura 5 muestra resultados cualitativos de la tinción inmunohistoquímica para  $\alpha$ -sinucleína en muestras pre-tratadas con proteinasa K del cerebro de un ratón transgénico.

5 Figura 6A-B. La figura 6 muestra resultados cuantitativos de una tinción inmunohistoquímica para  $\alpha$ -sinucleína la corteza (A) y el hipocampo (B) de ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína, tratados o sin tratar con IGF a las concentraciones indicadas durante 3 meses. Se evaluó el número de células positivas a  $\alpha$ -sinucleína por  $\text{mm}^2$ .

## 10 Descripción detallada

La presente invención se refiere al descubrimiento de que un acompañante farmacológico específico puede aumentar la actividad de GCasa de tipo salvaje hasta un nivel suficiente para inhibir, incluso hasta el punto de la prevención de una patología asociada con la constitución de proteínas agregadas y lípidos de sustrato. A su vez, esto puede ser usado para tratar factores de riesgos neurológicos, estados o trastornos asociados con la agregación de las proteínas de lípidos de sustratos en las células del sistema nervioso central.

20 Específicamente, la presente invención proporciona un método para administrar uno o más acompañantes farmacológicos para GCasa a un individuo diagnosticado en riesgo o que se sospecha que tiene un trastorno neurológico que podría aprovecharse de una actividad aumentada de GCasa. Los acompañantes farmacológicos adecuados incluyen cualesquiera compuestos que, a continuación de la administración a un individuo se unan específicamente a GCasa, aumenten la estabilidad y el tránsito de GCasa y aumenten así la actividad de GCasa en el lisosoma, con la condición de que la enfermedad o trastorno neurológico no esté asociado con una mutación en el gen que codifica GCasa. La mejora de la función enzimática en las células del sistema nervioso central, presumiblemente como consecuencia de una forma intracelular más estable de GCasa, aumenta el metabolismo de sustratos de péptidos asociados a GCasa y lípidos de GCasa en las células, lo que útil en el tratamiento de trastornos neurológicos como enfermedad de Parkinson y enfermedad de Niemann-Pick tipo C, ninguna de las cuales está asociada con una actividad deficiente de GCasa.

30 La invención está basada, en parte, en el descubrimiento de la capacidad de un acompañante farmacológico para favorecer significativamente la actividad de proteínas de tipo salvaje en seres humanos. Este fenómeno es altamente específico para la proteína específicamente unida mediante el acompañante farmacológico particular, en contraste con los métodos que funcionan generalmente tras la expresión de todas las proteínas. Los resultados experimentales que subyacen en la presente invención incluyen las observaciones de que los acompañantes farmacológicos pueden aumentar la actividad endógena de proteínas de tipo salvaje en al menos aproximadamente 20- 25%, en algunos casos en al menos aproximadamente 50% y en realizaciones específicas en al menos aproximadamente 90% e incluso 100%. Este nivel de aumento in vivo no fue observado con células en un cultivo de tejidos, y resulta sorprendente, dada la previsión de que los procedimientos fisiológicos normales amortiguarían los efectos de los acompañantes farmacológicos in vivo. No había ninguna base para esperar que un acompañante farmacológico pudiera aumentar el nivel de actividad de una proteína de tipo salvaje in vivo en un ser humano en al menos 20-25% y, particularmente, en al menos aproximadamente 50%. Como se ejemplifica más adelante, la administración de isofagomina a sujetos sanos dio lugar a un aumento dependiente de la dosis de GCasa (figura 2). En algunas concentraciones, que se ensayaron fácilmente usando ensayos rutinarios de respuesta a la dosis, el nivel de aumento de la actividad enzimática aumentó en al menos 50% hasta 100%.

45 La presente invención resultó de la conexión conocida entre la insuficiencia de enzima lisosomal y los estados de enfermedades neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Gaucher tipos 2 y 3) y del hecho de que la agregación de proteínas y/o lípidos y la muerte/degeneración neuronal se observan en muchos trastornos neurodegenerativos que no son de LCD, como se describió anteriormente en la sección de antecedentes. Por tanto, la presente invención aprovecha inesperadamente la capacidad de aumentar la actividad de enzimas lisosomales no deficientes para aumentar la desaparición de agregados de proteínas, particularmente agregados en los que las proteínas (o fragmentos de las mismas que incluyen monómeros) están asociados con sustratos de lípidos de la enzima lisosomal como, por ejemplo, SCNA con GlcCer. La reducción del sustrato de lípidos al que se asocia la proteína patológica probablemente reducirá la agregación de la proteína patológica, mejorando así los síntomas neurológicos y/o evitando la muerte neuronal o neurodegeneración. Alternativamente, el aumento de la actividad de GCasa puede reducir la concentración de un lípido que su vez, proporciona un entorno celular más capaz de controlar la degradación de proteínas propensas a la agregación.

60 La invención aprovecha también inesperadamente la capacidad para aumentar la actividad de enzimas lisosomales no deficientes para alterar el perfil de lípidos en neuronas en la que hay una acumulación de GlcCer, glucoesfingocina (GlcSph; u otros lípidos cuyos niveles cambian en respuesta a la actividad de GCasa debido a un metabolismo anormal de lípidos) mediante un mecanismo distinto del de una actividad reducida de GCasa o debido a normalidades en el tránsito de lípidos intracelular.

65 El uso de acompañantes farmacológicos específicos según la presente invención tiene ventajas potenciales sobre otros métodos para complementar GCasa, como mediante administración de enzima recombinante (ERT) o usando

una terapia de reducción de sustrato (SRT) por ejemplo con Zavesca®, ya que el primero debe ser administrado directamente en el cerebro a través de un catéter y el último inhibe la síntesis de numerosos glucolípidos, y no solamente el que puede ser ventajoso para disminuir para un trastorno neurológico particular. El Zavesca® tiene efectos secundarios graves y su uso está limitado a pacientes que no pueden tolerar ERT. Por lo tanto, estos tratamientos son menos eficaces que un tratamiento que pueda aumentar la actividad de hidrolasas con cualquiera que sea la elección.

## DEFINICIONES

### 10 Biológicas y químicas

Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y el el contexto específico en el que se use cada término. Ciertos término se exponen con posterioridad o en algún lugar en la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al facultativo para describir las composiciones y métodos de la invención y el modo de preparar y usar la invención.

Las expresiones “trastorno neurológico” o “trastorno neurodegenerativo” se refieren a cualquier enfermedad del sistema nervioso central (CNS) o sistema nervioso periférico (PNS) que esté asociada con defectos de células neuronales o gliales, pero no limitadas a pérdida neuronal, degeneración neuronal, desmielinación neuronal, gliosis (incluidas macro- y micro-gliosis) o acumulación neuronal o extraneuronal de proteínas o toxinas aberrantes (por ejemplo,  $\beta$ -amiloide o  $\alpha$ -sinucleína). El trastorno neurológico puede ser crónico o agudo. Ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, la enfermedad de Gaucher, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Huntington, ataxia de Fredrich, dificultad cognitiva leve, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Parkinson, enfermedad de estructuras de Lewy, demencia frontotemporal (FTD), atrofia sistémica múltiple (MSA), parálisis supranuclear progresiva y trastornos de movimientos (que incluyen ataxia, parálisis cerebral, coreoatosis, distonía, síndrome de Tourette Kernícterus ) y trastornos de temblores y leucodistrofias (que incluyen adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Canavan, enfermedad de Alexander, enfermedad de (Pelizaeus-Merzbacher lipofuxinosis ceroide neuronal, ataxia Telangetaxia y síndrome de Rett.

En particular, el término “ $\alpha$ -sinucleinopatía” se refiere a enfermedades asociadas con la acumulación aberrante de  $\alpha$ -syn incluidas, pero sin limitación, Parkinsonismo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de estructuras de Lewy, atrofia sistémica múltiple, enfermedad de Hallervorden-Spatz y demencia frontotemporal.

Un “trastorno neurológico asociado con mutaciones en una enzima lisosomal” se refiere a cualquier trastorno neurológico en el que están presentes también mutaciones en uno o más gen o genes lisosomales cuando se valoran en individuos que tienen el trastorno neurológico, en comparación con individuos que no tienen el trastorno neurológico. En un ejemplo no limitativo, el trastorno neurológico asociado con las mutaciones de Gba es un trastorno de almacenamiento lisosomal, como la enfermedad de Gaucher, o una enfermedad neurodegenerativa asociada con una mutación de Gba heterocigótica, como un subconjunto de pacientes con enfermedad de Parkinson. Un aspecto de la presente invención es el que se refiere al tratamiento de un trastorno neurológico que no incluye una mutación en Gba.

La expresión “aumento en la actividad lisosomal” se refiere a aumentar la cantidad de un polipéptido de enzima lisosomal que adopta una conformación funcional en el ER en una célula en contacto con un acompañante farmacológico específico para la enzima lisosomal, por lo tanto, aumentando la velocidad del metabolismo de lípidos y/o proteínas mediado por el lisosoma en una célula con relación a la velocidad anterior a la administración del (o de los) acompañante(s) farmacológico(s). Aunque un aumento en la actividad de una enzima lisosomal única en el lisosoma dará lugar a un aumento en la actividad lisosomal, la invención proporciona ventajosamente un aumento de la actividad en un cierto número de enzimas lisosomales, dando lugar a un metabolismo amplio de lípidos y/o proteínas.

La expresión anteriormente mencionada puede significar también aumentar la eficacia de transporte de un polipéptido de enzima lisosomal desde el ER hasta el lisosoma en una célula en contacto con un acompañante farmacológico específico para la enzima lisosomal, en relación con la eficacia de transporte de polipéptido de enzima lisosomal endógena de tipo salvaje en una célula (preferentemente del mismo tipo de células) que no está en contacto con el acompañante farmacológico específico para la enzima lisosomal.

Las expresiones “enzima lisosomal” o “enzima de lisosoma” se refieren a cualquier enzima que funciona en el lisosoma. Las enzimas lisosomales incluyen, pero sin limitación,  $\alpha$ -galactosidasa A,  $\beta$ -glucosidasa;  $\alpha$ -glucosidas;  $\beta$ -hexosaminidasa A;  $\beta$ -hexosaminidasa B;  $\alpha$ -L-hiduronidasa;  $\beta$ -galactosidasa;  $\beta$ -glucuronidasa;  $\alpha$ -glucuronidasa;  $\alpha$ -fucosidasa; sulfatasas; ceramidasa ácida; NPC1; esfingomielinasa ácida; prosapocina (sapocinas A, B, C, D); catepsinas (A, D, H, S, Z); H (+)- ATPasas; sialidasa,  $\beta$ -galactocerebrosidasa; arilsulfatasa; hiduronato-2-sulfatasa; heparan - N-sulfatasa;  $\alpha$ -N-acetil glucosaminidasa;  $\alpha$ -glucosamidina-N-acetiltransferasa; N-acetilglucosamina-6-sulfatosulfatasa; N-acetilgalactosamino-6-sulfatosulfatasa; arilsulfatasa B;  $\alpha$ -manosidasa ácida;  $\beta$ -manocidasa ácida;

$\alpha$ -L-fucosidasa ácida;  $\alpha$ -N-acetil-neurominidasa;  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa y  $\alpha$ -N-acetil galactosiminidas.

La expresión “enzima lisosomal de tipo salvaje” se refiere a los polipéptidos lisosomales endógenos normales y las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de enzimas lisosomales y cualquier otra secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido de enzima lisosomal (que tenga las mismas propiedades funcionales y afinidades de unión que el polipéptido anteriormente mencionado), como las variante alélicas en individuos normales, que tienen la capacidad de conseguir una conformación funcional en el ER, consiguen la localización lisosomal y exhiben actividad de tipo salvaje (es decir, disminuir las concentraciones de sustrato de enzima lisosomal). Una enzima lisosomal de tipo salvaje no es una proteína o enzima mutante o mutada. Sin embargo, la invención no excluye la posibilidad de que haya más de un alelo de tipo salvaje para un enzima lisosomal. Por tanto, esta expresión incluye polimorfismos que no tienen efectos perjudiciales sobre la función o actividad de la enzima lisosomal.

Ciertos ensayos pueden evaluar características de una proteína que pueden corresponder o no a su función in vivo real, pero, no obstante, son sucedáneos de la funcionalidad de la proteína y un comportamiento de tipo salvaje en estos ensayos es una consecuencia aceptable del rescate de la proteína o las técnicas de mejora de la invención. Una de estas actividades de acuerdo con la invención es el transporte apropiado de una enzima lisosomal de tipo salvaje desde el retículo endoplásmico hasta el lisosoma, su ubicación nativa.

Como se usan en la presente memoria descriptiva, las expresiones “proteína mutada o “enzima mutada” se refieren a proteína o enzimas trasladadas desde genes que contienen mutaciones genéticas que dan lugar a secuencias de proteínas alteradas de la secuencia de tipo salvaje que tienen un efecto sobre la función o actividad de la proteína. En una realización específica, estas mutaciones dan lugar a la inestabilidad de la proteína para conseguir una conformación estable bajo las condiciones normalmente presentes en el ER. El fallo para conseguir esta conformación da lugar a que estas proteínas se degraden o se agreguen en lugar de ser transportadas a través de su trayectoria normal en el sistema de transporte de proteínas hasta su ubicación apropiada en la célula. Las mutaciones distintas de las mutaciones conformacionales pueden dar lugar también a una actividad enzimática disminuida o una renovación más rápida.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, las expresiones “acompañante farmacológico” o a veces “acompañante farmacológico específico” (“SPC”) se refieren a una molécula, como una molécula pequeña, proteína, péptido, ácido nucleico o hidrato de carbono, que se une específicamente a una proteína y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) aumentar la formación de una conformación estable de la proteína, (ii) indicar el tránsito de la proteína desde el ER hasta otra ubicación celular, preferentemente una ubicación celular nativa, es decir, prevenir la degradación asociada al ER de la proteína (iii) prevenir la agregación de proteínas mal plegadas; y/o (iv) restaurar o aumenta la función al menos parcial de tipo salvaje y/o la actividad de la proteína. Un compuesto que se une específicamente, por ejemplo, a una enzima lisosomal significa que se une y ejerce un efecto de acompañamiento sobre la enzima lisosomal y no un grupo genérico de proteínas relacionadas o sin relacionar. Por tanto, un acompañante farmacológico para una enzima lisosomal es una molécula que se une preferentemente a esa enzima lisosomal, dando lugar a un plegado apropiado, tránsito, ausencia de agregación y actividad de la enzima lisosomal. Como se usa en la presente memoria descriptiva, esta expresión no se refiere a acompañantes endógenos, como Bip ni a agentes no específicos que hayan demostrado actividad acompañante frente a diversas proteínas como DMSO o agua deuterada.

En una realización no limitativa, el acompañante farmacológica puede ser un inhibidor, o un análogo estructuralmente similar del mismo, de GCasa. El acompañante farmacológico es isofagomina y sus sales.

Un “inhibidor competitivo” de una enzima se puede referir a un compuesto que se asemeja estructuralmente a la estructura química y la geometría molecular del sustrato enzimático para unirse a la enzima aproximadamente en la misma ubicación que el sustrato. Por tanto, el inhibidor compite por el mismo sitio activo que la molécula del sustrato, aumentando así la Km. La inhibición competitiva es habitualmente reversible si están disponibles suficientes moléculas de sustrato para desplazar el inhibidor, es decir, se pueden inhibir inhibidores competitivos de forma reversible. Por lo tanto, la cantidad de inhibición de enzimas depende de la concentración del inhibidor, la concentración de sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el sitio activo.

La inhibición competitiva no clásica se produce cuando el inhibidor se une a un sitio que está alejado del sitio activo, creando un cambio conformacional en la enzima, de forma que el sustrato ya no se puede unir a la misma. En una inhibición competitiva no clásica, la unión del sustrato en el sitio activo evita la unión del inhibidor en un sitio separado y viceversa. Esto incluye la inhibición alostérica.

Un “inhibidor no competitivo” se refiere a un compuesto que forma enlaces fuertes con una enzima y no puede ser desplazado mediante la adición de sustrato en exceso, es decir, los inhibidores no competitivos pueden ser irreversibles. Un inhibidor no competitivo puede estar unido en, cerca o alejado, del sitio activo de una enzima o proteína y en conexión con enzimas no tiene efecto sobre la Km pero disminuye la Vmax.

La inhibición no competitiva se refiere a una situación en la que el inhibidor se une solamente al complejo ES. La enzima se convierte en inactiva cuando se une el inhibidor. Esto difiere de los inhibidores competitivos no clásicos que se pueden unir a la enzima en ausencia de sustrato.

- 5 El término “V<sub>max</sub>” se refiere a la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por enzimas, es decir a niveles de saturación de sustrato.

El término “K<sub>m</sub>” es la concentración de sustrato necesaria para conseguir 1/2 V<sub>max</sub>.

- 10 Un “mejorador” enzimático es un compuesto que se une a una enzima lisosomal y aumenta la velocidad de reacción enzimática.

15 La expresión “estabilizar una enzima lisosomal” se refiere a la capacidad de un acompañante farmacológico para inducir o estabilizar una conformación de una proteína de enzima lisosomal de tipo salvaje o funcionalmente idéntica. La expresión “funcionalmente idéntica” significa que aunque puede haber variaciones menores en la conformación (casi todas las proteínas exhiben alguna flexibilidad conformacional en su estado fisiológico), la flexibilidad conformacional no da lugar (1) agregación de proteínas (2) eliminación a través de la trayectoria de degradación asociada al retículo endoplásmico (3) impedimento de función proteica, por ejemplo, degradar proteínas deterioradas, mal plegadas o en exceso y/o (4) transporte inapropiado en la célula, por ejemplo, localización a un lisosoma con el citosol, hasta un grado mayor o menos que la de la proteína de tipo salvaje. La estabilización puede ser determinada mediante 1D (i) semi-vida de la enzima aumentada en la célula (ii) niveles aumentados de enzima en el lisosoma; o (ii) actividad hidrolítica aumentadas medida en lisados celulares, usando un sustrato artificial.

25 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “eficacia de transporte se refiere a la capacidad de una proteína mutante para ser transportada fuera del retículo endoplásmico hasta su ubicación nativa en la célula, membrana celular o en el entorno extracelular. La ubicación nativa para una enzima lisosomal es el lisosoma.

30 Como se usan en la presente memoria descriptiva, los términos “paciente” o “población paciente” se refieren a individuo(s) que se a diagnosticado que tiene(n) un trastorno neurológico o está(n) en riesgo de desarrollar un trastorno neurológico. El diagnóstico de trastornos neurológicos incluye la identificación de síntomas de función neurológica disminuida. Los síntomas incluyen, pero sin limitación, temblor, temblores en las manos, brazos, piernas, mandíbulas y cara; rigidez o dureza de las extremidades y el tronco; bradiquinesia o lentitud de movimientos; inestabilidad postural o equilibrio y coordinación dificultosos; amnesia; afasia, apraxia ;agnosia; cambios de personalidad, depresión alucinaciones y delirios. Los métodos para diagnosticar trastornos neurológicos son conocidos por los expertos en la técnica. En una realización el trastorno neurológico puede ser esporádico, sin asociación con un genotipo mutante. En otra realización, el trastorno neurológico puede ser debido a una agregación aumentada de sustratos de enzimas de lisosomas u otras proteínas o fragmentos de las mismas, en las células del CNS o PNS en pacientes que no son deficientes en hidrolasas lisosomales, es decir, no tienen una mutación en un gen que codifica una hidrolasa lisosomal que da lugar a una actividad enzimática reducida. Aunque estos pacientes pueden tener una mutación en una enzima no lisosomal, por ejemplo,  $\alpha$ -syn, que favorece la agregación. En otra realización limitativa, el trastorno neurológico puede tener una base genética que no está dirigida por uno cualquiera o una combinación de los acompañantes usados. Por ejemplo, un paciente puede tener un genotipo que consiste en una mutación no homocigótica para una enzima lisosomal en la que no se produce ninguna proteína funcional. En este caso, el aumento de la actividad de otras enzimas lisosomales no mutadas según el método del la presente invención puede compensar la deficiente enzima lisosomal.

50 Un “respondedor” es un individuo que ha sido diagnosticado con un trastorno neurológico asociado con agregados de proteínas y lípidos en células del sistema nervioso celular y ha sido tratado según el método actualmente reivindicado que exhibe una mejora, alivio o prevención de uno o más síntomas clínico o una mejora o inversión de uno o más marcadores clínicos sucedáneos. En una realización específica, los cambios en los niveles de  $\alpha$ -sinucleína en plasma, que incluyen los aumentos y disminuciones en comparación con testigos normales, son un marcador sucedáneo para un respuesta positiva a una terapia de acompañante farmacológico para GCasa.

55 Las expresiones “dosis terapéuticamente eficaz” y “cantidad eficaz” se refieren a la cantidad del acompañante farmacológico específico que es suficiente para dar lugar a una respuesta terapéutica. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un facultativo (por ejemplo, clínico )reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, que incluye los síntomas y marcadores clínicos sucedáneos. Por tanto, una respuesta terapéutica será generalmente una mejora de 1 o ,ás síntomas de una enfermedad o trastorno, como los descritos con anterioridad.

60 La expresión “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente reacciones indebidas cuando son administradas a un ser humano. Preferentemente, como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o que está citado en la farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente en seres humanos. El término vehículo se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo en el que se administra el compuesto. Estos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos esterilizados como agua y

aceites. El agua o soluciones acuosas o soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol son preferentemente empleados como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en la publicación "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, 18th Edition.

5 Los términos "alrededor" y "aproximadamente" significan generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida, considerando la naturaleza o precisión de las mediciones. Ejemplos de grados típicos de error están dentro de un 20 por ciento (%), preferentemente dentro de 10% y más preferentemente dentro de 5% de un valor o intervalo de valores. Alternativamente, y en particular en sistemas biológicos, los términos "alrededor" y  
10 "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden o magnitud, preferentemente 5 veces y, más preferentemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas proporcionadas en la presente memoria descriptiva son aproximadas salvo que se indique otra cosa, lo que significa que los términos "alrededor" o "aproximadamente" pueden estar implícitos cuando no se establezca otra cosa.

## 15 Químicas

El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado de C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> lineal o ramificado que consiste solamente en átomos de carbono e hidrógeno que no contiene ninguna insaturación y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo, n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo). Los alquilos usados en la presente memoria descriptiva son preferentemente alquilos de C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.

El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático de C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> que contiene al menos un enlace doble carbono-carbono y que puede ser e cadena lineal o ramificada, por ejemplo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), iso-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo.

25 El término "alquino" se refiere a una cadena hidrocarbonada monovalente sin ramificar o ramificada que tiene uno o más enlaces triples en la misma. El enlace triple de un grupo alquino puede estar sin conjugar o conjugado a otro grupo insaturado. Los grupos alquenos adecuados incluyen, pero sin limitación grupos alquenos (C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>) como etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, metilpropinilo, 4-metil-1-butinilo, 4-propil-2-pentinilo y 4-butil-2-hexinilo.  
30 Un grupo alquino puede estar sin sustituir o sustituido con uno o dos sustituyentes adecuados.

El término "cicloalquilo" indica un sistema de anillos hidrocarbonados insaturado, no aromático, mono- o multi-cíclico como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo o ciclohexilo. Ejemplos de grupos cicloalquilos multicíclicos incluye grupos perhidronaftilo, adamantilo o norbornilo, grupos cíclicos puenteados o grupos espirocíclicos, por ejemplo, espiro-  
35 4,4-non-2-hilo.

El término "cicloalquilalquilo" se refiere a un cicloalquilo como se definió anteriormente unido directamente a un grupo alquilo como se definió anteriormente que da lugar a la creación a una estructura estable como ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo o ciclopentilmetilo.

40 El término "alquilo-éter" se refiere a un grupo alquilo o grupocicloalquilo como se definió anteriormente que tiene al menos un oxígeno incorporado en la cadena de alquilo, por ejemplo, metil-etil-éter, dietil-éter o tetrahidrofurano.

45 El término "alquilamina" se refiere a un grupo alquilo o un grupo cicloalquilo como se definió anteriormente que tiene al menos un átomo de nitrógeno, por ejemplo, n-butilamina y tetrahidrooxacina.

El término "arilo" se refiere a radicales aromáticos que tienen en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbón como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo o bifenilo.

50 El término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo como se definió anteriormente directamente unido a un grupo alquilo como se definió anteriormente, por ejemplo, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> y -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

55 El término "heterocíclico" se refiere a un radical de un anillo estable de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. Para los fines de esta invención, el radical de anillo heterocíclico puede ser un sistema de anillos monocíclico, bicíclico o tricíclico que puede incluir sistemas de anillos condensados, puenteados o espiros y los átomos de nitrógeno, fósforo, carbono, oxígeno o azufre en el radical de anillo heterocíclico pueden estar opcionalmente oxidados hasta diversos estados de oxidación. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado y el radical de anillos puede estar parcial o completamente saturado (es decir, heteroaromático o heteroaril-aromático). Ejemplos de estos radicales de anillos heterocíclicos incluyen, pero sin limitación azetidino, acridinilo, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofurilo, carbazolilo, cinnolinilo, dioxolanilo, indolizino, naftiridinilo, perhidroazepinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, piridilo, pteridinilo, purinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazoilo, imidazolilo, tetrahidroisouinolilo, piperidinilo, piperazinilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoazepinilo, azepinilo, pirrolilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, oxazolilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, triazolilo, indanilo, isoxazolilo, isoxasolidinilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, quinuclidinilo, isotiazolidinilo, indolilo,  
60  
65

isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, decahidroisoquinolilo, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopirano, benzotiazolilo, benzooxazolilo, furilo, tetrahidrofurilo, tetrahidropirano, tienilo, benzotienilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinilo, sulfóxido, tiamorfolinilo, sulfona, dioxafosfolano, oxadiazolilo, cromo, isocromo.

5 El radical de anillo heterocíclico puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé lugar a la creación de una estructura estable.

El término, "heteroarilo" se refiere a un anillo heterocíclico en el que el anillo es aromático.

10 El término "heteroarilalquilo" se refiere a un radical de anillo heteroarilo como se definió anteriormente directamente unido a un grupo alquilo. El radical heteroarilalquilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier átomo de carbono del grupo alquilo que dé lugar a la creación de una estructura estable.

15 El término "heterociclilo" se refiere a un radical de anillo heterocíclico como se definió anteriormente. El radical de anillo heterociclilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé lugar a la creación de una estructura estable.

20 El término "heterocicilalquilo" se refiere a un radical de anillos heterocíclico como se definió anteriormente directamente unido a un grupo alquilo. El radical heterocicilalquilo puede estar unido a la estructura principal en un átomo de carbono en el grupo alquilo que dé lugar a la creación de una estructura estable.

25 Los sustituyentes en el "alquilo sustituido", "alqueno sustituido", "alquino sustituido", "cicloalquilo sustituido", "cicloalqueno sustituido", "arilalquil sustituido", "arilo sustituido", "anillo heterocíclico sustituido", "anillo heteroarilo sustituido", "heteroarilalquilo sustituido" o "anillo de heterocicilalquilo sustituido" pueden ser iguales o diferentes con uno o más seleccionados entre los grupos hidrógeno, hidroxilo, halógeno, carboxilo, ciano, amino, nitro, oxo (=O), tio(=S) o grupos opcionalmente sustituidos seleccionados entre alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, anillo heterocíclico, -COOR<sup>x</sup>, -C(O)R<sup>x</sup>, -C(S)R<sup>x</sup>, -C(O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -C(O)ONR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>CONR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -N(R<sup>x</sup>)SOR<sup>y</sup>, -N(R<sup>x</sup>)SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -(=N-N(R<sup>x</sup>)R<sup>y</sup>), -NR<sup>x</sup>C(O)OR<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(S)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(S)NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -SONR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -OR<sup>x</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -OR<sup>x</sup>C(O)OR<sup>y</sup>, -OC(O)R<sup>x</sup>, -OC(O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -R<sup>x</sup>NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>R<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>CF<sub>3</sub>, -R<sup>x</sup>NR<sup>y</sup>C(O)R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>OR<sup>y</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)OR<sup>y</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)R<sup>x</sup>, -R<sup>x</sup>OC(O)R<sup>y</sup>, -SR<sup>x</sup>, -SOR<sup>x</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>x</sup>, -ONO<sub>2</sub>, en los que R<sup>x</sup>, R<sup>y</sup> y R<sup>z</sup>, en cada uno de los grupos anteriores pueden ser un átomo de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo, arilalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalqueno sustituido o sin sustituir o un anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir o heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.

El término "halógeno" se refiere a radicales de flúor, cloro, bromo y yodo.

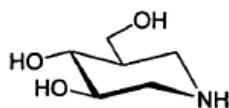
40 La expresión "un conector flexible corto" se refiere a conectores con una longitud lineal de aproximadamente 6 Å a aproximadamente 12 Å, preferentemente de aproximadamente 9 Å. Un conector flexible corto comprende moléculas unidas unas a otras, por ejemplo, pero sin limitación carbono unido a carbono y carbono unido a un heteroátomo como nitrógeno, oxígeno o azufre en que las moléculas unidas conjuntamente pueden rotar alrededor del eje del enlace. En una realización particular, el conector flexible puede adoptar conformaciones y orientaciones diferentes que pueden alterar la distancia entre los dominios moleculares conectados por el conector flexible corto.

#### Terapia de acompañamiento para trastornos neurodegenerativos

50 En una serie de realizaciones, los acompañantes farmacológicos de moléculas pequeñas aumentan la estabilidad de una GCasa no mutante en el ER, aumentan el tránsito al lisosoma y aumentan la semi-vida de la enzima estabilizando la proteína en el lisosoma. Esta estrategia puede dar lugar a un aumento de la actividad enzimática o función enzimática en el lisosoma y, por tanto, una actividad lisosomal aumentada. El metabolismo de lípidos como el metabolismo de GlcCer puede ser por tanto modulado aumentando la actividad de GCasa, conduciendo a un nivel reducido de GlcCer en la célula si se compara con una célula que no está en contacto con el acompañante. Como se expuso anteriormente, esta estrategia se espera que disminuya la cantidad de  $\alpha$ -syn y/o que mejore la acumulación patológica de GlcCer o cualquier desequilibrio de lípidos de ruptura que incluya GlcCer en células particularmente neuronas.

60 *Acompañantes para GCasa.* Hay numerosos compuestos que pueden ser usados, solos o en combinación, como acompañantes farmacológicos para aumentar la actividad lisosomal aumentando la actividad de GCasa. Como se expuso anteriormente, los inhibidores competitivos para GCasa previamente han mostrado que aumentan la actividad de GCasa. Consecuentemente, está anticipada que estos y otros inhibidores de GCasa pueden ser útiles para disminuir la cantidad de  $\alpha$ -syn, posiblemente aumentando la actividad de GCasa en el lisosoma, aunque son posibles otros mecanismos.

Isfagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidinediol) se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura:



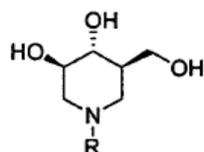
5

El tartrato de isfagomina ha sido recientemente descrito en la solicitud de patente de EE.UU. comúnmente poseída número de serie 11/752.658, presentada el 23 de mayo de 2007 y tiene asignado el número CAS 919364-56-0. La isfagomina ha sido preparada también en la forma de otras sales por adición de ácidos con una diversidad de ácidos orgánicos e inorgánicos. Estas sales incluyen las formadas con cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido metanosulfónico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido bencenosulfónico, ácido toluenosulfónico y otros diversos (por ejemplo, nitrato, fosfato, boratos, citratos, benzoatos, ascorbatos, salicilatos y similares). Estas sales se pueden formar como es conocido por los expertos en la técnica.

10

También se divulgan en la presente memoria descriptiva derivados de N-alquilo de isfagomina. Estos compuestos se describen en las patentes de EE.UU. 6.046.214 de Kristiansen et al. y 5.844.102 de Sierks et al. Un derivado de isfagomina tiene la siguiente fórmula I:

15



20 en la cual:

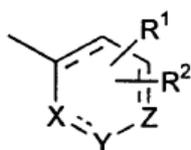
R es haloalquilo C<sub>1-7</sub>, alquilo C<sub>1-10</sub>, alqueniil-alquilo C<sub>3-7</sub>, alcoxi-alquilo C<sub>2-7</sub>, carbamoil-alquilo C<sub>1-7</sub> o X-Ar<sup>1</sup>;

X es -(CH)<sub>n</sub>- o alqueniileno C<sub>2-3</sub>;

25

n es un número entero de 0-3;

Ar<sup>1</sup> es

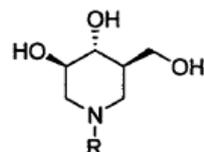


30

en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, amino, nitro, heteroarilo, arilo o ciano; X y Z son independientemente C, N, S o S cuando Y es C, N O o S; o X y Z son independientemente C, N-R<sup>3</sup>, o OS cuando Y es un enlace sencillo que conecta X y Z en que R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub> o hidrógeno o sus sales farmacéuticamente aceptables.

35

Un derivado de isfagomina tiene la siguiente fórmula la:



40

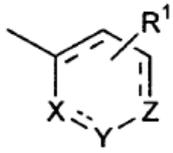
en la cual:

R es alquilo C<sub>1-10</sub>, alqueniil-alquilo C<sub>3-7</sub> alcoxi-alquilo C<sub>2-7</sub> o X-Ar;

45 X es -(CH)<sub>n</sub>- o alqueniileno C<sub>2-3</sub>;

n es un número entero de 0-3;

Ar es



5 en la que X y Z son C, N, O o S; Y es C, N, O, S o un enlace sencillo que conecta X y Z; R<sub>1</sub> es un hidrógeno, halo, alquilo C<sub>1-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, amino, nitro, arilo o ciano, o sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 Derivados específicos de N-alquilo incluyen N-dodecil-isofagomina y los proporcionados en la tabla 1 siguiente:

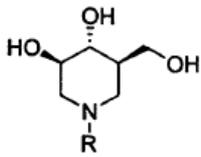
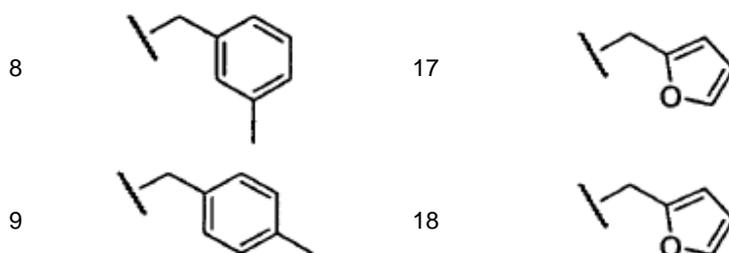


Tabla 1

Compuesto	R	Compuesto	R	Compuesto	R
1		10		19	
2		11		20	
3		12		21	
4		13		22	
5		14		23	
6		15		24	
7		16		25	



Los compuestos son denominados como sigue: (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-propilpiperidino-3,4-diol (1); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-pentilpiperidino-3,4-diol (2); (3R,4R,5R)-1-heptil-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (3); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(3-metilbut-2-enil)piperidino-3,4-diol (4); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(2-metoxietil)piperidino-3,4-diol (5); (3R,4R,5R)-1-bencil-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (6); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(2-metilbencil)piperidino-3,4-diol (7); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(3-metilbencil)piperidino-3,4-diol (8); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-metilbencil)piperidino-3,4-diol (9); (3R,4R,5R)-1-(4-fluorobencil)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (10); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-metoxibencil)piperidino-3,4-diol (11); (3R,4R,5R)-1-(4-aminobencil)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (12); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(2-feniletíl)piperidino-3,4-diol (13); (3R,4R,5R)-1-(bifenil-4-ilmetil)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (14); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-((tetrahidro-2H-piran-4-il)metil)piperidino-3,4-diol (15); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(piperidin-4-ilmetil)piperidino-3,4-diol (16); (3R,4R,5R)-1-(furan-2-ilmetil)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (17); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(tiofen-2-ilmetil)piperidino-3,4-diol (18); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(piridin-4-ilmetil)piperidino-3,4-diol (19); (3R,4R,5R)-1-ciclohexil-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (20); (3R,4R,5R)-1-(ciclohexilmetil)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (21); (3R,4R,5R)-1-(2-ciclohexiletíl)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (22); (3R,4R,5R)-1-(ciclopentilmetil)-5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol (23); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-metilpentil)piperidino-3,4-diol (24); y (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-nitrobencil)piperidino-3,4-diol (25).

Datos de inhibición adicionales para estos compuestos respecto a GCasa y/o algunos datos de mejora celular para GCasa se proporcionan en la tabla 2 siguiente:

Tabla 2

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) (n = 3)	Ki (μM) (n = 3)	EC <sub>50</sub> (μM) (n = 3)
1	35,81 ± 6,69	14,84 ± 2,77	65,9 ± 15,6
2	979,9 ± 137	406,06 ± 56,34	266,1 ± 47,7
3	41,70 ± 3,05	17,28 ± 1,26	9,99 ± 2,56
4	4,00 ± 0,035	1,66 ± 0,015	63,0 ± 14,1
5	5,99 ± 0,11	2,48 ± 0,05	60,7 ± 0,11
6	200,27 ± 61,78	82,99 ± 25,6	115,3 ± 18,5
7	69,47 ± 8,18	28,79 ± 3,39	46,4 ± 8,7
8	12,7 ± 2,14	5,26 ± 0,89	11,6 ± 2,4
9	129,63 ± 14,71	53,72 ± 6,10	144,8 ± 2,9
10	269,80 ± 39,21	111,8 ± 16,25	70,6 ± 2,1
11	nh	nh	nh
12	9,36 ± 1,16	3,88 ± 0,48	7,7 ± 1,5
13	7,5 ± 0,82	3,11 ± 0,34	2,2 ± 0,1
14	nh	nh	nh
15	49,22 ± 5,5	20,39 ± 2,28	68,3 ± 5,7
16	1,07 ± 0,02	0,44 ± 0,01	6,9 ± 1,5
17	280,07 ± 62,55	116,39 ± 25,92	65,6 ± 15,7
18	27,55 ± 0,49	11,42 ± 0,2	139,0 ± 27,8
19	19,35 ± 1,24	8,02 ± 0,51	35,0 ± 3,6

20	nh	nh	nh
21	nh	nh	nh
22	nh	nh	nh
23	15,63 ± 2,2	6,48 ± .091	18,8 ± 2,8
24	2,13 ± 0,17	0,88 ± 0,07	30,5 ± 4,8
25	44,96 ± 3,99	18,63 ± 1,65	16,4 ± 2,2

nh = no hecho

Los métodos para sintetizar isofagomina y algunos derivados son bien conocidos en la técnica y se describen en las siguientes publicaciones: Jespersen et al., *Angew. Chem., Int. ed. Engl.* 1994; 33: 1778-9; Dong et al., *Biochem.* 1996; 35:2788; Lundgren et al., *Diabetes.* 1996; 45:S2 521; Schuster et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9(4):615-8; Andersch et al., *Chem. Eur. J.* 2001; 7: 3744-3747; Jakobsen et al., *Bioorg Med Chem.* 2001; 9: 733-44; 36:435; Pandey et al., *Synthesis.* 2001 : 1263-1267; Zhou et al., *Org Lett.* 2001;3(2):201-3; Best et al., *Can. J. Chem./Rev. Can. CHm.* 2002; 80(8): 857-865; Huizhen et al., *J. Carbohydr Chem.* 2004;23: 223-238; Mehta et al., *Tetrahedron Letters* 2005; 41(30):5747-5751; Ouchi et al., *J Org Chem.* 2005;70(13):5207-14; and most recently, Meloncelli et al., *Australian Journal of Chemistry.* 2006; 59(11) 827-833. La síntesis del estereoisómero L se describe por Panfil et al., *J. Carbohydr Chem.* 2006; 25: 673-84.

Específicamente, los derivados de N-alkil-isofagomina anteriormente descritos se pueden preparar mediante vías conocidas en la técnica para alquilar aminas secundarias, como mediante desplazamiento de un mesilato (a partir de los correspondientes alcoholes disponibles en el comercio) o mediante aminación reductora. Se describe seguidamente una breve descripción de estos métodos.

#### Método general para la alquilación

Después de que 1 equivalente del alcohol y 1,5 equivalentes de trietilamina se disuelven en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se añade gota a gota cloruro de metanosulfonilo (1,2 equivalentes) a la mezcla de reacción a 0°C. La mezcla de reacción se agita a TA (temperatura ambiente) durante 2 horas y seguidamente se vierte en agua y se extrae con CH<sub>2</sub> Cl<sub>2</sub>. El disolvente se separa para proporcionar el producto que se usó directamente en la siguiente etapa. Se ponen en suspensión en DMF 3 equivalentes de producto en bruto de la etapa previa y 1 equivalente de 5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 equivalentes) y la mezcla se agita y se calienta a 70°C durante 3 días. La mezcla de reacción se filtra y el disolvente se separa para proporcionar un producto en bruto. El producto en bruto y gel en sílice se pone en suspensión en solución de MeOH.HCl y se agita a TA durante 30 minutos. El disolvente se separa para proporcionar un sólido, que se introduce como relleno en la parte superior de una columna de gel de sílice. El compuesto final se eluye con acetato de etilo/MeOH/amoníaco acuoso (9/1/0,2).

#### Método general para la aminación reductora

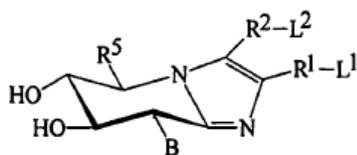
Se ponen en suspensión en metanol 3 equivalentes de aldeído o cetona y 1 equivalente de 5-(hidroximetil)piperidino-3,4-diol, seguidamente se añade Na(Cn)BH<sub>3</sub> (6 eq.). La mezcla de reacción se agita a TA durante 3 días. La mezcla de reacción se filtra y el disolvente se separa para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto y gel de sílice se ponen en suspensión en una solución de MeOH.HCl y se agita a TA durante 30 minutos. El disolvente se separa para proporcionar un sólido que se introduce como relleno en la parte superior de una columna de gel de sílice. El compuesto final se eluyó por medio de acetato de etilo/MeOH/amoníaco acuoso (9/1/0,2).

#### Método general para la nitro-reducción

Se agitan 5-(hidroximetil)-1-(4-nitrobencil)piperidino-3,4-diol y zinc (10 eq.) en una solución de MeOH.Cl a TA durante 1 hora. El disolvente se separa para proporcionar un producto en bruto, que se purifica mediante columna de gel de sílice.

Como estos compuestos se unen específicamente para aumentar la GCasa pueden ser usados también para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y otros trastornos neurológicos asociados con mutaciones en GCasa.

Otros acompañantes para GCasa incluyen glucoimidazol, polihidroxicloalquilaminas y derivados y derivados de hidroxipiperidina que se describen en las solicitudes publicadas de EE.UU. en trámite 2005/0130972 y 2005/0137223 y las correspondientes solicitudes PCT WO 2005/046611 y WO 2005/046612, presentadas todas el 12 de noviembre de 2004 y glucoimidazol y sus derivados representados por la siguiente fórmula II:



en la que B se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, acetamido y halógeno;

- 5 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, opcionalmente presentes, son conectores cortos y flexibles con una longitud lineal de aproximadamente 6 Å a aproximadamente 12 Å, preferentemente de aproximadamente 9 Å. R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se pueden seleccionar también independientemente entre el grupo que consiste en alquilo sustituido y sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>n</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>; alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>n</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>; alquinilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>n</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>, en que m es 1 ó 2 y R<sup>3</sup> se selecciona independientemente en cada aparición entre los grupos que consisten en hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, un grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterociclalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.
- 10
- 15
- 20 Además, R<sup>1</sup>-L<sup>1</sup> y/o R<sup>2</sup>-L<sup>2</sup> pueden ser hidrógeno.

R<sup>5</sup> representa un hidrógeno hidroxilo o hidroximetilo.

- 25 L<sup>1</sup> y L<sup>2</sup> son grupos lipófilos seleccionados entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, alquilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, un grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.

- 30 En realizaciones específicas, los compuestos GIZ incluyen GIZ, (5R, 6R, 7S, 8S)-5-hidroximetil-2-octil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridino-6,7,8-triol y (5R, 6R, 7S, 8S)-5-hidroximetil-2-(3,3-dimetilbutil)-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridino-6,7,8-triol.

La síntesis de los que anteceden se puede conseguir como sigue:

- 35 a. (5R, 6R, 7S, 8S)-5-Hidroximetil-2-n-octil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridino-6,7,8-triol (IC<sub>50</sub> for GCase = ~ 0,07 nM)

- 40 Una solución de (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-Tris(benciloxi)-5-[(benciloxi)metil]-2-(l-octinil)-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridina (120 mg, 0,179 mmol) en THF/EtOH (2:1) (3 ml) se agita rápidamente con Pd(OH)<sub>2</sub>/C (0,1 g) bajo una atmósfera de hidrógeno durante 14 h. Después de la filtración del catalizador, la solución orgánica se concentra en un evaporador rotatorio y el residuo se disuelve en CH<sub>2</sub>Cl (10 ml). La solución se enfría en un baño de acetona-hielo seco y se añade lentamente una solución de BCl<sub>3</sub> (1,0 M) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se calienta a temperatura ambiente y se agita durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfría en un baño de hielo-agua y se añade agua durante 0,5 horas. La mayor parte del disolvente se separa usando un evaporador rotatorio y el producto en bruto se purifica mediante cromatografía (CHCl<sub>3</sub>/ MeOH/H<sub>2</sub>O 64:25:4). Una liofilización en agua proporciona el compuesto del título en forma de una espuma blanca. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 57,22 (s, 1H), 4,56 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,20-4,16 (m, 1H), 3,98-3,93 (m, 2H), 3,83 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 3,70 (dd, 1H, J = 8,8 Hz y 10 Hz), 2,60 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 1,67-1,63 (m, 2H), 1,35-1,30 (m, 10H), 0,90 (t, 3H, J = 6,8 Hz). MS (ES+): 313 [M+1].

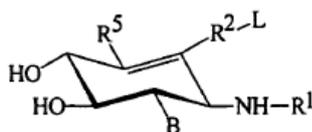
- 50 b. (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-Tris(benciloxi)-5-[(benciloxi)metil]-2-(3,3-dimetilbut-1-inil)-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridina (IC<sub>50</sub> for GCase = ~ 1,1 nM)

- 55 De una manera similar a la descrita en el apartado a, se convierte (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-tris(benciloxi)-5-[(benciloxi)metil]-2-yodo-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridina en el compuesto del título. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 57,41-7,14 (m, 20H), 7,13 (s, 1H), 5,10 (d, 1H, J = 11,4 Hz), 4,81-4,66 (m, 3H), 4,62 (d, 1H, J = 11,4 Hz), 4,49-4,42 (m, 3H), 4,18-4,13 (m, 1H), 4,11-4,06 (m, 2H), 3,84-3,77 (m, 2H), 3,71 (dd, 1H, J = 4,8 Hz y 10,5 Hz), 1,31 (s, 9H). MS (ES+): 641 [M+1].

- 60 c. (5R, 6R, 7S, 8S)-5-Hidroximetil-2-(3,3-dimetilbutil)-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridino-6,7,8-triol (IC<sub>50</sub> para GCase = ~ 0,03 nM)

De una manera similar a la descrita en el apartado (b), se convierte (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-tris(benciloxi)-5-[(benciloxi)metil]-2-(3,3-dimetilbut-1-inil)-5,6,7,8-tetrahidro-imidazo[1,2-a]piridina en el compuesto del título. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 56,97 (s, 1H), 4,41 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,09 (dd, 1H, J = 2,4 Hz y 12 Hz), 3,86 (dd, 1H, J = 4,0 Hz y 12 Hz), 3,79-3,71 (m, 2H), 3,61 (dd, 1H, J = 8,4 Hz y 9,2 Hz), 2,48-2,44 (m, 2H), 1,50-1,47 (m, 2H), 0,89 (s, 9H). MS (ES<sup>+</sup>): 285 [M+1].

Los derivados de polihidroxisicloalquilaminas (PHCA) previstos para ser usados en la presente invención influyen compuestos representados por la siguiente fórmula III:



en la que B se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, L-acetamino y halógeno.

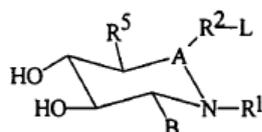
R<sup>1</sup> se selecciona independientemente en cada aparición entre el grupo que consiste en hidrógeno; alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, un grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, -C(O)R<sup>3</sup> y -S(O)<sub>m</sub>R<sup>3</sup>, en que m es 1 ó 2 y R<sup>3</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre los grupos que consisten en hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, un grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir y -C(O) unido a un alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

R<sup>2</sup> opcionalmente presente es un conector flexible corto con una longitud lineal de aproximadamente 6 Å a aproximadamente 12 Å, preferentemente de aproximadamente 9 Å. R<sup>2</sup> se puede seleccionar también entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>m</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>; alquenilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>m</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>; alquinilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>m</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>; en que m es 1 ó 2 y R<sup>3</sup> se selecciona independientemente para cada aparición entre los grupos que consisten en hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, un grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir y -C(O) unido a un alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y sus sales y profármacos farmacéuticamente aceptables.

L es un grupo lipófilo seleccionado entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquenilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, arilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir, un grupo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir o heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.

Estos compuestos se pueden preparar según los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. publicada 2005/130972.

Los derivados de hidroxipiperidina previstos para ser usados en la presente invención en los que Gba están representados por la siguiente fórmula IV:



en la que A representa un carbono o nitrógeno;

B es un hidrógeno, hidroxilo, N-acetamida o halógeno;

R<sup>1</sup> es un hidrógeno, un grupo sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquenilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, un grupo heterocíclico, heterociclilalquilo o heteroarilalquilo, -C(O)R<sup>3</sup> o -S(O)<sub>m</sub>R<sup>3</sup>. Preferentemente, R<sup>1</sup> comprende H o un resto orgánico que tiene 1-12 átomos de carbono;

R<sup>2</sup> es un conector flexible corto opcional con una longitud lineal de aproximadamente 6 Å a aproximadamente 12 Å. Alternativamente, R<sup>2</sup> es un grupo sustituido o sin sustituir de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>: alquilo, alquenilo, alqueniulo opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR<sup>3</sup>, O, S, S(O)<sub>m</sub> y -S(O)<sub>m</sub>NR<sup>3</sup>;

R<sup>3</sup> es hidrógeno, un grupo sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, un grupo heterocíclico, heterociclilalquilo o heteroarilalquilo. Preferentemente, R<sup>3</sup> comprende H o un resto orgánico que tiene 1-12 átomos de carbono o, más preferentemente, 1-6 átomos de carbono;

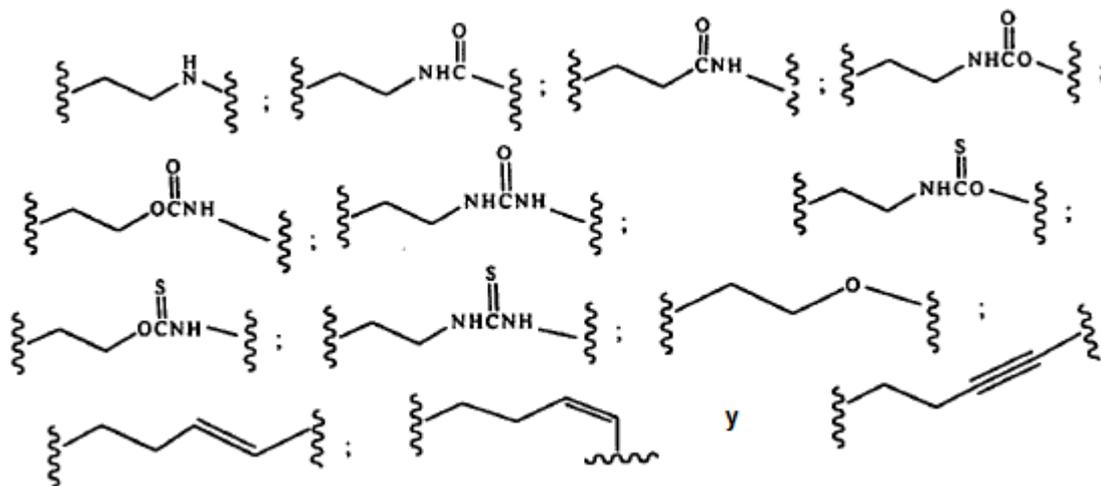
m es 1 ó 2; y

R<sup>5</sup> es hidrógeno, hidroxilo o hidroximetilo.

L es un hidrógeno, un grupo lipófilo que tiene 1-12 átomos de carbono que comprende un grupo sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, un grupo heterocíclico, heterocicloalquilo o heteroarilalquilo.

En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NR<sup>3</sup> y O; alquenilo sustituido o sin sustituir opcionalmente interrumpido con uno o más restos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NR<sup>3</sup> y O; alquenilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más heteroátomos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NR<sup>3</sup> y O; alquenilo sustituido o sin sustituir de C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente interrumpido con uno o más heteroátomos escogidos entre el grupo que consiste en NH, NR<sup>3</sup> y O.

En otras realizaciones, R<sup>2</sup> se escoge entre el grupo que consiste en



En otras realizaciones, R<sup>2</sup> no está presente y L es hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sin sustituir, o alquilo C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub> sin sustituir, como un alquilo C<sub>6</sub> sin sustituir, alquilo C<sub>7</sub> sin sustituir, alquilo C<sub>8</sub> sin sustituir, alquilo C<sub>9</sub> o bencilo.

En realizaciones específicas, los compuestos de hidroxil-piperidina previstos para ser usados en la invención son (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-dihidroxipiperidina y (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina.

En otras realizaciones específicas, los compuestos de hidroxil-piperidina previstos para ser usados en la presente invención incluyen, pero sin limitación los siguientes: (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-butil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-bencil-3,4-dihidroxipiperidina.

Todavía otros ejemplos de acompañantes para GCasa se describen en la patente de EE.UU. 6.599.919 de Fan et al.

y que incluyen calistegina A<sub>3</sub>, calistegina A<sub>5</sub>, calistegina B<sub>1</sub>, calistegina B<sub>2</sub>, calistegina B<sub>3</sub>, calistegina B<sub>4</sub>, aclostegina C<sub>1</sub>, N-metilcalistegina B<sub>2</sub>, DMDP, DAB, castanospermina, 1-desoxinogirimicina, N-butil-desoxinogirimicina, 1-desoxinogidimicina-bisulfito, N-butil-isofagomina, N-(3-ciclohexilpropil)-isofagomina, N-(3-fenilpropil)-isofagomina y N-((2Z,6Z)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10trienil)-isofagomina.

5 Los compuestos de la presente invención incluyen sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de las estructuras anteriores. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales derivadas de bases inorgánicas como Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn; sales de bases orgánicas como N,N'-diacetiletlenodiamina, glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, dicicloexilamina, metformina, bencilamina, trialquilamina; bases quirales como  
10 alquilfenilamina, glicinol, fenil-glicinol, sales de aminoácidos naturales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirocina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxil-prolina, histidina, omítina, lisina, arginina, cerina; aminoácidos no naturales como D-isómeros o aminoácidos sustituidos; guanidina, guanidina sustituida en la que los sustituyentes se seleccionan entre nitro, amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, amonio o sales de amonio sustituido y sales de aluminio. Las sales pueden incluir sales por adición de ácidos de las que son apropiadas los  
15 sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidroháluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencenosulfonatos, ascorbato, glicerofosfatos o cetoglutaratos. Los solvatos farmacéuticamente aceptables pueden ser hidratos o comprender otros disolventes de cristalización como alcoholes.

20 Los profármacos son compuestos que se convierten in vivo en formas activas (véase, por ejemplo, R. B. Silverman, 1992, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", Academic Press, Chp. 8). Los profármacos pueden ser usados para alterar la biodistribución (por ejemplo, para permitir compuestos que no entrarían normalmente en el sitio reactivo de la proteasa o las características farmacocinéticas para un compuesto particular. Por ejemplo, un grupo ácido carboxílico puede ser esterificado, por ejemplo, con un grupo metilo y un grupo etilo para producir un  
25 éster. Cuando el éster es administrado a un sujeto, el éster es escindido, por vía enzimática o no enzimática, reductoramente, oxidativamente o hidrolíticamente para poner de manifiesto el grupo aniónico. Un grupo aniónico puede ser esterificado con restos (por ejemplo, ésteres aciloximetílicos) que se escinden para poner de manifiesto un compuesto intermedio que posteriormente se descompone para producir el compuesto activo.

30 Ejemplos de profármacos y sus usos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J Pharm. Sci. 66:1-19). Los profármacos pueden ser preparados in situ durante el aislamiento y purificación final de los compuestos, o separadamente haciendo reaccionar el compuesto purificado con un agente de derivación adecuado. Por ejemplo, los grupos hidroxilo pueden ser convertidos en ésteres mediante  
35 tratamiento con un ácido carboxílico en presencia de un catalizador. Ejemplos de restos de profármacos de alcoholes escindibles incluyen restos ésteres alquílicos inferiores ramificados o sin ramificar, sustituido o sin sustituir, (por ejemplo ésteres etílicos), ésteres alquenílicos inferiores, ésteres di-alquilo inferior-amino-alquilo inferior, por ejemplo, éster dimetilaminoetílico), ésteres acilamino-alquilo inferior, ésteres aciloxi-alquílicos inferiores (por ejemplo, éster pivaloinoximetílico), ésteres arílicos (éster fenílico), ésteres arilo-alquílicos inferiores (por ejemplo, éster bencílico), ésteres arílicos y aril-alquílicos inferiores (por ejemplo, con sustituyentes metilo, halo, o metoxi), amidas, alquilamidas inferiores, dialquilamidas inferiores y hidroxil-amidas.

#### Formulación, dosificación y administración de acompañantes farmacológicos específicos

45 La presente invención proporciona que el acompañante farmacológico específico se administre en una forma de dosificación que permita una administración sintética, ya que los compuestos no es necesario que atraviesen la barrera sanguínea del cerebro para ejercer efectos sobre células neuronales. En una realización, el acompañante farmacológico específico es administrado en forma de monoterapia, preferentemente en una forma de dosificación oral (descrita adicionalmente con posterioridad), aunque están previstas otras formas de dosificación. La  
50 administración oral incluye un administración diaria dividida en dosis o formulaciones de liberación controlada o mediante una administración menos frecuente de formas de dosificación de liberación inmediata o sostenida. Las formulaciones, dosificación y vías de administración para el acompañante farmacológico específico se detallan a continuación.

#### Formulaciones

55 El acompañante farmacológico específico puede ser administrado en una forma adecuada para cualquier vía de administración que incluye, por ejemplo, vía oral en forma de comprimidos o capsulas o un líquido, o en solución acuosa esterilizada para inyección. Cuando el acompañante farmacológico específico es formulado para una administración oral, los comprimidos o cápsulas pueden ser preparados mediante medios convencionales con  
60 excipientes farmacéuticamente aceptables como agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropil-metilcelulosa; materiales de carga (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno-fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón- glicolato de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril-sulfato de sodio). Los comprimidos pueden ser revestidos mediante métodos conocidos en la técnica. Las preparaciones  
65 líquidas para una administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones o pueden ser presentadas como un producto seco para ser constituido con agua u otro vehículo adecuado antes de su

5 uso. Estas preparaciones líquidas pueden ser preparadas con medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, como agentes suspensores (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo aceite de almendras, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados) y conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones pueden contener también sales tamponantes, sabores, colorantes y agentes edulcorantes en la medida apropiadas. Las preparaciones para una administración oral pueden ser adecuadamente formuladas para proporcionar una liberación controlada o sostenida del acompañante farmacológico específico.

10 Las formulaciones farmacéuticas del acompañante farmacológico específico para un uso parenteral/inyectable incluyen generalmente soluciones acuosas esterilizadas (cuando sean solubles en agua) o dispersiones y polvos esterilizados para preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables esterilizadas. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el alcance en que exista un fácil manejo con jeringuilla. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser conservada contra la acción  
15 contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol, (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede ser mantenida, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de  
20 microorganismos se puede llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será razonable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

25 Se preparan soluciones inyectables esterilizadas incorporando el acompañante farmacológico específico en la cantidad deseada en el disolvente apropiado con otros diversos ingredientes anteriormente citados, en la medida necesaria seguido de un filtro o esterilización terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo esterilizado que contenga el medio de dispersión básico y  
30 los otros ingredientes necesarios entre los anteriormente citados. En el caso de polvos esterilizados para la preparación de soluciones inyectables esterilizables, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y la técnica de liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de la solución previamente filtrada estéril del mismo.

35 La formulación puede contener un excipiente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden ser incluidos en la formulación son tampones como tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas como albúmina de suero, colágeno y gelatina; sales como EDTA o EGTA y cloruro de sodio; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000 o PEG-6000); glicerol,  
40 glicina u otros aminoácidos y lípidos. Los sistemas tamponantes para ser usados con las formulaciones incluyen tampones de citrato, acetato, bicarbonato y fosfato. El tampón de fosfato es una realización preferida.

45 La formulación puede contener también un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114 Nonidet P-40 octil- $\alpha$ -glucósido, octil-  $\beta$ -glucósido, Birj 35, Pluronic y Tween 20.

#### Administración

50 La vía de administración del acompañante farmacológico específico puede ser oral (preferentemente) o parenteral, que incluye intravenosa, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, vucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradermal, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosal, transdermal o a través de inhalación.

55 La administración de las formulaciones parenterales anteriormente descritas del acompañante farmacológico específico puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la preparación o pueden ser administradas mediante administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa i.v. o o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable ). Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.407.957 y 5.798.113, que se incorporan como referencia a la presente memoria descriptiva, se describen métodos y aparatos de suministro intrapulmonar, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.654.007. 5.780.014 y 5.814.607, que se  
60 incorporan como referencia la presente memoria descriptiva. Otros sistemas de suministro parenteral útiles incluyen partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, suministros de bombeo, suministro de células encapsuladas, suministro liposomal, inyección suministrada con agujas, inyección de agujas menores, nebulizador, aerosol, electroporación y parche transdermal. Los suministros con inyectores de agujas menores se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.879.327, 5.520.639, 5.846.233 y  
65 5.704.911, cuyas descripciones se incorporan como referencia a la presente memoria descriptiva. Cualquiera de las formulaciones anteriormente descritas pueden ser administradas usando estos métodos.

Las inyecciones subcutáneas tienen las ventajas de permitir una auto-administración aunque da lugar también a una semi-vida prolongada en comparación con la administración intravenosa. Además de ello, una diversidad de dispositivos diseñados para la conveniencia del paciente, como cilindros de inyección rellenables y dispositivos de inyección de agujas menores, pueden ser usados con las formulaciones de la presente invención, como se expone en la presente memoria descriptiva.

#### Dosificación

La cantidad de acompañante farmacológico específico eficaz para rescatar la enzima de lisosoma mutante endógena puede ser determinada sobre una base de caso por caso por los expertos en la técnica. Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas como la semi-vida ( $t_{1/2}$ ) concentración pico en plasma ( $C_{max}$ ), tiempo para la concentración pico en plasma ( $t_{max}$ ), exposición medida mediante el área bajo la curva (AUC) y distribución de tejidos para la proteína de sustitución y el acompañante farmacológico específico, así como los datos para la unión de acompañante farmacológico específico/enzima de lisosoma (constantes de afinidad, constantes de asociación y disociación y valencia) pueden ser obtenidos usando métodos ordinarios conocidos en la técnica para determinar cantidades compatible necesaria para estabilizar la proteína de sustitución, sin inhibir su actividad y, por tanto para conferir un efecto terapéutico.

Los datos obtenidos a partir del ensayo de cultivo de células o estudios en animales pueden ser usados para formular un intervalo de dosificación terapéutica para ser usado en seres humanos y animales no humanos. La dosificación de compuestos usadas en los métodos terapéuticos de la presente invención se sitúan preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la concentración  $ED_{50}$  (eficaz para un 50% de la población ensayada ) pero con poca o ninguna toxicidad. La dosificación particular usada en cualquier tratamiento puede variar dentro de este intervalo dependiendo de factores como la forma de dosificación particular empleada, la vía de administración utilizada, las condiciones del individuo (por ejemplo, paciente), etcétera.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser inicialmente estimada a partir de ensayos de cultivos celulares y ser formulada en modelos de animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que estará por encima de la  $EC_{50}$  observada en células durante un período de tiempo y por debajo de la  $IC_{50}$  observada durante un período de tiempo. La concentración  $EC_{50}$  de un compuesto es la concentración que consigue un aumento medio máximo de la actividad enzimática (por ejemplo, determinada a partir de los ensayos de cultivos celulares), mientras que la  $IC_{50}$  es la concentración que consigue una inhibición media máxima de la actividad enzimática. Las dosificaciones apropiadas para ser usadas en un individuo particular, por ejemplo en pacientes humanos puede ser entonces más exactamente determinada usando esta información, como se describe adicionalmente con posterioridad.

Las mediciones de los compuestos en plasma se pueden realizar rutinariamente en un individuo, como un paciente, mediante técnicas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases.

La toxicidad y a eficacia terapéutica de la composición pueden ser determinadas mediante procedimientos farmacéuticos estándar, por ejemplo, en ensayos de cultivos celulares o usando animales experimentales para determinar la  $LD_{50}$  y la  $ED_{50}$ . Los parámetros  $LD_{50}$  y  $ED_{50}$  son bien conocidos en la técnica y se refieren a las dosis de un compuesto que son letales para un 50% de una población y terapéuticamente eficaces en un 50% de una población, respectivamente. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos se expresa como el índice terapéutico y puede ser expresado como la relación:  $LD_{50}/ED_{50}$ . Son preferidos acompañantes farmacológicos específicos que exhiben índices terapéuticos grandes.

Cuando el acompañante es un inhibidor, las dosis óptimas del acompañante farmacológico específico se determinan según la cantidad necesaria para estabilizar la GCasa, por ejemplo, enzima lisosomal, in vivo, en tejido o en circulación, sin sostener la inhibición de la enzima. Esto dependerá de la biodisponibilidad del acompañante farmacológico específico en tejido o en circulación y de las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del acompañante farmacológico específico en tejido o en circulación durante un período de tiempo prolongado. La concentración del inhibidor puede ser determinada calculando los valores de  $EC_{50}$  e  $IC_{50}$  del acompañante específico para la enzima, de forma que la dosis administrada (i) consiga una concentración en plasma por encima de la  $EC_{50}$  durante algún tiempo para permitir un tránsito máximo hasta el lisosoma, y (ii) permitir que la concentración en plasma caiga por debajo de la  $IC_{50}$  durante algún tiempo una vez que la enzima está en el lisosoma, con lo que el sustrato puede ser hidrolizado.

Esta determinación dependerá también de factores farmacocinéticos que incluyen la semi-vida del acompañante en sangre y en tejido,  $t_{max}$  y  $E_{max}$  y la semi-vida de la enzima lisosomal. En una realización, se describen relaciones para estimar los regímenes de dosificación para acompañantes farmacológicos de forma adicional en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/914.288, presentada el 27 de abril de 2007, que se incorpora como referencia a la presente memoria descriptiva en su totalidad. Esta solicitud describe una dosificación (pico y transitori) para inhibidores de GCasa en los que se proporciona diariamente "una dosis de cargar" inicial para maximizar la estabilización de la enzima y el tránsito hasta el lisosoma, seguido de un periodo de dosificación a intervalos no diarios que permiten la disociación del inhibidor y la hidrólisis del sustrato. Sin embargo, están previstos también

otros regímenes de dosificación.

Terapia de combinación de fármacos

5 El acompañante farmacológico puede ser usado para tratar pacientes con las enfermedades neurológicas en combinación con otros fármacos que se usan también para tratar el trastorno. Los tratamientos con fármacos convencionales para la enfermedad de Parkinson incluyen, pero sin limitación, RNAi y agentes farmacológicos como levodopa, anticolinérgicos, inhibidores de COMT (catecol-O-metil-transferasa), agonistas de receptores de dopamina, MAOI (inhibidores de monoamina oxidasa) o inhibidores de descarboxilasa periférica.

10 El acompañante o acompañantes farmacológico s para GCasa puede(n) usado(s) para tratar pacientes con enfermedad de Niemann-Pick tipo C en combinación de alopregnanolona, una dieta baja en colesterol o agentes para disminuir el colesterol como las estatinas, (por ejemplo, lipitor®); fibratos como fenofibrato (lipidil®); niacina; ezetinibe (Zetia®) y/o resinas de unión como colestiramina (Questran®).

15 Además, el acompañante farmacológico puede ser usado en combinación con una terapia génica. La terapia génica está prevista con genes de sustitución como Gba o con RNA inhibidor (SiRNA) para el gen SNCA. La terapia génica se describe más en detalle en la solicitud de patente comúnmente poseída número de serie 10/781.356 presentada el 17 de febrero de 2004.

20 Otra terapia de combinación prevista incluye combinaciones de acompañantes farmacológicos específicos con una terapia de vacuna, como una vacuna que comprende  $\alpha$ -syn y un adyuvante (Pilcher et al., Lancet Neurol. 2005; 4(8):458-9), o combinaciones de acompañantes de GCasa con acompañantes para  $\alpha$ -syn como Hsp70 o un acompañante farmacológico específico, combinaciones con agentes antiinflamatorios como hibuprofeno u otros NSAIDS, o con otros agentes que puedan ser protectores en enfermedades neurodegenerativas como dextrometorfano (Li et al., FASEB J. 2005; Apr;19(6):489-96), genisteína (Wang et al., Neuroreport. 2005; Feb 28;16(3):267-70) o minociclina (Blum et al., Neurobiol Dis. 2004; Dec;17(3):359-66).

30 También está prevista una terapia de combinación con un inhibidor de sustrato para GCasa como N-butildesoxinojirimicina (Zavesca®).

35 Finalmente, las combinaciones de acompañantes de GCasa con uno o más acompañantes para otras enzimas lisosomales están previstas también en una realización, los acompañantes son administrados a un individuo que no tiene mutaciones en ninguna de las enzimas lisosomales para las que se administran los acompañantes. En otra realización, el individuo tiene una mutación en una enzima lisosomal distinta de GCasa y se le administra un acompañante específico para esa enzima en combinación con el acompañante de GCasa. A continuación se proporciona una tabla que recoge acompañantes potenciales para enzimas lisosomales.

Tabla 1

ENZIMA LISOSOMAL	ACOMPAÑANTE FARMACOLÓGICO ESPECÍFICO
$\alpha$ -glucosidasa Nº de acceso de GenBank Y00839	1-desoxinogirimicina (DNJ) $\alpha$ -homonogirimicina castanospermina
$\beta$ -glucosidasa ácida ( $\beta$ -glucocerebrosidasa) Nº de acceso GenBank J03059	isofagomina C-becil-isofagomina y derivados N-alkilo (C9-12)-DNJ Glucimidazoles (y derivados) Ci-alkuil-IFG (y derivados) N-alkuil- $\beta$ -valeinaminas Flufenozina Calisteginas A <sub>3</sub> , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> y C <sub>1</sub>
$\alpha$ -galactosidasa A Nº de acceso GenBank NM000169	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) $\alpha$ -alo-homonogirimicina $\alpha$ -galacto-homonogiglimicina $\beta$ -1-C-butyl-desoxinogirimicina calisteginas A <sub>2</sub> y B <sub>2</sub> N-metil-calisteginas A <sub>2</sub> y B <sub>2</sub>
$\beta$ -galactosidasa ácida Nº de acceso GenBank M34423	4-epi-isofagomina 1-desoxigalactonorigicina
Galactocerebrosidasa ( $\beta$ -galactosidasa ácida) Nº de acceso GenBank D25283	1-desoxigalactonojirimicina Swainsonina Mannostatina A

$\alpha$ -manocidasa ácida Nº de acceso GenBank U68567	2-hidroxi-isofagomina
$\beta$ -manocidasa ácida Nº de acceso GenBank U60337	1-desoxifuconogirimicina $\beta$ -homofuconogirimicina 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-N-glucitol 2,5-desoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-iminos-1,2,5-tridesoxi-D-altritol
$\alpha$ -L-fucosidasa ácida Nº de acceso GenBank NM_0000147	1,2-didexosi-N-acetamido-nogirimicina
$\alpha$ -N-acetilglucosaminidasa Nº de acceso GenBank U40846	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galactonogirimicina
$\alpha$ -N-acetilgalactosaminidasa Nº de acceso GenBank M62783	2-N-acetilamino-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nogirimicina Nastatina
$\beta$ -Hexosaminidasa A Nº de acceso GenBank NM_000520	2-N-acetamido-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nogirimicin-nagstatina
$\beta$ -Hexosaminidasa B Nº de acceso GenBank NM_000521	2-N-acetamido-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nogirimicin-nagstatina
$\alpha$ -L-irudonidasa Nº de acceso GenBank NM_000203	1-desoxiduronogirimicina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
$\beta$ -glucuronidasa Nº de acceso GenBank NM_000181	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Sialidasa Nº de acceso GenBank U84246	Ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico siastatina B
Hidronato sulfatasa Nº de acceso GenBank AF_011889	2,5-anhidromanitol-6-sulfato
Esfingomielinasa ácida Nº de acceso GenBank M59916	disipramina, fosfatidilinositol-4,5-difosfato

- En una realización específica la enfermedad de Niemann-Pick tipo C es tratada con un acompañante farmacológico específico para GCasa en combinación con un acompañante farmacológico específico para  $\beta$ -desoxaminidasa A y/o un acompañante farmacológico específico para  $\beta$ -galactosidasa, ya que esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de  $G_{M2}$ -gangliócidos y  $G_{M1}$ -gangliócidos además de GlCer (Vanier et al., Brain Pathology. 1998; 8: 163-74).

#### Determinación de respuestas a la terapia de acompañamiento

- 10 Como se indicó anteriormente los pacientes con enfermedades neurodegenerativas presentan síntomas neurológicos característicos. Por ejemplo, los pacientes que tienen enfermedad de Parkinson experimentan temblores, rigidez, bradiquinesia y desequilibrio postural. Los pacientes que tienen demencia de estructuras de Lewy experimentan fuertes síntomas psicóticos (alucinaciones visuales) además de declive mental como pérdida de memoria e incapacidad para llevar a cabo tareas sencillas. Las mejoras observables en los síntomas con la terapia de acompañamiento farmacológica o el retraso en la aparición de ciertos síntomas en pacientes con riesgo de desarrollar un trastorno o un retraso en el progreso del trastorno serán evidencias de una respuesta favorable a la terapia de acompañamiento.

- 20 Además, los marcadores sucedáneos medibles pueden ser también útiles para evaluar la terapia de acompañamiento. Por ejemplo, algunos investigadores han informado que se detectan niveles elevados de  $\alpha$ -Syn o formas oligómeras de  $\alpha$ -Syn en el plasma de pacientes con enfermedad de Parkinson (Lee et al., J Neural Transm. 2006;113(10):1435-9; El-Agnaf et al., FASEB J. 2006;20(3):419-25), mientras que algunos han informado una disminución de  $\alpha$ -Syn en plasma en pacientes de Parkinson en comparación con testigos normales (Li et al., Exp Neurol. 2007;204(2):583-8).

25

#### **Ejemplos**

La presente invención se describe adicionalmente por medios de los ejemplos presentados a continuación. Análogamente, la invención no está limitada a ninguna de las realizaciones preferidas particulares descritas en la

presente memoria descriptiva. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta memoria descriptiva. Por lo tanto, la invención debe limitarse solamente a los términos de las reivindicaciones anejas junto con el alcance completo de los equivalentes con los que están tituladas las reivindicaciones.

5

#### Ejemplo 1: Actividad de GCasa in vivo en ratones tras un tratamiento con IFG

Se administró un acompañante de GCasa, IFG, a ratones normales que expresaban actividad de GCasa de tipo salvaje y GCasa.

10

#### Métodos

*Administración de fármacos.* Este ejemplo, proporciona información sobre los efectos de isofagomina, un acompañante específico de GCasa en ratones. Se administró IFG a ratones a 200 mg/kg/día; se recogieron órganos y plasmas cuatro semanas después del inicio de estudio. Se usaron 10 ratones C57BL6 machos (25 g) por grupo. El fármaco se proporcionó en el agua de bebida, por lo tanto se verificó el consumo de agua diariamente.

15

En el grupo testigo (0 mg/kg/día), los ratones fueron dosificados diariamente en el agua de bebida (sin fármaco y se dividieron en dos grupos. Diez animales fueron sacrificados después de 4 semanas de tratamiento, se recogió sangre de la aorta descendente o la vena cava y se recolectaron tejidos que fueron necropsiados.

20

El grupo del ensayo, 10 ratones fueron dosificados diariamente en el agua de bebida con un objetivo de administración de 200 mg/kg/día.

25

Las muestras de sangre fueron extraídas en heparina de litio y se centrifugaron para el plasma. Después de la hemorragia, el bazo, pulmón, cerebro y el hígado se extirparon y se colocaron en viales. Los viales se colocaron en hielo seco para una rápida congelación. Los tejidos y el plasma fueron seguidamente analizados en cuanto a niveles de GCasa.

30

*Preparación de tejidos.* Se retiraron pequeñas partes de tejido y se añadieron a 500  $\mu$ l de tampón de lisis (citrato de sodio 20 mM e hidrógeno-fosfato de disodio 40 mM, pH 4,0, que incluye 0,1% de (TritonX-100). Los tejidos fueron seguidamente homogeneizados usando un microhomogeneizador durante un tiempo breve, seguido de centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las materias sobrenadantes fueron transferidas a un nuevo tubo y se usaron para el ensayo de enzimas.

35

*Ensayo de enzimas de tejidos.* A 2,5  $\mu$ l de materia sobrenadante (en placas de 96 pocillos) se añadieron 17,5  $\mu$ l de tampón de la reacción (tampón de citrato-fosfato, pH 4,5 sin Triton X-100) y 50  $\mu$ l de sustrato marcado (4- $\mu$ ) de 4-metil-umbelliferona,  $\beta$ -glucopiranosido o testigos negativos marcados ( $\alpha$ -glucopiranosido o  $\alpha$ -galactopiranosido). Las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora, y seguidamente se añadieron 70  $\mu$ l de tampón de detención (glicina-NaOH 0,4 M, pH 10,6). La actividad de GCasa se determinó midiendo la emisión a 460 nm excitando a 355 nm usando un tiempo de lectura de 1 segundo por pocillo contador (Victor2 multilabel counter-Wallac). La actividad enzimática fue normalizada respecto a la cantidad de  $\mu$ l de lisado añadido y se estimó la actividad enzimática por  $\mu$ l de lisado. La relación de mejora es igual a la actividad con el compuesto respecto a la actividad sin el compuesto.

40

45

#### Resultados

Como se demuestra en la figura 1, los niveles de GCasa fueron aumentados a continuación de dos semanas de tratamiento IFG en el hígado (1), bazo (2), cerebro (3) y pulmón (4). Se observaron resultados similares en un experimento separado en el que 10 ratones fueron tratados con 0, 1, 10 o 100 mg/kg/día de base libre de IFG; la actividad de GCasa de tipo salvaje mostró un aumento de la respuesta a la dosis lineal con base libre de ISG.

50

Estos resultados apoyan y confirman que los acompañantes farmacológicos específicos pueden aumentar la actividad de GCasa no mutante in vivo y, particularmente, en el cerebro.

55

#### Ejemplo 2: Administración de dosis múltiples de IFG para evaluar la seguridad, tolerancia, características farmacocinéticas y efecto sobre la actividad enzimática de $\beta$ -glucocerebrosidasa

Se mostró previamente que el DG, un acompañante farmacológico para  $\alpha$ -galactosidasa A, otra enzima lisosomal producía un aumento dependiente de la dosis en la actividad de  $\alpha$ -galactosidasa en glóbulos blancos de voluntarios sanos a 50 mg b.i.d. y 150 mg b.i.d.

60

Este ejemplo describe dos estudios de fase I controlada con placebo doblemente ciego dosificando IFG para evaluar la seguridad, tolerancia, características farmacocinéticas y farmacodinámicas de IFG en voluntarios sanos.

*Diseño y duración del estudio.* En un primer estudio (1a) de dosis ascendente única en seres humanos, se administraron dosis de 8, 25, 75 y 150 (dos series) y 300 mg (6 activos y 2 placebos en cada serie). En un estudio de dosis ascendentes múltiples (1b) se administraron dosis de 25, 75 y 225 mg diariamente durante 7 días (6 activos, 2 placebos en cada serie). En ambos estudios, de los 8 sujetos en cada grupo, seis se tomaron al azar para recibir tartrato de IFG y dos sujetos recibieron placebo. Los sujetos fueron confinados desde la tarde del día 1 hasta 24 horas después de completar la dosificación. En la Fase 1A los sujetos del estudio volvieron a las 48 horas (toma de muestras de PK) y 7 días (seguimiento de seguridad) a continuación de la dosificación. En la fase 1b los estudios de sujeto volvieron a las 48 h (toma de muestras de PD), 7 días (toma de muestras de PD y seguimiento de seguridad) y 14 días (toma de muestras de PD) a continuación de la última dosis.

*Población del estudio.* Los sujetos eran voluntarios machos y hembras sanos entre 19 y 55 años de edad (inclusive) que consistían en miembros de la comunidad en su mayor parte.

*Valoraciones de la seguridad y la tolerancia.* La seguridad se determinó evaluando indicios vitales, parámetros de laboratorio (química del suero, hematología y urinalisis), examen físico y registrando los acontecimientos adversos durante el período de tratamiento.

*Toma de muestras farmacocinéticas.* Se recogieron muestras de sangre (10 ml cada una) en tubos de recogida de sangre que contenían EDTA antes de la dosificación y se determinaron a intervalos regulares para a fase 1a durante 48 h a continuación de la dosificación. En la fase 1b se determinó un estudio del perfil farmacocinético de tartrato de IGF completo durante 24 h a continuación de la primera dosis, los valores de  $C_{min}$  se determinaron previamente a la dosis en los días 6 y 7 y se determinó otro perfil completo durante 24 h a continuación de la dosis final de día 7.

*Toma de muestras de la actividad enzimática de GCasa.* La actividad de GCasa se determinó previamente a la dosis en los días 1, 3, 5, 7, 9, 14, y 21. Se recogieron muestras de sangre en un baño con hielo y se centrifugó bajo refrigeración tan pronto como fue posible. Las muestras de plasma se dividieron en dos partes alícuotas y se almacenaron a  $20 \pm 10^{\circ}C$  pendientes del ensayo. Al final del estudio, todas las muestras fueron transferidas a los laboratorios MDS Pharma Services Analytical Laboratories (Lincoln) para el análisis. Se recogió la producción completa de orina para cada sujeto para un análisis de IFG para determinar la eliminación renal durante las 12 primeras horas después de la administración de tartrato de IFG en los días 1 y 7.

*Análisis estadístico.* Los datos de seguridad incluían evaluaciones de laboratorio, exámenes físicos, acontecimientos adversos, verificación de ECG y valoraciones de indicios se resumieron mediante el grupo de tratamiento y el valor del tiempo de recogida. Se calcularon datos estadísticos descriptivos (media aritmética, desviación típica, mediana, mínimo y máximo) para los datos de seguridad cuantitativa así como para la diferencia respecto a la línea de base. Los recuentos de la frecuencia se agruparon para la clasificación de los datos de seguridad cualitativa.

## Resultados

*Características farmacocinéticas.* En ambos estudios, el tartrato de isofagomina generalmente fue bien tolerado a todas las dosis y los acontecimientos adversos que surgieron del tratamiento en ambos estudios fueron principalmente leves. No aparecieron acontecimientos adversos graves.

El tartrato de isofagomina mostró una buena exposición sistémica a través de la vía oral. En el estudio de dosis única, los valores de AUC y  $C_{max}$  en plasma se correlacionaron linealmente con la dosis administrada. Los niveles medios en plasma alcanzaron picos a las 3,4 h (SEM: 0,6 h) y la semi-vida de eliminación en plasma fue de 14 h (SEM: 2h). En el estudio de dosis múltiples, después de 7 días de administración oral, el comportamiento farmacocinético se encontró que era lineal con la dosis, sin acumulación inesperada de tartrato de isofagomina. Los valores de  $T_{max}$  y de semi-vida fueron similares a los observados en el estudio de dosis única.

Después de que se administraron dosis repetidas de 25 a 225 mg de IGF a sujetos machos y hembras sanos, las semi-vidas medias variaron en el intervalo de 5,14 a 19,9 horas. Se observó una acumulación mínima de IFG después de unas dosis repetidas, basadas en comparaciones de AUC y  $C_{max}$  en el día 1 y el día 7. No hubo diferencias de sexo observables en ninguno de los parámetros farmacocinéticos evaluados.

Los acontecimientos adversos más frecuentemente referidos por sujetos adultos sanos que recibieron IFG incluían dermatitis de contacto, dolor de cabeza, náuseas, bilirrubina aumentada en suero, confusión, costras, hiperemia ocular, y dolor en el sitio de punción. No se produjeron acontecimientos adversos y ningún sujeto interrumpió el tratamiento debido a acontecimientos adversos.

*Actividad de GCasa.* En todos los sujetos que recibieron IFG, hubo un aumento considerable en los niveles de GCasa durante el período de tratamiento, seguido de una disminución tras la supresión del fármaco y el retorno a niveles cercanos a la línea de base en el día 21, dos semanas después de la última dosis de IFG. Los aumentos en los niveles de enzimas estaban relacionados con la dosis, alcanzando aproximadamente 3,5 veces por encima de la línea de base (figura 2). Estos resultados indican que el IFG administrado por vía oral tiene la capacidad potencial de aumentar los niveles de su diana prevista, GCasa en seres humanos in vivo.

Ejemplo 3: Evaluación de IFG en ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína

Este Ejemplo describe resultados de la administración de IFG a ratones transgénicos que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína. La expresión neuronal de  $\alpha$ -sinucleína humana de tipo salvaje dio lugar a una acumulación progresiva de  $\alpha$ -sinucleína y de inclusiones inmuno-reactivas ubiquinadas, que incluyen nucleares y citoplásmicas en neuronas en el neocórtex, hipocampo de CA3 y sustancia negra en un tiempo de 2 meses (Masliah et al, Science. 2000; 287: 1269). Basándose en la capacidad de IFG para aumentar la actividad de GCasa de tipo salvaje en ratones y seres humanos, se anticipó que el aumento de GCasa en estos ratones puede compensar la  $\alpha$ -sinucleína sobreexpresada y eliminar o reducir las inclusiones.

## Métodos

*Ratones.* Se dividieron 48 animales transgénicos (machos y hembras) en seis grupos (n = 8) de una edad de 5 a 6 semanas relativa a la línea de base de 3 a 4 semanas, respectivamente, relativa a todos los otros grupos de tratamiento al comienzo del tratamiento. Un grupo de animales transgénicos sirvió como grupo de línea de base (5 semanas de edad) y fue sacrificado sin tratar en el día 0. Un grupo de animales transgénicos fue tratado con vehículo.

*Tratamiento.* Los ratones (3-4 semanas de edad) fueron tratados una vez al día (vía oral) a 2 mg/kg, 20 mg/kg o 200 mg/kg de tartrato de IGF durante 3 meses. Un grupo fue tratado también en días alternados a 20 mg/kg.

*Preparación de tejidos.* Los animales del grupo de línea de base fueron sacrificados a la edad de 5 semanas. Todos los otros animales fueron sacrificados al final del período de tratamiento de 3 meses y se extrajo sangre para la preparación de suero y macrófagos así como pulmón, cerebro y CSF. Por lo tanto, todos los ratones fueron sedados mediante anestesia de inhalación estándar (isoflurano, Baxter). Se obtuvo fluido cerebroespinal mediante disección cerrada y exposición al foramen magnum. Tras la exposición, se insertó una pipeta Pasteur a una profundidad de aproximadamente 0,3-1 mm en el foramen Magnum. Se recogió CSF succionando y mediante acción capilar hasta que el flujo cesó completamente. El CSF fue inmediatamente congelado y mantenido a -80°C.

Después de las tomas de muestras de CSF, cada ratón se colocó apoyado en la parte dorsal, se abrió el tórax y se insertó una aguja de calibre 26 conectada a una jeringuilla de 1 cm<sup>3</sup> en la cámara ventricular cardíaca derecha. Se aplicó succión a la aguja. Se separó la sangre en dos partes. Una parte se recogió en citrato de sodio al 3,8% para obtener plasma y macrófagos y una parte para obtener suero. Los ratones fueron perfusionados por vía transcardíaca con solución salina fisiológica (0,9%) y el tejido pulmonar así como el cerebral se retiraron rápidamente. Los pulmones fueron aclarados con PBS frío (parte exterior solamente) para retirar la sangre y seguidamente fueron rápidamente congelados.

Los cerebros fueron extirpados y hemiseccionados. Los hemisferios derechos de todos los ratones fueron fijados por inmersión en paraformaldehído/PBS al 4% recientemente producido (pH 7,4) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente los cerebros fueron transferidos a una solución de PBS en sacarosa al 15% durante 24 horas para asegurar la crioprotección. Al día siguiente los cerebros fueron congelados en isopentano líquido y almacenados a -80°C hasta que fueron usados para investigaciones histológicas. Para determinar los efectos del tratamiento con tartrato de IGF a partir de 8 animales por grupo, se cortaron criosecciones de 10  $\mu$ m de grosor para la determinación de la patología de  $\alpha$ -sinucleína. Todos los órganos y tejidos mencionados fueron recogidos en muestras y de zonas específicas del cerebro, por ejemplo, el hipocampo, cerebro medio, corteza frontal y estriato de un hemisferio cerebral fueron extraídos y congelados. La otra mitad del cerebro fue tratada para una evaluación histológica.

*Tinción.* Para la evaluación del número de células positivas a  $\alpha$ -sinucleína e inclusiones de tipo estructuras de Lewy se llevó a cabo una tinción inmuno-histoquímica usando el anticuerpo monoclonal específico de  $\alpha$ -sinucleína humano (Alexis®; Cat# 804- 258-L001), dilución 1:5, detectado con anticuerpo secundario Cy2 (Jackson ImmunoResearch®). Se contó el número de células positivas a  $\alpha$ -sinucleína en cinco capas diferentes, un extracto por capa, para una evaluación en el hipocampo completo y la corteza, separadamente.

Brevemente, las muestras fueron lavadas durante 10 minutos en PBS a temperatura ambiente, seguidamente fueron fijadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% y seguidamente se lavaron 2 veces durante 5 minutos cada una con PBS a temperatura ambiente. Para las secciones tratadas con proteinasa K, las secciones fueron incubadas en PBS que contenía 10  $\mu$ g/ml de proteinasa K durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo para bloquear peroxidasa endógena, seguido de dos lavados más de 5 minutos con PBS. Las muestras seguidamente se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con un reactivo de bloqueo para bloquear la unión no específica, seguido de 2 lavados más de 5 minutos con PBS. Seguidamente las muestras se incubaron con diluyente M.O.M durante 5 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1:5 en diluyente M.O.M.) durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Después de una hora, las muestras se lavaron dos veces durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente y se incubaron durante otros 60 minutos a temperatura ambiente con reactivo de bloqueo. Después de dos lavados, las muestras se incubaron con anti-rata de cabra de Ab, Cy2 (dilución 1:200 en M.O.M.) durante 60 minutos a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Las muestras seguidamente se lavaron durante 5 minutos con PBS, durante 5 minutos con agua esterilizada con calidad de biología molecular y se cubrieron con poli(alcohol vinílico).

*Determinación de patología de  $\alpha$ -sinucleína cerebral.* Para la evaluación de la inmuno-reactividad de  $\alpha$ -sinucleína, se usó un programa de ordenador de análisis de imágenes especializado (Image Pro Plus, version 4.5.1.29). Cada imagen de fluorescencia fue registrada usando el mismo tiempo de exposición ajustado a 400 ms. Hasta 100 imágenes únicas con un aumento de 100 veces cada una fueron reunidas en una imagen (tamaño real aproximadamente 3 x 1 m), asegurando una elevada resolución de píxeles para el recuento de IR. Todas las imágenes reunidas fueron contrastadas manualmente y para la detección en todas las mediciones, se usó un umbral basado en la misma intensidad. Se ajustó una restricción de tamaños hasta un tamaño mínimo de 30  $\mu\text{m}^2$  para asegurar que el recuento de una célula única en la capa de mayor agudeza y solamente una vez entre las capas adyacentes. Durante el procedimiento de valoración basado en macro-valores, se guardaron los esquemas de los recuentos de objetos.

En una etapa adicional, todos los objetos medidos fueron extraídos de la imagen original (exenta de contrastes) usando los esquemas guardados y reunidos según el tamaño de los objetos en una imagen de objetos al azar. Las imágenes de los objetos al azar fueron nuevamente evaluados usando una restricción de redondeo (límite inferior: 1; límite superior: 1,5) para células positivas a  $\alpha$ -sinucleína a partir de objetos con desviaciones. Estos recuentos de objetos automáticos fueron controlados visualmente y el recuento fue corregido manualmente añadiendo todas las células explícitas que no eran suficientemente redondas o no eran separables del fondo en la lámina de extensión, conduciendo al recuento de células final.

Se evaluaron y calcularon los siguientes parámetros:

- medición del área de corteza y el hipocampo en cada lámina cortada; y
- número de células positivas a IR por área de medición de las zonas cerebrales específicas del hipocampo y la corteza.

#### Resultados

*Cualitativos.* Las diferencias entre los ratones tratados y sin tratar eran cualitativamente visibles en grados diferentes a partir del fondo fuertemente disminuido y los números de células positivas a  $\alpha$ -sinucleína disminuidas en algunos de los animales tratados con tartrato de IFG (2 l 20/ mg/kg en peso diariamente), hasta una reducción del fondo sin números de células inmuno-reactivas disminuidas, en comparación con la patología de animales testigos (figuras 3 A-C, corteza; figuras 4 A-C, hipocampo). La intensidad del fondo en los ratones que sobreexpresan  $\alpha$ -sinucleína humana deriva de la  $\alpha$ -sinucleína intracelular en procedimientos neuríticos y dendríticos así como la sinapsis, por lo tanto, una reducción del fondo es achacable a una reducción de la expresión de proteínas en estas estructuras neuronales.

Esto es la primera demostración de que este modelo de ratones desarrolla  $\alpha$ -sinucleína agregada, como se pone de manifiesto mediante la tinción de secciones de un ratón tratado con un testigo de vehículo (figura 5 A). El pretratamiento de secciones con proteinasa K antes de la tinción para  $\alpha$ -sinucleína pone de manifiesto también la presencia de  $\alpha$ -sinucleína agregada por la digestión de  $\alpha$ -sinucleína monómera (figura 5C). El pretratamiento del ratón con IF parece que reduce la agregación de  $\alpha$ -sinucleína. La imagen representa el análisis solamente de un único animal hasta la fecha que respondía a 20 mg/kg de tartrato de IFG en ausencia o presencia de tratamiento con proteinasa K (figuras 5B y D, respectivamente). Como los agregados de  $\alpha$ -sinucleína son resistentes a la digestión de proteinasa K, el pretratamiento pone de manifiesto que los agregados de  $\alpha$ -sinucleína se acumulan en este modelo de animales a lo largo del marco de tiempos investigado y que el tratamiento con tartrato de IFG en los 3 meses anteriores al sacrificio evita la acumulación de estos agregados de  $\alpha$ -sinucleína.

*Cuantitativos.* El tratamiento con tartrato con IFG condujo a una patología de  $\alpha$ -sinucleína disminuida en ambas zonas cerebrales medidas, sin embargo, el efecto fue más pronunciado en el hipocampo (figura 5b) y no alcanzó un nivel significativo en la corteza (figura 6A). La respuesta a la dosis fue claramente visible en el hipocampo y potencialmente en la corteza. La dosis más baja, 2 mg de tartrato de IFG/kg fue la más eficaz y redujo el número de células inmuno-reactivas en el hipocampo de forma significativa frente a los testigos tratados con vehículo ( $p < 0,05$ ), (figura 6B). Las dosis superiores no condujeron a una reducción estadística significativa de la patología de  $\alpha$ -sinucleína. No hubo diferencia entre un tratamiento diario de días alternados con 20 mg de tartrato de IFG y la media estaba al mismo nivel. Sin embargo, debe establecerse que la dosis de 20 mg no fue eficaz frente a los testigos y, por lo tanto, el resultado de que el tratamiento de días alternados tiene la misma eficacia puede que no sea exacto.

Las evaluaciones en el grupo de línea de base condujeron a los siguientes resultados: en primer lugar, a la edad de cinco semanas hubo variación en ratones individuales en lo que respecta a la apariencia de células rellenas con  $\alpha$ -sinucleína en el hipocampo, que condujo a una variación de la patología hipocámpal y una elevada desviación típica estadística. Además, el número de células inmuno-reactivas en la corteza era congruentemente baja a esta edad.

5 Por lo tanto, el aumento de la patología durante el envejecimiento fue significativo frente a todos los grupos investigados en la corteza, pero no alcanzó un nivel significativo en el hipocampo debido a las diferencias individuales en esta zona en el grupo de línea de base.

10 Después de promediar las dos zonas hasta una media individual igual a aumentar el volumen total investigado por animal, todos los grupos tenían una carga de células positivas a  $\alpha$ -sinucleína significativamente superior frente a la línea de base ( $p < 0,01$ ) excepto los ratones tratados con la dosis más eficaz, 2 mg de tartrato de IFG ( $p > 0,05$ ). Esto permite llegar a la conclusión de que la dosificación de 2 mg de tartrato de IFG/kg previno en los ratones el aumento de la patología acompañado por la edad.

15 Estos datos apoyan que el aumento de GCasa puede disminuir los niveles de alfa-sinucleína y prevenir la agregación de monómeros de  $\alpha$ -sinucleína en forma de agregados oligómeros. Un apoyo adicional para este descubrimiento viene de unos resultados recientes en los que se observaron niveles elevados de  $\alpha$ -Syn en plasma (detectados mediante ensayo ELISA) en pacientes que tenían enfermedad de Gaucher (es decir, que tenían una actividad disminuía de GCasa) en comparación con testigos normales ( $p = 0,027$ ). Se evaluó el plasma de 53 machos y hembras con enfermedad de Gaucher (que incluía un macho con el tipo 3).

#### Ejemplo 4: Acumulación de $\alpha$ -sinucleína y el desarrollo de un fenotipo de comportamiento de Parkinsonismo en los cerebros de ratones con actividad de GCasa reducida

25 Este ejemplo describe resultados de análisis inmuno-histoquímicos de  $\alpha$ -sinucleína en los cerebros de ratones genéticamente manipulados knock-in mutantes transgénicos con actividad reducida de GCasa y ratones genéticamente modificados knock-in homocigóticos V394L tratados con conduritól- $\beta$ -hepóxido (CBE), un inhibidor irreversible de GCasa. Los modelos de ratones transgénicos que tienen actividades reducidas de GCasa y acumulan glucosil ceramida (Sun et al 2005, Journal of lipid research) en el cerebro, acumularon también  $\alpha$ -sinucleína

30 ubiquitinada y agregada. Se desarrolló un modelo de ratón transgénico para la enfermedad de Gaucher que no acumula glucosil ceramida ni  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro, pero que se podría inducir que acumule glucosil ceramida y  $\alpha$ -sinucleína mediante tratamiento con conduritól-  $\beta$ -hepóxido (CBE), un inhibidor irreversible de GCasa.

#### Métodos

35 *Ratones.* Ratones homocigóticos para las mutaciones puntuales de 409H o V394L y que expresan un nivel bajo de saposina C en un fondo knock-out de prosaposina, fueron analizados en cuanto a la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro. Se informó que estos ratones acumulaban glucosil ceramida en el cerebro. Los ratones homocigóticos para las mutaciones puntuales V394L solamente, fueron analizados en cuanto a la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína con

40 y sin tratamiento con CBE. Estos ratones no acumulan glucosilceramida en los cerebros a menos que sean tratados con CBE. A los ratones se les administró CBE diariamente mediante inyección intraperitoneal durante 30 días consecutivos (500  $\mu$ M calculada a partir del peso total del ratón) y los cerebros fueron analizados mediante inmuno-histoquímica en cuanto a la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína.

45 Preparación y tinción de tejidos. El tejido cerebral fue congelado y fijado para inmuno-histoquímica con paraformaldehído al 4% y se marcaron conjuntamente secciones en serie con  $\alpha$ -sinucleína anti-humana (ab1903; Abcam, Cambridge, MA) y anti-ubiquitina de conejo (ab7780; Abcam, Cambridge, MA).

#### Resultados

50 Las secciones en serie de los cerebros de ratones que tenían una mutación Gba combinada (D409 o V394L) con expresión reducida de la proteína activadora de GCasa prosaposina C fueron teñidos para  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina. En ratones de 10 semanas de edad, se observó un número significativo de agregados de  $\alpha$ -sinucleína en el hipocampo, ganglios basales (caudado, putamen sustancia negra, núcleo subtalámico), tronco encefálico y algunas zonas corticales y cerebelares. Se encontraron también agregados ubiquitinados en estas zonas y algunos fueron conjuntamente localizados con  $\alpha$ -sinucleína. Sin embargo, los agregados de  $\alpha$ -sinucleína no fueron observados en ratones V394L (con prosaposina normal). Un tratamiento de los ratones V394L con CBE durante 3

55 días, sin embargo, dio lugar a la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en el cerebro. Estos resultados combinados sugieren que la reducción de la actividad de GCasa y el aumento de los niveles de glucosilceramida en el cerebro pueden conducir a un aumento en la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína.

60

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Isofagomina o sal de la misma para ser usada en el tratamiento de un individuo que tiene o que está en riesgo de desarrollar una alfa-sinucleinopatía, en la que el individuo no tiene una mutación en un gen que codifica  $\beta$ -glucocerebrosidasa.
2. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 1, en la que la sal es tartrato de isofagomina.
- 10 3. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 1, en la que la alfa-sinucleinopatía se selecciona entre enfermedad de Parkinson, enfermedad de estructuras Lewy y atrofia sistémica múltiple.
4. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 1, en la que la alfa-sinucleinopatía es la enfermedad de Parkinson.
- 15 5. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 1, en la que la isofagomina o sal de la misma es administrada en una cantidad eficaz para aumentar la actividad de  $\beta$ -glucocerebrosidasa en al menos 1,2 veces sobre los niveles basales en el individuo.
- 20 6. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 1, en la que la isofagomina o sal de la misma es administrada en una cantidad eficaz para aumentar la actividad de  $\beta$ -glucocerebrosidasa en al menos 1,5 veces sobre los niveles basales en el individuo.
- 25 7. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 1, en la que la isofagomina o sal de la misma es administrada en una cantidad eficaz para aumentar la actividad de  $\beta$ -glucocerebrosidasa en al menos 2 veces sobre los niveles basales.
8. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente co-administrar un segundo agente terapéutico.
- 30 9. Isofagomina o una sal de la misma según la reivindicación 8, en la que el segundo agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en Levodopa, un anticolinérgico, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa (COMT), un agonista de receptores de dopamina, un inhibidor de monoamina oxidasa (MAOI), un inhibidor de descarboxidasa periférica y un antiinflamatorio.

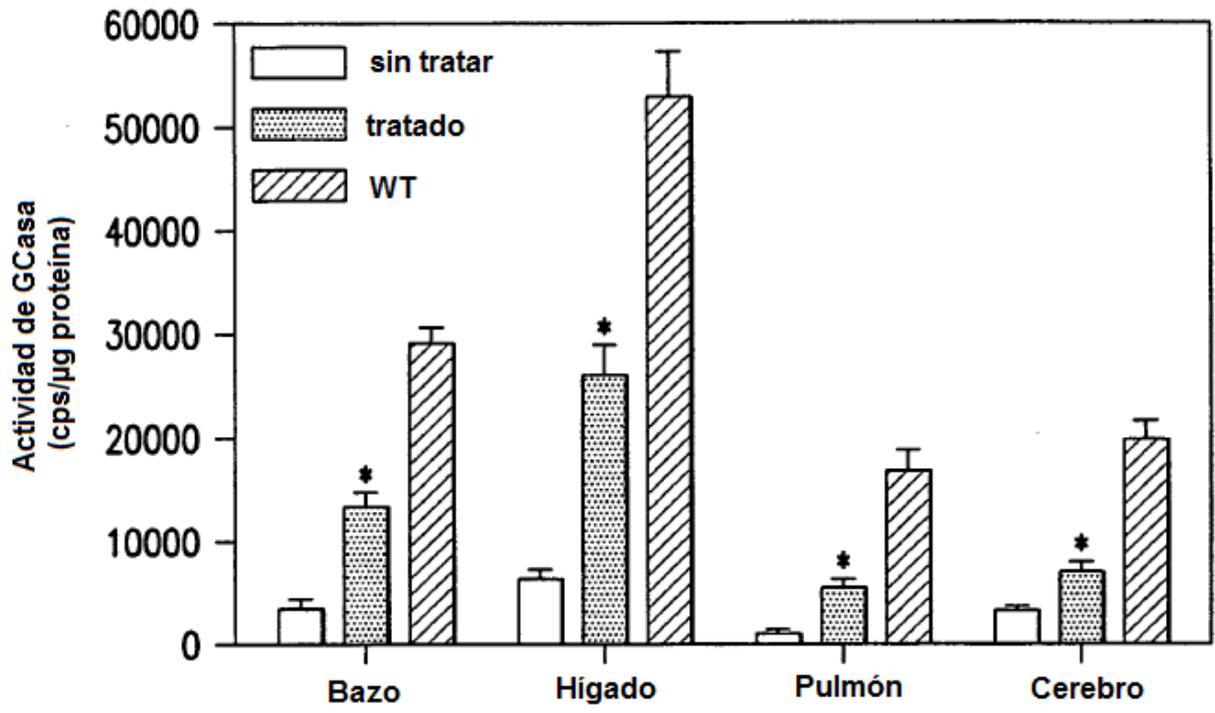
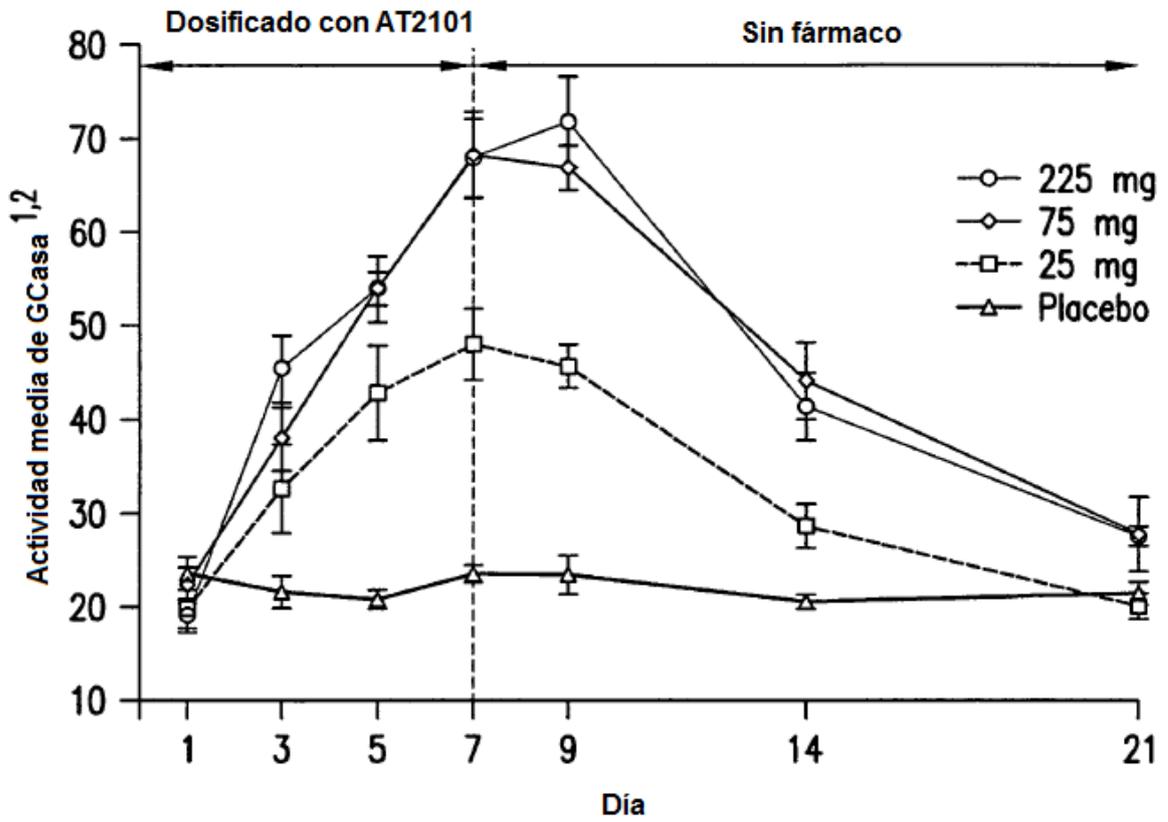


FIG.1



1. Unidades en nmol 4 MU/mg de proteína por hora  
 2. Valores expresados con error estándar

FIG.2

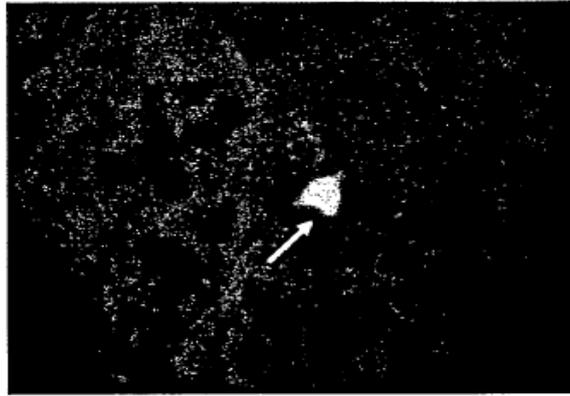


FIG.3A



FIG.3B



FIG.3C

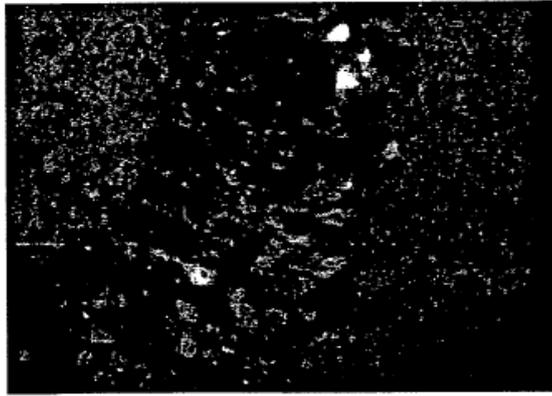


FIG.4A

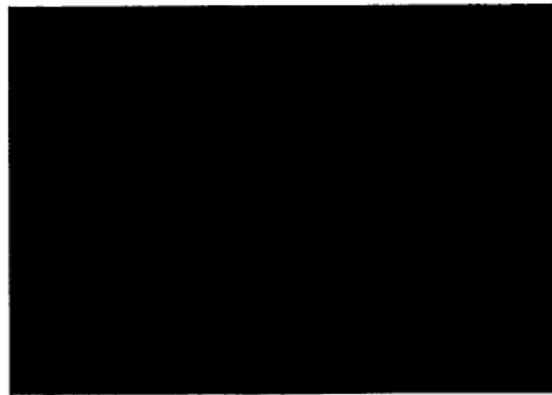


FIG.4B



FIG.4C

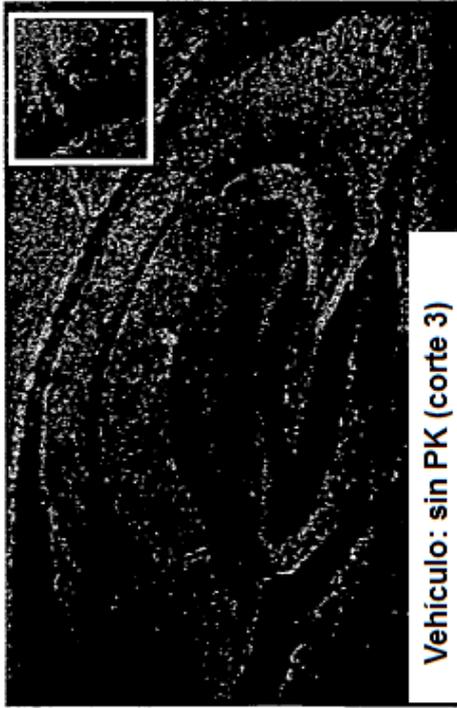


FIG.5A

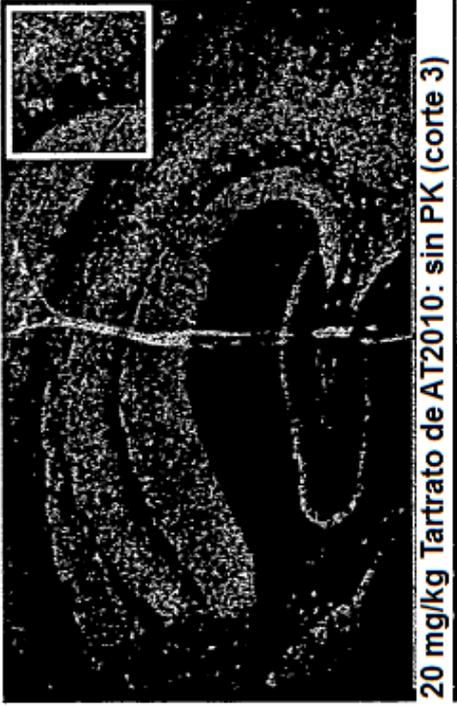


FIG.5B

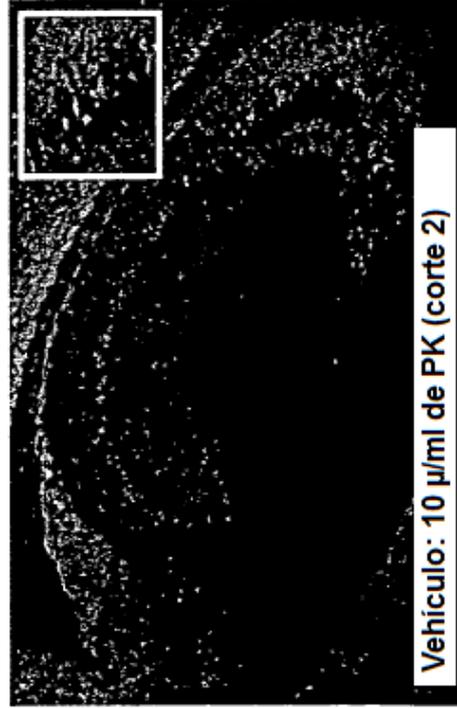


FIG.5C

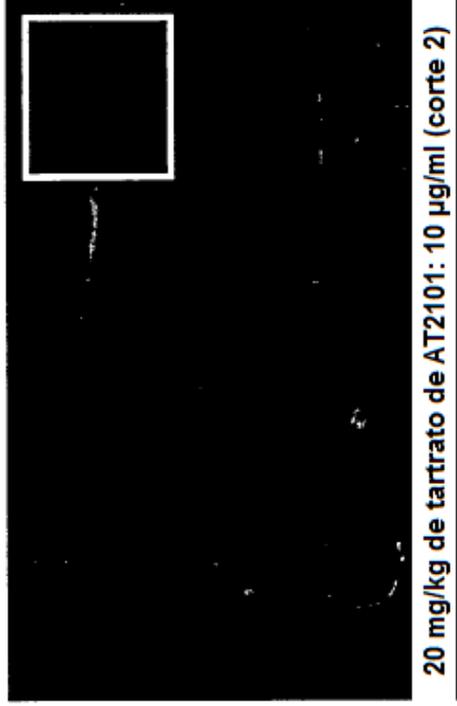


FIG.5D

