

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 182**

51 Int. Cl.:

C07D 211/40 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2004 E 04810772 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 1682504**

54 Título: **Derivados de hidroxipiperidina para tratar la enfermedad de Gaucher**

30 Prioridad:

12.11.2003 US 519496 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.04.2013

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
1 Cedar Brook Drive, Cranbury
New Jersey 08512 , US**

72 Inventor/es:

**FAN, JIAN-QIANG;
ZHU, XIAOXIANG y
SHETH, KAMLESH**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 402 182 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de hidroxipiperidina para tratar la enfermedad de Gaucher

5 **Campo de la invención**

La presente invención proporciona novedosos derivados de hidroxipiperidina (HP) que tienen (i) una carga positiva en la posición correspondiente a la posición anomérica de un anillo de piranosa; (ii) un ligador flexible corto que emana de la posición correspondiente del oxígeno del anillo en una piranosa; y (iii) un resto lipófilo conectado al ligador y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Alternativamente, el ligador puede estar ausente si el resto lipófilo se corresponde con una cadena de hidrocarburo con una longitud lineal de 6 o más carbonos. La presente invención proporciona además un método para tratar individuos que tienen enfermedad de Gaucher administrando el derivado de HP novedoso como "chaperonas específicas de sitio activo" para la glucocerebrosidasa mutante asociada a la enfermedad.

15 **Antecedentes de la invención**Plegamiento de proteínas

20 Las proteínas se sintetizan en el citoplasma, y las proteínas recientemente sintetizadas son secretadas en la luz del retículo endoplásmico (RE) en un estado ampliamente desplegado. En general, el plegamiento de proteínas está gobernado por el principio del autoensamblaje. Los polipéptidos recientemente sintetizados se pliegan en su conformación nativa basándose en sus secuencias de aminoácidos (Anfinsen y col., *Adv. Protein Chem.* 1975; 29:205-300). *In vivo*, el plegamiento de proteínas es complicado, debido a que la combinación de temperatura ambiente y alta concentración de proteína estimula el proceso de agregación, en el que los aminoácidos normalmente enterrados en el núcleo hidrófobo interactúan con sus vecinos no específicamente. Para evitar este problema, el plegamiento de proteínas se facilita normalmente por un grupo especial de proteínas llamadas chaperonas moleculares que previenen la agregación de cadenas de polipéptidos nacientes, y se unen a la proteína sin plegar de forma que la proteína se repliegue en la conformación nativa (Hartl, *Nature* 1996; 381:571-580).

30 Las chaperonas moleculares están presentes en prácticamente todos los tipos de células y en casi todos los compartimentos celulares. Algunas participan en el transporte de proteínas y permiten que las células sobrevivan bajo estrés tal como choque térmico y privación de glucosa. Entre las chaperonas moleculares (Gething y col., *Nature* 1992; 355:33-45; Caplan, *Trends Cell. Biol.* 1999; 9:262-268; Lin y col., *Mol. Biol. Cell.* 1993; 4:109-1119; Bergeron y col., *Trends Biochem. Sci.* 1994; 19:124-128), la Bip (proteína de unión a cadenas pesadas de inmunoglobulina, Grp78) es la chaperona mejor caracterizada del RE (Haas, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991; 167:71-82). Al igual que otras chaperonas moleculares, la Bip interactúa con muchas proteínas secretoras y de membrana dentro del RE a lo largo de su maduración, aunque la interacción es normalmente débil y de vida corta cuando el plegamiento avanza suavemente. Una vez se logra la conformación de proteína nativa, la chaperona molecular ya no interactúa con la proteína. La unión de Bip a una proteína que fracasa al plegarse, ensamblarse o glicosilarse adecuadamente se vuelve estable, y normalmente va seguida de la degradación de la proteína por la degradación asociada al RE. Este proceso sirve de sistema de "control de calidad" en el RE, asegurando que sólo aquellas proteínas adecuadamente plegadas y ensambladas sean transportadas fuera del RE para la posterior maduración, y proteínas inadecuadamente plegadas sean retenidas para la posterior degradación (Hurtley y col., *Annu. Rev. Cell. Biol.* 1989; 5:277-307).

50 Ciertas mutaciones antisentido producen sustituciones de aminoácidos que alteran el plegamiento nativo y apropiado de la proteína. Para corregir estos plegamientos inadecuados, investigaciones han intentado usar diversas moléculas como chaperonas artificiales. Se ha mostrado que altas concentraciones de glicerol, sulfóxido de dimetilo, N-óxido de trimetilamina o agua deuterada estabilizan la proteína mutante y aumentan el tráfico intracelular de proteína mutante en varias enfermedades (Brown y col., *Cell Stress Chaperones* 1996; 1:117-125; Burrows y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000; 97:1796-801). Estos compuestos se consideran chaperonas químicas no específicas que mejoran el plegamiento general de las proteínas, aunque el mecanismo de la función es todavía desconocido. La alta dosificación de esta clase de compuestos requerida para la eficacia hace que sean difíciles o inapropiados de usar clínicamente, aunque sean útiles para el examen bioquímico del defecto de plegamiento de una proteína intracelularmente. También carecen de especificidad.

Chaperonas específicas de sitio activo para enzimas

60 Las patentes de EE.UU. números 6.274.597 y 6.774.135 en copropiedad desvelan una novedosa estrategia terapéutica para la enfermedad de Fabry, un trastorno por almacenamiento lisosómico (LSD) producido por una deficiencia en la actividad de la α -galactosidasa lisosómica A (α -Gal A). La deficiencia de α -Gal A frecuentemente resulta de mutaciones en el gen que codifica proteínas mutantes que producen defectos de plegamiento. Se descubrió que la administración de 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), un potente inhibidor competitivo de α -Gal A, aumentó eficazmente la estabilidad *in vitro* de una α -Gal A mutante (R301Q) a pH neutro. Estos resultados también se observaron en linfoblastos establecidos de pacientes con Fabry con las mutaciones R301Q o Q279E.

Sorprendentemente, el cultivo de las células con DGJ a concentraciones inferiores a las inhibitoras produjo un aumento sustancial de la actividad enzimática residual. Además, la administración por vía oral de DGJ a ratones transgénicos que expresan en exceso una α -Gal A mutante (R301Q) elevó sustancialmente la actividad enzimática en órganos principales (Fan y col., *Nat. Med.* 1999; 5:112-115).

5 El principio de esta estrategia es del siguiente modo. Como parece que la enzima mutante se pliega inadecuadamente en el RE cuando el pH es neutro, como se ha demostrado por su inestabilidad a pH 7,0 *in vitro* (Ishii y col., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1993; 197:1585-1589), la enzima se retardaría en la vía de transporte normal del RE al aparato de Golgi y se sometería a degradación rápida. Si una enzima mutante pudiera transportarse eficientemente a los lisosomas, podría retener propiedades cinéticas normales o casi normales y seguiría siendo activa, debido a que la enzima mutante es suficientemente estable por debajo de pH 5,0. Por tanto, el objetivo era inducir que la enzima mutante ajustara la conformación apropiada en el RE. En particular, un compuesto que puede inducir una conformación molecular estable de la enzima podría servir de "chaperona específica de sitio activo" (ASSC) o "chaperona farmacológica" para estabilizar la enzima mutante en una conformación apropiada para el transporte a los lisosomas. En el caso de enzimas, se descubrió inesperadamente que un compuesto tal era un inhibidor competitivo de la enzima. Se sabe que los inhibidores competitivos de una enzima ocupan el sitio catalítico de la enzima apropiadamente plegada, produciendo la estabilización de su correcta conformación *in vitro*. Se encontró que también sirven de ASSC o chaperonas farmacológicas para inducir el plegamiento apropiado de la enzima *in vivo*, rescatándose así la enzima mutante del sistema de control de calidad del RE.

Las patentes de EE.UU. números 6.583.158, 6.589.964, 6.599.919 en copropiedad y la solicitud de EE.UU. nº de serie 10/304.395 a Fan y col. ejemplifican la estrategia de ASSC con numerosas otras enfermedades por almacenamiento lisosómico que incluyen enfermedad de Gaucher. Estos hallazgos demuestran que esta estrategia terapéutica de uso de potentes inhibidores competitivos como ASSC para aumentar la actividad enzimática residual en las células del paciente no se limita a enfermedad de Fabry, y puede aplicarse a enfermedades de deficiencia de enzimas de este tipo, y particularmente a trastornos por almacenamiento lisosómico. En general, ASSC eficaces de enzimas específicas asociadas a enfermedades particulares son potentes inhibidores competitivos de la enzima. Inesperadamente, un inhibidor más potente de la enzima actúa de mejor ASSC para la enzima mutante (Fan, *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:355-60).

Paulsen y col.; Liebigs Ann. Chem. (1990), 953-963, desvelan compuestos de hidroxipiperidina como inhibidores de α -L-fucosidasa.

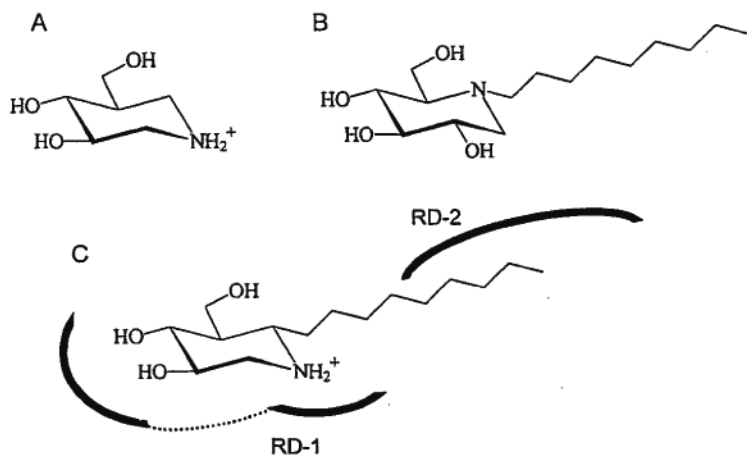
35 Potentes inhibidores de β -glucocerebrosidasa

La β -glucocerebrosidasa (GCasa, o β -glucosidasa ácida) es una hidrolasa lisosómica que cataliza la escisión hidrolítica de glucosa a partir de glucosilceramida (Brady y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71. 1965; 18:221-225). La deficiencia de la actividad enzimática produce acumulación progresiva de glucosilceramida, un producto intermedio normal en el catabolismo de globósido y gangliósidos, en lisosomas de macrófagos, conduciendo a enfermedad de Gaucher, el trastorno por almacenamiento lisosómico más común (Beutler y col., en *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, 2001, 3635-3668).

Detalles referentes a la enfermedad y el tratamiento terapéutico se describirán en este documento más adelante. Sawkar y col. han informado que la adición de un inhibidor de GCasa a un medio de cultivo de fibroblastos conduce a un aumento de 2 veces en la actividad de la GCasa N370S, que indica que un potente inhibidor de GCasa puede ser de interés terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, aunque el inhibidor particular no fue suficiente como agente terapéutico debido a la alta citotoxicidad (Sawkar A. R. y col., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99 (24):15428-33). Por tanto, se ha hecho un esfuerzo por diseñar y sintetizar potentes inhibidores para GCasa.

Se cree que el mecanismo catalítico de las β -glucosidasas avanza por un producto intermedio de enzima de glicosilo covalente y la carga positiva generada en la posición anomérica (Ichikawa y col., *J. Am. Chem. Soc.* 1998; 120:3007-3018; Heightman y col., 1999; *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999; 38:750-770). Ichikawa y col. han diseñado una clase de potentes inhibidores para β -glucosidasas, 1-N-iminoazúcares en los que un átomo de nitrógeno está en la posición anomérica de un monosacárido (estructura 1A, isofagomina o hidroxipiperidina). En un estudio preliminar se ha demostrado que el 1-N-iminoazúcar de tipo D-glucosa (isofagomina, o hidroxipiperidina 1) es un potente inhibidor de GCasa (patente de EE.UU. 6.583.158 a Fan y col.). Los derivados de N-alquilo de 1-desoxinojirimicina (DNJ) también son potentes inhibidores de GCasa, particularmente aquellos que tienen grupo alquilo más largo (cadena de alquilo superior a C6), aunque la propia DNJ y aquellas N-alquil-DNJ con cadenas más cortas no son inhibitoras (estructura 1B, N-nonil-1-desoxinojirimicina) (patente de EE.UU. 6.583.158). Sin embargo, estos inhibidores no son ni suficientemente específicos ni suficientemente potentes hacia la GCasa y no son adecuados para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Basándose en estos hallazgos, se comprendió que la GCasa podía contener dos sitios de unión a sustrato en el dominio catalítico: uno que reconoce el residuo glicosilo; el otro que reconoce el resto ceramida (estructura 1C, 6-C-nonil-hidroxipiperidina, RD-1: dominio de reconocimiento 1; RD-2: dominio de reconocimiento 2). La determinación de la estructura cristalina de GCasa reveló un anillo de residuos hidrófobos que

rodeaba la entrada al sitio de unión a monosacárido (Dvir y col., *EMBO reports* 2003; 4:1-6), sugiriendo que se requiere un resto hidrófobo unido a un residuo de azúcar con una cadena de alquilo larga para la interacción con los residuos de aminoácidos hidrófobos.

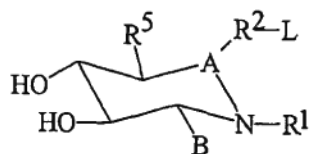


5 Estructura 1. Potentes inhibidores de GCasa humana. 1 (A) Isogomina o hidroxipiperidina; 1 (B) N-nonyl-1-desoxinojirimicina; 1 (C) 6-C-nonyl-hidroxipiperidina, RD-1: dominio de reconocimiento 1; RD-2: dominio de reconocimiento 2.

10 De este modo, sigue existiendo la necesidad en la materia de diseñar o identificar inhibidores competitivos específicos de enzimas, y de evaluarlos para su capacidad para actuar de chaperonas para las enzimas mutantes correspondientes que están asociadas a numerosos LSD, particularmente inhibidores de GCasa asociados a enfermedad de Gaucher, y otros trastornos resultantes de proteínas inadecuadamente plegadas.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



20 en la que A, B, R¹, R², R⁵ y L con como se describen en la reivindicación 1. La presente invención también proporciona sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I.

25 La presente invención proporciona además un compuesto de fórmula I para su uso en un método de potenciación en una célula de mamífero de la actividad de GCasa, poniendo en contacto la célula con un compuesto de fórmula I en una cantidad eficaz para potenciar la actividad de GCasa, es decir, una cantidad no inhibitora.

30 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 También se proporciona un compuesto de fórmula I para su uso en un método para tratar enfermedad de Gaucher administrando a un individuo en necesidad de tal tratamiento una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I en una cantidad eficaz para potenciar la actividad de GCasa.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Estructuras de compuestos específicos de GCasa. (a) DNJ, 1-desoxinojirimicina; (b) IFG, isogomina; (c) N-nonyl-DNJ, N-nonyl-1-desoxinojirimicina; (d) 6-nonyl-HP, o 6-nonyl-isogomina.

Figura 2. Síntesis de derivados de 6-alquilo de HP. La L-xilosa se convierte en α -bencil-xilósido (1) por agitación con alcohol bencilico a 50°C en presencia de ácido y luego cristalizando el alfa-anómero en éter *terc*-butilmetílico a 0°C. El derivado de 2,3-O-isopropilideno de bencil- α -xilósido se forma por trans-acetalación catalizada por ácido de 2-

metoxipropeno en THF. La conversión del grupo 4-hidroxi libre restante en el sulfonato de trifluorometano correspondiente del acetónido de bencil- α -xilósido protegido (2) da el compuesto 3 en rendimientos sintéticamente útiles. El posterior tratamiento con cianuro de potasio y 18-corona-6 en DMF anhidra conduce al nitrilo (4). La adición de compuestos organometálicos tales como reactivos de Grignard al nitrilo, seguido de reducción de la imina intermedia, proporciona aminas (5-10). La hidrogenolisis del compuesto 5-10 en presencia de Pd (OH)₂/C, seguido de desprotección del grupo isopropilideno, da los derivados de 6-alkuil-HP respectivos.

Figura 3. Síntesis alternativa de 6-derivados de HP. El compuesto 4 se prepara como se ha descrito anteriormente. La adición de reactivo de Grignard (bromuro de alilmagnesio) al nitrilo (4), seguido de reducción con NaBH₄ (alternativamente puede usarse 1), da el compuesto de amina (17). El compuesto 17 se protege con cloroformiato de bencilo, seguido de ozonólisis del alqueno terminal, condensación de aldehído con etilenglicol e hidrogenación para proporcionar el compuesto 18. La desprotección selectiva del grupo isopropilideno con disolución acuosa de HOAc da el compuesto 19. El tratamiento del compuesto 19 con NaH y luego bromuro de *p*-metoxibencilo produce el compuesto *N,O*-protegido, seguido de hidrólisis con ácido trifluoroacético genera el aldehído (20). El compuesto 20 puede convertirse en el compuesto 21 por uno de los siguientes métodos: 1) reacción del compuesto 20 con amina bajo condición reductora; 2) reacción del compuesto 20 con reactivos de Wittig; o 3) reducción del compuesto 20 con reactivos reductores, seguido de tratamiento con SOCl₂ y reactivos nucleófilos. La desprotección del compuesto 21 da el compuesto 22.

Figura 4. Actividad inhibidora de 6-nonil-HP frente a GCasa. La actividad enzimática se determinó como se describe en los ejemplos más adelante. La actividad enzimática relativa se calculó como un porcentaje con respecto a la de las reacciones sin inhibidores. Se calculó CI₅₀ usando la representación sigmoide Prism. ▲ = IFG; ○ = N-nonil-DNJ; y ● = 6-nonil-HP.

Figura 5. Rescate de chaperonas de actividad de GCasa residual en fibroblastos de Gaucher. Los fibroblastos establecidos a partir de pacientes con Gaucher con la mutación N370S/N370S se trataron con los compuestos de la presente invención y la actividad de GCasa se determinó como se describe en los ejemplos. Las concentraciones de proteína en los lisados celulares también se determinaron usando el kit de ensayo de proteínas micro BCA de Pierce. ◆ 6-nonil-HP; ■ = isofagomina (IFG).

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona el diseño y la síntesis de una clase novedosa de inhibidores competitivos potentes de GCasa, derivados de 6-alkuil-hidroxi piperidina (HP) de glucosa, y demuestra su capacidad para aumentar la actividad enzimática residual en fibroblastos de pacientes con Gaucher con la mutación N370S.

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es un trastorno por almacenamiento lisosómico resultante de la actividad deficiente de la β -glucocerebrosidasa (denominada en lo sucesivo GCasa) y la acumulación de su sustrato sin degradar, la glucosilceramida (glucocerebrósido), un producto intermedio normal en el catabolismo de globósido y gangliósidos (Beutler y col., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8^a ed. 2001; Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D., ed.) pág. 3635-3668, McGraw-Hill, Nueva York). En algunos casos, la actividad deficiente de la GCasa se produce por mutaciones en el gen GCasa, produciendo plegamiento inadecuado y posterior degradación del producto génico en el RE. Basándose en el grado y la edad de aparición de la participación neurológica primaria, generalmente se distinguen tres fenotipos clínicos: (i) la variante no neuronopática (tipo 1, o forma adulta); (ii) la variante neuronopática aguda (tipo 2, o forma infantil); y (iii) la variante neuronopática subaguda (tipo 3 o forma juvenil). La enfermedad de Gaucher de tipo 1 caracterizada por hepatoesplenomegalia, hiperesplenismo secundario y participación esquelética es la forma más prevalente y la gravedad y la evolución clínica de esta variante es particularmente heterogénea, oscilando de aparición temprana a manifestaciones no clínicas (Grabowski, *Gaucher Disease: Enzymology, genetics, and treatment*. 1993, Plenum Press, Nueva York). A diferencia, pacientes con las formas neurológicas (tipos 2 y 3) son raros. La correlación de gravedad clínica y genotipos indica que mutaciones leves que presentan actividad enzimática residual producen frecuentemente enfermedad de tipo 1, mientras que mutaciones graves o nulas producen enfermedad de tipo 3 o tipo 2.

Se han encontrado pacientes con Gaucher de todas las regiones del mundo. Particularmente, la enfermedad es más común en la población judía de Ashkenazi, en la que la frecuencia de alelos causantes de la enfermedad de Gaucher es aproximadamente 0,0343 (Beutler y col., arriba). La incidencia se estima como 1:4.000 (Mathoth y col., *Am J Med Genet*. 1987; 27:561-5). Aproximadamente el 97% de las mutaciones de GCasa en judíos de Ashkenazi y el 75% de las mutaciones de GCasa en poblaciones no judías pueden detectarse cribando las cinco mutaciones más comunes. De muchas mutaciones que se han documentado ahora, la mutación N370S que produce exclusivamente la enfermedad de Gaucher de tipo 1 es la mutación más común y se informa que está presente en aproximadamente el 6% de la población judía de Ashkenazi (Beutler y col., *Blood* 1992; 79:1662-6). La mutación L444P que produce enfermedad de tipo 3 entre homocigotos existe a niveles polimórficos en el norte de Suecia (Dahl y col., *Am J Hum Genet*. 1990; 47:275-8). Una inserción de una G en la posición de nucleótido 84 del ADNc es la segunda mutación judía común. Se encuentra en aproximadamente el 0,6% de la población judía. Esta mutación produce un

desplazamiento del marco incluso antes del extremo N de la proteína madura, y un alelo que lleva esta mutación no produce actividad enzimática y produce enfermedad de tipo 2 (Beutler y col., *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:10544-7).

5 El gen que codifica GCasa se ha mapeado para el cromosoma 1 en q21 (Ginns y col., *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:7101-5). El gen para GCasa tiene aproximadamente 7 kb de longitud y contiene 11 exones. El ADNc de GCasa tiene aproximadamente 2 kb de longitud, y puede producir enzima activa a partir de la traducción *in vivo* del ADNc en una variedad de células eucariotas, que incluyen células COS y células de insecto infectadas con baculovirus (Grabowski y col., *Enzyme* 1989; 41:131-42). La GCasa humana es una glicoproteína homomérica. El polipéptido
10 maduro tiene 497 aminoácidos con una masa molecular calculada de 55,575. La enzima glicosilada de placenta tiene un peso molecular de aproximadamente 65 kD. La saposina C activa GCasa *in vitro* en presencia de fosfolípidos negativamente cargados.

15 Tratamiento actual: La terapia sustitutiva de enzimas está actualmente disponible para pacientes con Gaucher de tipo 1. Se ha mostrado que la infusión intravenosa de GCasa placentaria humana o GCasa recombinante (modificada para exponer residuos de manosa cubiertos) es eficaz en la inversión de muchas manifestaciones clínicas características en pacientes con Gaucher de tipo 1 (Kay y col., *Trans Assoc. Am. Phys.* 1991; 104:258-264; y Grabowski y col., *Pediatr. Res.* 1993; 33:139A). Para los pacientes de tipo 2 o tipo 3 que tienen participación neurológica, la terapia sustitutiva de enzimas (TSE) es menos eficaz, ya que las enzimas no atraviesan la barrera
20 hematoencefálica después de la infusión intravenosa.

Otro enfoque al tratamiento de la enfermedad de Gaucher es el uso de inhibidores de GCasa para reducir los niveles de glucosilceramida y glicolípidos (Inokuchi y col., *Lipid Res.* 1987; 28:565-71; Platt y col., *Biochem. Pharmacol.* 1998; 56:421-430; y Radin y col., *Glycoconjugate J.* 1996; 13:153-157). Esto se conoce como terapia de reducción
25 del sustrato (TRS). Se observó una modesta mejora de síntomas clínicos en pacientes después del tratamiento de un año (Cox y col., *Lancet* 2000; 355:1481-1485) con derivados de glucosa de moléculas pequeñas. La TRS, que usa inhibidores de moléculas pequeñas para prevenir la síntesis de sustratos patogénicos, está en evaluación para varios LSD, y N-butil-1-desoxinojirimicina (NB-DNJ) tiene aprobación de comercialización condicional en Europa y los EE.UU. para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (Butters y col., *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358:927-945). Una ventaja de ésta con respecto a TSE es que los inhibidores de moléculas pequeñas pueden
30 atravesar posiblemente la barrera hematoencefálica y prevenir la acumulación de sustrato en el cerebro. El efecto adverso más frecuente fue diarrea, que se produjo en el 79% de los pacientes poco después del inicio del tratamiento. No se sabe si la reducción a largo plazo de glicolípidos tendrá otros efectos adversos o no.

35 Como se ha discutido anteriormente, otro enfoque de moléculas pequeñas recientemente desarrollado se conoce como terapia de chaperonas específicas de sitio activo (ASSC) (Fan y col., *Nat Med.* 1999; 5:112-115; Fan, *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:355-360). La ASSC usa bajas concentraciones de potentes inhibidores de enzima, que son específicos para la enzima mutante (o natural), para potenciar el plegamiento y la actividad de las proteínas mutantes en pacientes con LSD. Como los inhibidores del sitio activo usados en ASSC son específicos para la
40 enzima causante de enfermedad, la terapia elige como diana una única proteína y una vía metabólica particular, a diferencia de TRS que inhibe una vía sintética entera. Al igual que TRS, los inhibidores de moléculas pequeñas para ASSC tienen la posibilidad de cruzar la barrera hematoencefálica y, por tanto, podrían usarse para tratar formas neurológicas de LSD.

45 Diseño y síntesis de potentes inhibidores para GCasa y ASSC eficaces para la enfermedad de Gaucher

Un inhibidor más potente de una enzima actúa de una mejor ASSC para la enzima mutante (Fan, *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:355-60). Por consiguiente, la presente invención diseñó y sintetizó una clase novedosa de potentes
50 inhibidores para GCasa, y usó estos inhibidores como ASSC para el potenciamiento de actividad enzimática residual en células derivadas de pacientes con Gaucher.

Fan y col. también han determinado que la terapia con ASSC puede usarse para tratar enfermedad de Gaucher usando derivados de glucoimidazol (GIZ) y polihidroxiciclohexenilamina (PHCA), que pueden administrarse a
55 individuos que tienen enfermedad de Gaucher como "chaperonas específicas de sitio activo" para la glucocerebrosidasa mutante asociada a la enfermedad (solicitud de patente de EE.UU. titulada Derivados de glucoimidazol y de polihidroxiciclohexenilamina para tratar enfermedad de Gaucher presentada el 12 de noviembre de 2004).

Además de potenciar la actividad de las enzimas mutantes (o naturales) asociadas a LSD, también se ha
60 demostrado que las ASSC potencian la actividad de la enzima natural correspondiente (véase la patente de EE.UU. 6.589.964 a Fan y col.), sugiriendo así su uso en co-terapia para la terapia sustitutiva de enzima y en terapia génica en pacientes con LSD.

La presente divulgación también contempla la inhibición de β -glucocerebrosidasa (GCasa). Tal inhibición es útil, por
65 ejemplo, para estudiar los efectos de una falta de β -glucocerebrosidasa en modelos animales. Como la delección elegida como diana de β -glucocerebrosidasa en mamíferos es letal, los ratones de genes inactivados no pueden

generarse para los fines de evaluar el estado de la enfermedad de Gaucher. La presente invención contempla administrar una cantidad inhibitoria de los inhibidores de β -glucosidasa a animales para imitar el fenotipo de la enfermedad de Gaucher.

5 Definiciones

Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen las siguientes definiciones.

QUÍMICAS

10 El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo C_1 - C_{20} lineal o ramificado que consiste únicamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, y que está unido al resto de la molécula por 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 este documento son preferentemente alquilos C_1 - C_8 .

15 El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarburo C_2 - C_{20} alifático que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que puede ser una cadena lineal o ramificada, por ejemplo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), *iso*-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo.

20 El término "alquino" se refiere a un radical de hidrocarburo C_2 - C_{20} de cadena lineal o ramificada que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono, por ejemplo, etinilo, propinilo, butinilo.

25 El término "cicloalquilo" denota un sistema de anillo de hidrocarburo mono o multicíclico insaturado no aromático tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo. Ejemplos de grupos cicloalquilo multicíclicos incluyen grupos perhidronaftilo, adamantilo y norbornilo que unen por puentes un grupo cíclico o grupos espirobicíclicos, por ejemplo, espiro(4,4)non-2-ilo.

30 El término "cicloalqueno" se refiere a radicales que contienen anillos cíclicos que contienen 3 a aproximadamente 14 átomos de carbono, sistema tal como ciclopropenilo, ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo.

El término "cicloalquilalquilo" se refiere a un cicloalquilo como se define anteriormente directamente unido a un grupo alquilo como se define anteriormente, que produce la creación de una estructura estable tal como ciclopropilmetilo, ciclobutilmetilo, ciclopentilmetilo.

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

40 El término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo como se define anteriormente directamente unido a un grupo alquilo como se define anteriormente, por ejemplo, $-CH_2C_6H_5$ y $-C_2H_4C_6H_5$.

45 El término "anillo heterocíclico" se refiere a un radical de anillo estable de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. Para los fines de la presente invención, el radical de anillo heterocíclico puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o tricíclico que puede incluir sistemas de anillo fusionados, unidos por puentes o espiro, y los átomos de nitrógeno, fósforo, carbono, oxígeno o azufre en el radical de anillo heterocíclico pueden estar opcionalmente oxidados a diversos estados de oxidación. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical de anillo puede estar parcialmente o completamente saturado (es decir, heteroaromático o heteroarilaromático). Ejemplos de tales radicales de anillo heterocíclico incluyen, pero no se limitan a, azetidino, acridino, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofuranilo, carbazolilo, cinnolino, dioxolanilo, indolizino, naftiridino, perhidroazepino, fenazino, fenotiazino, fenoxazino, ftalazino, piridilo, pteridino, purino, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazoilo, imidazolilo, tetrahidroisoquinolilo, piperidino, piperazino, 2-oxopiperazino, 2-oxopiperidino, 2-oxopirrolidino, 2-oxoazepino, azepino, pirrolilo, 4-piperidono, pirrolidino, pirazino, pirimidino, piridazino, oxazolilo, oxazolinilo, oxazolidino, triazolilo, indanilo, isoxazolilo, isoxazolidino, morfolino, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidino, isotiazolilo, quinuclidino, isotiazolidino, indolilo, isoindolilo, indolino, isoindolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, decahidroisoquinolilo, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopirano, benzotiazolilo, benzooxazolilo, furilo, tetrahidrofurilo, tetrahidropirano, tienilo, benzotienilo, tiamorfolino, sulfóxido de tiamorfolino, tiamorfolinilsulfona, dioxafosfolano, oxadiazolilo, cromo, isocromo.

60 El radical de anillo heterocíclico puede unirse a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que produzca la creación de una estructura estable.

65 El término "heteroarilalquilo" se refiere a radical de anillo heteroarilo como se define anteriormente directamente unido al grupo alquilo. El radical heteroarilalquilo puede unirse a la estructura principal en cualquier átomo de carbono del grupo alquilo que produzca la creación de una estructura estable.

El término “heterociclilo” se refiere a un radical de anillo heterocíclico como se define anteriormente. El radical de anillo heterocíclico puede unirse a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que produzca la creación de una estructura estable.

- 5 El término “heterociclilalquilo” se refiere a un radical de anillo heterocíclico como se define anteriormente directamente unido al grupo alquilo. El radical heterociclilalquilo puede unirse a la estructura principal en el átomo de carbono en el grupo alquilo que produce la creación de una estructura estable.

- 10 Los sustituyentes en 'alquilo sustituido', 'alqueno sustituido', 'alquino sustituido', 'cicloalquilo sustituido', 'cicloalquilalquilo sustituido', 'cicloalqueno sustituido', 'arilalquilo sustituido', 'arilo sustituido', 'anillo heterocíclico sustituido', 'anillo de heteroarilo sustituido', 'heteroarilalquilo sustituido' o 'anillo de heterociclilalquilo sustituido' pueden ser iguales o diferentes con uno o más seleccionados de los grupos hidrógeno, hidroxilo, halógeno, carboxilo, ciano, amino, nitro, oxo (=O), tio (=S), u opcionalmente grupos sustituidos seleccionados de alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, anillo heterocíclico, -COOR^x, -C(O)R^x, -C(S)R^x, -C(O)NR^xR^y, -C(O)ONR^xR^y, -NR^xCONR^yR^z, -N(R^x)SOR^y, -N(R^x)SO₂R^y, -(=N-N(R^x)R^y), -NR^xC(O)OR^y, -NR^xR^y, -NR^xC(O)R^y, -NR^xC(S)R^y, -NR^xC(S)NR^yR^z, -SONR^xR^y, -SO₂NR^xR^y, OR^x, -OR^xC(O)NR^yR^z, -OR^xC(O)OR^y, -OC(O)R^x, -OC(O)NR^xR^y, -R^xNR^yR^z, -R^xR^yR^z, -R^xCF₃, -R^xNR^yC(O)R^z, -R^xOR^y, -R^xC(O)OR^y, -R^xC(O)NR^yR^z, -R^xC(O)R^y, -R^xOC(O)R^y, -SR^x, -SOR^x, -SO₂R^x, -ONO₂, en las que R^x, R^y y R^z en cada uno de los grupos anteriores puede ser átomo de hidrógeno, alquilo sustituido o sin sustituir, haloalquilo, arilalquilo sustituido o sin sustituir, arilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir, cicloalquilalquilo sustituido o sin sustituir, anillo heterocíclico sustituido o sin sustituir, heterociclilalquilo sustituido o sin sustituir, heteroarilo sustituido o sin sustituir o heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.

- 25 El término “lipófilo” se refiere a un residuo funcional que puede interactuar con residuos de aminoácidos hidrófobos. Ejemplos de grupos lipófilos incluyen, pero no se limitan a, alquilo C₁-C₁₂ sustituido o sin sustituir, alqueno sustituido o sin sustituir, alquino sustituido o sin sustituir, cicloalquilo sustituido o sin sustituir; cicloalqueno sustituido o sin sustituir; arilo sustituido o sin sustituir; arilalquilo sustituido o sin sustituir; heteroarilo sustituido o sin sustituir; heterocíclico sustituido o sin sustituir; heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir; y heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.

- 30 El término “halógeno” se refiere a radicales de flúor, cloro, bromo y yodo.

- 35 El término “grupo protector hidrogenable” se refiere a grupos protectores que pueden eliminarse por condiciones de hidrogenación, por ejemplo, bencilo y 4-metoxibencilo.

- El término “ácido” se refiere a ácido de Lewis tal como ácido sulfúrico, clorhidrato o clorhidrato generado haciendo reaccionar cloruro de ácido con alcohol.

- 40 El término “ácido orgánico” se refiere a ácido de Lewis orgánico tal como ácido *p*-toluenosulfónico, ácido canforsulfónico.

El término “éter corona” se refiere a compuestos de anillos grandes que contienen varios átomos de oxígeno en un patrón regular tal como 12-corona-4, 15-corona-5, 18-corona-6, dicitlohexano-18-corona-6.

- 45 El término “reactivo organometálico” se refiere a un compuesto que contiene un enlace entre un átomo de carbono y de metal tal como organolitio, organocinc, organocobre, reactivos de Grignard.

- 50 El término “condiciones de hidrogenolisis” se refiere a hidrogenolisis catalítica usando catalizador tal como, pero no se limita a, Pd(OH)₂/C, Pd/C, Pt o níquel Raney en presencia de una fuente de hidrógeno.

El término “hidrogenación” se refiere a una reacción química en la que el enlace insaturado entre átomos de carbono se reduce uniendo un átomo de hidrógeno a cada uno usando catalizador tal como, pero no se limita a, Pd(OH)₂/C, Pd/C, Pt o níquel Raney en presencia de una fuente de hidrógeno.

- 55 El término “agente reductor” se refiere a un agente que convierte un grupo funcional en una molécula de un estado de oxidación a uno menor tal como LiAlH₄, NaBH₄, Zn(BH₄)₂, *i*-Bu₂AlH y Li-s-Bu₃H.

- 60 El término “grupo saliente” se refiere a un grupo que puede estar sustituido por reactivo nucleófilo tal como TsO-, TfO-, MsO-, Cl, Br, I.

El término “grupo protector de N” se refiere a grupos que protegen temporalmente grupo amina o imina para evitar más sitios de reacción tales como, pero no se limitan a, 4-metoxibencilo, bencilo, *tert*-butiloxicarbonilo, benciloxicarbonilo.

- 65 El término “grupo protector de O” se refiere a grupos que protegen temporalmente un hidroxilo para evitar más sitios de reacción tales como, pero no se limitan a, 4-metoxibencilo, bencilo y trimetilsililo.

El término “base” se refiere a base de Lewis orgánica tal como piridina, trietilamina, diisopropilamina.

5 El término “resto nucleófilo y reactivo nucleófilo” se refiere a un reactivo que forma un enlace con su componente de reacción (el electrófilo) donando ambos electrones de enlace tales como sal metálica de un alcohol, tiol, o 1-alquino.

El término “un ligador flexible corto” se refiere a ligadores con longitud lineal de aproximadamente 6 Å a aproximadamente 12 Å, preferentemente aproximadamente 9 Å.

10 BIOLÓGICAS

15 Como se usa en este documento, el término “chaperona específica de sitio activo” (ASSC) se refiere a cualquier molécula que incluye, pero no se limita a, una proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, que interactúa específicamente reversiblemente con un sitio activo de una proteína y potencia la formación de una conformación molecular estable. Como se usa en este documento, “ASSC” no incluye chaperonas generales endógenas presentes en el RE de células tales como Bip, calnexina o calreticulina, o chaperonas químicas no específicas generales tales como agua deuterada, DMSO o TMAO.

20 Como se usa en este documento, el término “sitio activo” se refiere a la región de una proteína que se une a sustrato o componente de unión y contribuye a los residuos de aminoácidos que directamente participan en la formación y la rotura de enlaces químicos. Según la presente invención, el sitio activo engloba el dominio catalítico de la GCasa.

25 El término “actividad natural” se refiere a la función fisiológica normal de una GCasa en una célula. Tal funcionalidad puede probarse mediante cualquier medio conocido por establecer funcionalidad de una proteína, específicamente una enzima. Ciertas pruebas pueden evaluar atributos de una proteína que pueden o pueden no corresponderse con su función *in vivo* real, pero sin embargo son sustitutos de agregados de la funcionalidad de proteína, y el comportamiento natural en tales pruebas es una consecuencia aceptable de las técnicas de rescate del plegamiento de proteínas de la invención. Una actividad tal según la invención es transporte apropiado del retículo endoplásmico al destino particular de GCasa en la célula, es decir, el lisosoma.

30 El término “proteína de GCasa funcional” se refiere a una proteína de GCasa que tiene la capacidad de plegarse en una conformación apropiada, alcanzar su localización nativa en la célula y tener actividad catabólica hacia glucocerebrosidasa y otros sustratos de lípidos. Una proteína de GCasa funcional incluye proteínas de GCasa naturales (véanse las definiciones más adelante), por ejemplo, como se representa en SEQ ID NO: 2.

35 Como se usa en este documento, el término “GCasa mutante” se refiere a una GCasa traducida de un gen que contiene una o más mutaciones genéticas que producen una secuencia de proteínas alterada que no alcanza sus conformaciones nativas en las condiciones normalmente presentes en el RE. El fracaso en lograr esta conformación hace que se degrade la GCasa, en vez de ser transportada por su vía normal en el sistema de transporte de proteínas, a su localización apropiada dentro de la célula.

Algunas realizaciones específicas de tales mutaciones de GCasa son la mutación N370S y la mutación L444P.

45 El término “potenciar la actividad” de GCasa significa estabilizar una conformación apropiada de una proteína de GCasa mutante en el RE de manera que se pliegue en una conformación apropiada, alcance su localización nativa en la célula y tenga actividad catabólica hacia cerebrósido, su sustrato lipídico. Este término también se refiere al aumento de la actividad natural de una proteína GCasa exógenamente administrada, es decir, aumentando la estabilidad y prolongando la semivida *in vivo* de GCasa natural, prolongando así su actividad.

50 El término “estabilizar una conformación apropiada” se refiere a la capacidad de un compuesto de la invención para inducir o estabilizar la conformación de una GCasa mutada, independientemente de si es en el RE u otros compartimentos celulares, que es funcionalmente idéntica a la conformación de la enzima natural. Por “funcionalmente idéntico”, la invención indica que puede haber variaciones menores en la conformación (de hecho, casi todas las proteínas presentan alguna flexibilidad conformacional en su estado fisiológico), pero esa flexibilidad conformacional no produce (1) agregación, (2) eliminación por la degradación asociada al retículo endoplásmico, (3) alteración de la función enzimática y/o (4) transporte inapropiado dentro de la célula. Este término también se refiere a la capacidad de un compuesto para estabilizar una conformación apropiada de GCasa natural *in vivo* tras la GCasa exógenamente añadida, o *in vitro* en una formulación de enzima.

60 Un “gen GCasa natural” se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que codifican una proteína de ASM que puede tener actividad biológica funcional *in vivo*. La secuencia de ácidos nucleicos de GCasa natural puede contener cambios de nucleótidos que se diferencian de la secuencia publicada conocida, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, en tanto que los cambios produzcan sustituciones de aminoácidos que tengan poco o ningún efecto sobre la actividad biológica. Como se usa en este documento, el término natural también puede incluir secuencias de ácidos nucleicos de GCasa manipuladas que codifican una proteína de GCasa que puede aumentar o potenciar la actividad con respecto a la proteína de GCasa endógena o nativa.

Una “proteína de GCasa natural” se refiere a cualquier proteína codificada por un gen natural que puede tener actividad biológica funcional cuando se expresa o se introduce *in vivo*.

5 BIOLOGÍA MOLECULAR

Según la presente invención pueden emplearse biología molecular convencional, microbiología y técnicas de ADN recombinante dentro de la habilidad de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (en este documento “Sambrook y col., 1989”); *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization*; B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. 1984); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1986); *Immobilized Cells And Enzymes*; IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

Como se usa en este documento, el término “aislado” significa que el material referenciado se ha eliminado del entorno en el que normalmente se encuentra. Por tanto, un material biológico aislado puede estar libre de componentes celulares, es decir, componentes de las células en los que el material se encuentra o se produce. En el caso de moléculas de ácidos nucleicos, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, un ARNm aislado, un ADNc o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se escinde preferentemente del cromosoma en el que puede encontrarse, y más preferentemente ya no está unido a regiones no codificantes no reguladoras, o a otros genes, localizados en la dirección 5' o en la dirección 3' del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En otra realización más, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Moléculas de ácidos nucleicos aisladas incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Por tanto, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede asociarse a otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los que está asociado en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. En una realización específica, una proteína de GCasa aislada es una proteína de GCasa recombinante expresada a partir de un vector de expresión. Un material aislado puede estar, pero no necesita estar, purificado.

El término “purificado” como se usa en este documento se refiere a material que ha sido aislado en condiciones que reducen o eliminan materiales no relacionados, es decir, contaminantes. Por ejemplo, una proteína de GCasa purificada está preferentemente sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que la GCasa está normalmente asociada en una célula. Como se usa en este documento, el término “sustancialmente libre” se usa funcionalmente en el contexto de pruebas analíticas del material. Preferentemente, ASM purificado sustancialmente libre de contaminantes tiene al menos el 50% de pureza; más preferentemente al menos el 90% de pureza, y más preferentemente todavía al menos el 99% de pureza. La pureza puede evaluarse por cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica.

El término “aproximadamente” debe generalmente significar un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Grados de error a modo de ejemplo típicos están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferentemente dentro del 5% de un valor dado o intervalo de valores. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, el término “aproximadamente” puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 10 ó 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas facilitadas en este documento son aproximadas, a menos que se declare lo contrario, que significa que el término “aproximadamente” puede ser deducido si no se establece expresamente.

El término “célula huésped” significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transforma, cultiva o usa o manipula de cualquier forma para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo, la expresión por la célula de un gen GCasa de mamífero mutante o funcional, que incluye una secuencia de ADN o ARN, o la enzima GCasa. Las células huésped pueden usarse adicionalmente para la evaluación preliminar del concepto de ASSC para otros ensayos. Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que ha experimentado una manipulación biológica molecular o ingeniería.

Un “gen” es una secuencia de nucleótidos que codifica un “producto génico”. Generalmente, un producto génico es una proteína. Sin embargo, un producto génico también puede ser otro tipo de molécula en una célula, tal como un ARN (por ejemplo, un ARNt o un ARNr). Para los fines de la presente invención, un producto génico también se refiere a una secuencia de ARNm que puede encontrarse en una célula. Como se usa en este documento, un gen se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican GCasa natural o mutante.

El término “expresar” y “expresión” significa permitir o hacer que se manifieste la información en un gen GCasa o secuencia de ADN, por ejemplo, produciendo ARN (tal como ARNr o ARNm) o una proteína de GCasa activando las

funciones celulares que participan en la transcripción y traducción de un gen GCasa correspondiente o secuencia de ADN, es decir, secuencias que codifican GCasa. Una secuencia de ADN de GCasa se expresa por una célula para formar un “producto de expresión” tal como un ARN de GCasa (por ejemplo, un ARNm o un ARNr) o una proteína de GCasa. También se puede decir que el propio producto de expresión, por ejemplo, el ARN o proteína de GCasa resultante, es “expresado” por la célula.

El término “transfección” significa la introducción de un ácido nucleico extraño en una célula. El término “transformación” también significa la introducción de un gen “extraño” (es decir, extrínseco o extracelular), secuencia de ADN o ARN en una célula huésped de manera que la célula huésped expresará el gen introducido o secuencia para producir una sustancia deseada, en la presente invención normalmente un ARN codificado por el gen o secuencia introducido, pero también una proteína o una enzima codificada por el gen o secuencia introducido. El gen o secuencia introducido también puede llamarse un gen o secuencia “clonado” o “extraño”, puede incluir secuencias reguladoras o de control (por ejemplo, de iniciación, terminación, promotora, señal, de secreción u otras secuencias usadas por un maquinaria genética de las células). El gen o secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias con función no conocida. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha “transformado” y es un “transformante” o un “clon”. El ADN o ARN introducido a una célula huésped puede proceder de cualquier fuente, que incluye células del mismo género o especie que la célula huésped o células de un género o especie diferente. Como se usa en este documento, la transfección o transformación incluirá introducción de secuencias que codifican GCasa funcional en individuos que tienen genes de GCasa endógenos mutados.

Los términos “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” significan el vehículo por el que una secuencia de ADN o ARN de GCasa (por ejemplo, un gen extraño) puede introducirse en una célula huésped de manera que transforme el huésped y promueva la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Vectores incluyen cualquier elemento genético tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que puede replicarse cuando se asocia a los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias de genes de GCasa entre células. Por tanto, el término incluye la clonación y expresión de vehículos, además de vectores víricos.

El término “sistema de expresión” significa una célula huésped y vector compatible bajo condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína de GCasa codificada por ADN extraño llevado por el vector e introducido a la célula huésped. Sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores de plásmido, células huésped de insecto tales como células Sf9, Hi5 o S2 y vectores y sistemas de expresión de baculovirus, y células huésped y vectores de mamífero.

El término “terapia génica” se refiere a un método de cambio de la expresión de un gen endógeno por administración exógena de un gen, es decir, un gen GCasa. Como se usa en este documento, terapia génica también se refiere a la sustitución de un gen GCasa defectuoso, o sustitución de un gen GCasa ausente, introduciendo un gen funcional correspondiente al gen GCasa defectuoso o ausente en células somáticas o citoblastos de un individuo en necesidad. La terapia génica puede llevarse a cabo por métodos “*ex vivo*” en los que citoblastos diferenciados o somáticos se sacan del cuerpo del individuo, seguido de la introducción de una copia normal del gen defectuoso en las células explantadas usando un vector vírico como vehículo de administración del gen. Además, la transferencia de genes directa *in vivo* es transferencia de genes en células en el individuo *in situ* usando una amplia gama de vectores víricos, liposomas, complejos de proteína-ADN o ADN desnudo con el fin de lograr un desenlace terapéutico.

El término “proteína recombinante” se refiere a una proteína de GCasa (producto génico) codificada por un gen GCasa terapéutico llevado sobre un vector. Generalmente, la célula que recibe el vector carecerá de expresión y/o actividad de cualquier proteína de GCasa endógena correspondiente a la proteína recombinante, o si hay expresión de una proteína de GCasa endógena tal, es de un mutante o a un nivel muy bajo. En una realización, la proteína recombinante se produce por una célula en cultivo de tejido para fines experimentales y terapéuticos. En otra realización, la proteína recombinante se produce *in vivo* a partir de células transformadas con vector, en la que el vector o las células que comprenden el vector se han administrado a un sujeto, es decir, terapia génica. La proteína de GCasa recombinante será probablemente indistinguible de la proteína natural en individuos normales, es decir, individuos que no son deficientes en la proteína o que no tienen enfermedad de Gaucher.

TERAPÉUTICAS Y ADMINISTRACIÓN

Un “sujeto” o “paciente” es un ser humano o un animal que ha desarrollado, o que probablemente va a desarrollar, enfermedad de Gaucher, más particularmente un mamífero, preferentemente un roedor o un primate, y lo más preferentemente un ser humano. En una realización, el paciente es un miembro de la población judía de Ashkenazi al que se le ha diagnosticado, o que se ha identificado, que tiene un riesgo elevado de desarrollar enfermedad de Gaucher debido a mutaciones heredadas en el gen GCasa. Sin embargo, el término “sujeto” engloba cualquiera en el mundo que tenga, o que genéticamente esté en riesgo de desarrollar, enfermedad de Gaucher.

El término “prevención” se refiere a la prevención de la aparición de la enfermedad, que significa interferir profilácticamente con un mecanismo patológico que produce la enfermedad, por ejemplo, enfermedad de Gaucher.

En el contexto de la presente invención, un mecanismo patológico tal puede ser un aumento en el plegamiento de proteínas mutantes y expresión de GCasa.

5 El término "tratamiento" significa intervenir terapéuticamente en el desarrollo de una enfermedad en un sujeto que muestra un síntoma de esta enfermedad. En el contexto de la presente invención, estos síntomas pueden incluir, pero no se limitan a, acumulación de GCasa en lisosomas, hepatoesplenomegalia, retardo psicomotor, anomalías pulmonares, degeneración de los huesos y las articulaciones y neurodegeneración progresiva.

10 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en este documento para indicar una cantidad o dosis del derivado de HP de la presente invención que es suficiente para aumentar el nivel de expresión de GCasa mutante, por ejemplo, a aproximadamente el 3-5%, preferentemente aproximadamente el 10% y más preferentemente aproximadamente el 30% del nivel encontrado en células normales, es decir, células de un individuo que no tiene enfermedad de Gaucher. Preferentemente, una cantidad terapéuticamente eficaz puede mejorar o prevenir un déficit clínicamente significativo de actividad de GCasa en el sujeto. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para producir una mejora en una afección clínicamente significativa en el sujeto, por ejemplo, mejora de neurodegeneración progresiva en pacientes con Gaucher de tipos 2 y 3.

20 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que normalmente no producen una reacción alérgica o adversa similar tal como dolor gástrico y mareo cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en este documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado o enumerado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

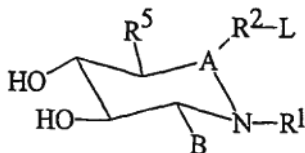
25 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que el compuesto se administra. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, que incluyen aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo. Preferentemente se emplean agua o las disoluciones acuosas de solución salina y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin.

Compuestos novedosos y síntesis

COMPUESTOS

35 Según la presente divulgación, la ASSC es un derivado en 6 (y opcionalmente, adicionalmente N-alquilado) de HP que tiene (i) una carga positiva en la posición correspondiente a la posición anomérica de un anillo de piranosa; (ii) un ligador flexible corto que emana de la posición correspondiente del oxígeno del anillo en una piranosa; y (iii) un resto lipófilo conectado al ligador. En una realización específica, la ASSC es 6-nonil-HP, o (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina. Debido a que la posición C-6 del residuo de glucosa no es reconocida por la mayoría de la GCasa y β -glucosidasas (De Bruyne y col. *Eur. J. Biochem.* 1979; 102:257-67), los sustituyentes en la posición C-6 pueden ser un hidrógeno, hidroxil o hidroximetil.

45 La presente invención proporciona un compuesto novedoso de la siguiente fórmula I:



en la que:

50 A representa un carbono;

B es un hidrógeno;

R¹ es un hidrógeno;

55 R² es un alquilo C₁-C₆ opcional;

R⁵ es hidroximetilo;

60 L es un alquilo C₁-C₁₂ o arilo.

También se contemplan sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de fórmula I.

Más preferido es cuando R² se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₂-C₆.

5 Más preferido es cuando R² no está presente y L es alquilo C₁-C₁₂ sin sustituir.

Todavía más preferido es cuando R² no está presente y L es alquilo C₆-C₁₂ sin sustituir.

Más preferido es cuando R² no está presente y L es alquilo C₆ sin sustituir.

10 Más preferido es cuando R² no está presente y L es alquilo C₇ sin sustituir.

Más preferido es cuando R² no está presente y L es alquilo C₈ sin sustituir.

15 Más preferido es cuando R² no está presente y L es alquilo C₉ sin sustituir.

Más preferido es cuando R² no está presente y L es bencilo.

Otro compuesto preferido de la invención es (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-butyl-3,4-dihidroxipiperidina.

20 Otro compuesto preferido de la invención es (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-dihidroxipiperidina.

Otro compuesto preferido de la invención es (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-dihidroxipiperidina.

25 Otro compuesto preferido de la invención es (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-dihidroxipiperidina.

Otro compuesto preferido de la invención es (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina.

30 Otro compuesto preferido de la invención es (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-bencil-3,4-dihidroxipiperidina.

En conjunto, los compuestos de fórmula I se denominan en este documento "derivados de HP".

Los compuestos de la presente invención incluyen sales farmacéuticamente aceptables de fórmula I. Sales farmacéuticamente aceptables que forman parte de la presente invención incluyen sales derivadas de bases inorgánicas tales como Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn; sales de bases orgánicas tales como N,N'-diacetiltilendiamina, glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, dicitlohexilamina, metformina, bencilamina, trialquilamina, tiamina; bases quirales como alquilfenilamina, glicinol, fenilglicinol, sales de aminoácidos naturales tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxiprolina, histidina, ornitina, lisina, arginina, serina; aminoácidos no naturales tales como D-isómeros o aminoácidos sustituidos; guanidina, guanidina sustituida en la que los sustituyentes se seleccionan de nitro, amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, sales de amonio o amonio sustituido y sales de aluminio. Las sales pueden incluir sales de adición de ácido cuando corresponda que son sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidroháluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencenosulfonatos, ascorbato, glicerofosfatos, cetoglutaratos. Los solvatos farmacéuticamente aceptables pueden ser hidratos o comprender otros disolventes de cristalización tales como alcoholes.

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, Cap. 8). Los profármacos pueden usarse para alterar la biodistribución (por ejemplo, para permitir compuestos que normalmente no entrarían en el sitio reactivo de la proteasa) o la farmacocinética para un compuesto particular. Por ejemplo, un grupo ácido carboxílico puede esterificarse, por ejemplo, con un grupo metilo o un grupo etilo para dar un éster. Si el éster se administra a un sujeto, el éster se escinde, enzimáticamente o no enzimáticamente, reductoramente, oxidativamente o hidrolíticamente, para revelar el grupo aniónico. Un grupo aniónico puede esterificarse con restos (por ejemplo, ésteres aciloximetílicos) que se escinden para revelar un compuesto intermedio que posteriormente se descompone para dar el compuesto activo.

Ejemplos de profármacos y sus usos son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Berge y col. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los profármacos pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado con un agente derivatizante adecuado. Por ejemplo los grupos hidroxilo pueden convertirse en ésteres por tratamiento con un ácido carboxílico en presencia de un catalizador. Ejemplos de restos de profármacos de alcohol escindibles incluyen restos de éster de alquilo inferior sustituidos y sin sustituir, ramificados o sin ramificar (por ejemplo, ésteres de etilo), ésteres de alquenilo inferior, ésteres de di-alquil inferior-amino-alquilo inferior (por ejemplo, éster de dimetilaminoetilo), ésteres de acilaminoalquilo inferior, ésteres de aciloxialquilo inferior (por ejemplo, éster de pivaloiloximetilo), ésteres de arilo (éster de fenilo), ésteres de arilalquilo inferior (por ejemplo, éster de bencilo), ésteres de arilo y de arilalquilo inferior sustituidos (por ejemplo, con sustituyentes metilo, halógeno o metoxi),

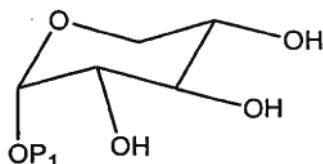
amidas, alquil inferior-amidas, di-alquil inferior-amidas e hidroxiamidas.

SÍNTESIS

5 Adicionalmente, la presente divulgación describe métodos de síntesis de compuestos según la fórmula I que comprenden las etapas de:

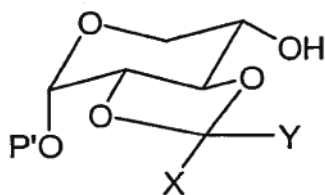
a) Hacer reaccionar L-xilosa con un compuesto precursor de grupos protectores hidrogenizables en presencia de un ácido para producir un compuesto de fórmula II:

10



en la que P¹ es un grupo protector hidrogenizable.

15 b) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula II con un acetal, cetal o cicloborato tal como 2-metoxipropeno o 1,1-dimetoxiciclohexano en presencia de un ácido orgánico o catalizador inorgánico para producir un compuesto de fórmula III:

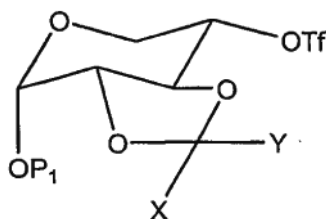


20

en la que X, Y = H, alquilo, arilo, cicloalquilo o puede ligarse por un grupo alquilo C₅-C₆.

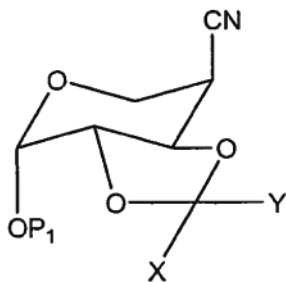
c) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula III con anhídrido sulfónico de trifluorometano en presencia de una base orgánica elegida del grupo que consiste en una amina terciaria o piridina para producir un compuesto de fórmula IV:

25



30

d) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula IV con MCN en la que M se elige del grupo que consiste en Li, K y Na en presencia de un éter corona para producir un compuesto de fórmula V:



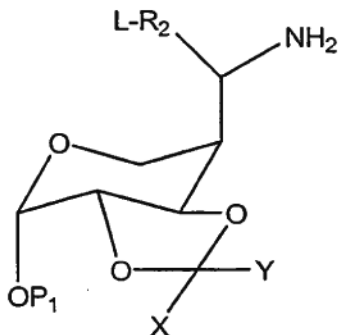
35

e) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula V con un reactivo organometálico de fórmula VI:



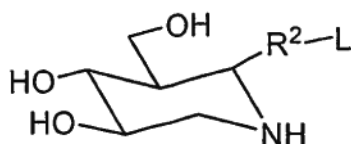
en la que R^2 y L son como se describen en la reivindicación 1 y M^2 se elige del grupo que consiste en MgBr; MgCl; Li; CuLi; ZnBr, seguido de reacción con un agente reductor para formar un compuesto de fórmula VII:

5



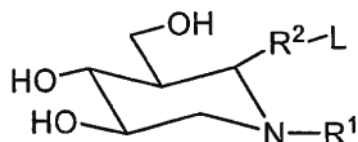
f) Desproteger y transponer el compuesto según la fórmula VII, seguido de ciclización y reducción con condiciones hidrogenantes en presencia de un ácido de Lewis o catalizador inorgánico para producir un compuesto de fórmula VIII (la fórmula VIII representa tanto la configuración R como S para el grupo sustituido con $L-R^2$):

10



g) Opcionalmente hacer reaccionar el compuesto según la fórmula VIII con compuestos de carbonilo tales como aldehído o cetona en presencia de reactivos reductores tales como triacetoxiborohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, $H_2/Pd/C$ o $H_2/Pd(OH)_2/C$ o hacer reaccionar con R^1X en la que R^1 es como se describe en la reivindicación 1 y X es un grupo saliente para producir un compuesto de fórmula IX:

15

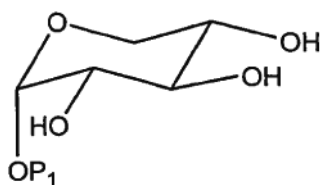


20

La presente divulgación describe adicionalmente un método alternativo para la síntesis de compuestos según la fórmula I que comprende las etapas de:

a) Hacer reaccionar L-xilosa con un compuesto precursor de grupos protectores hidrogenizables en presencia de un cloruro de ácido para producir un compuesto de fórmula II:

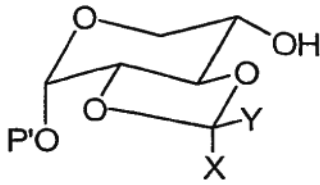
25



en la que P^1 es un grupo protector hidrogenizable.

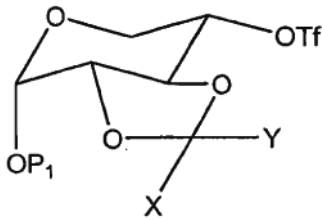
30

b) Proteger un compuesto según la fórmula II con acetales, cetales o boratos cíclicos tales como 2-metoxipropeno, o 1,1-dimetoxiciclohexano en presencia de un ácido orgánico o inorgánico para producir un compuesto de fórmula III:

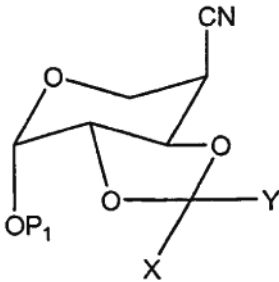


en la que X, Y = H, alquilo, arilo, cicloalquilo o puede ligarse por un grupo alquilo C₅-C₆.

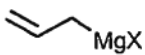
- 5 c) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula III con anhídrido trifílico en presencia de una base elegida del grupo que consiste en una base de amina terciaria y piridina para producir un compuesto de fórmula IV:



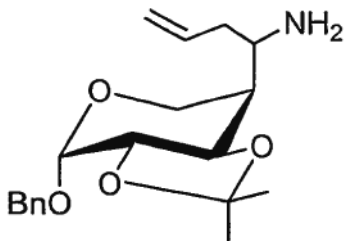
- 10 d) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula IV con MCN en la que M se elige del grupo que consiste en Li, K y Na en presencia de un éter corona para producir un compuesto de fórmula V:



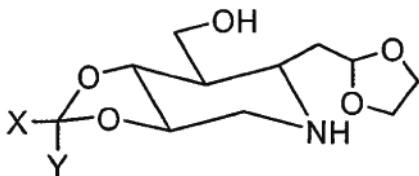
- 15 e) Hacer reaccionar un compuesto según la fórmula V con un compuesto de fórmula X:



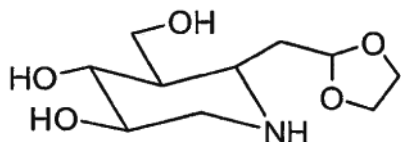
- 20 en la que X se elige del grupo que consiste en Br y Cl; seguido de reacción con un agente reductor para formar un compuesto de fórmula XI:



- 25 f) Proteger el grupo amino en el compuesto de fórmula XI seguido de ozonolisis del doble enlace, protección del aldehído e hidrogenación para formar un compuesto de fórmula XII:

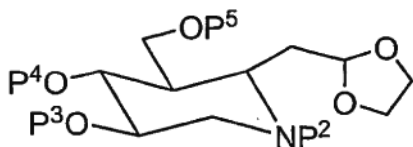


g) Desproteger selectivamente el grupo acetal, cetal o cicloborato respectivo según la fórmula XII con disolución acuosa de ácido acético para producir un compuesto de fórmula XIII:



5

h) Proteger N y O con un grupo protector tal como el grupo 4-metoxibencilo para formar un compuesto de fórmula XIV:



10

en la que P², P³, P⁴ y P⁵ son grupos protectores iguales o diferentes.

i) Hidrolizar un compuesto de fórmula XIV bajo condición ácida tal como HOAc, HCl, CF₃COOH para generar un compuesto de fórmula XV:

15



20

j) Hacer reaccionar un compuesto de fórmula XV con un agente reductor tal como borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio, seguido de conversión del alcohol resultante en un grupo saliente halógeno, OMs, OTf para formar un compuesto de fórmula XVI:

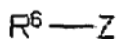


25

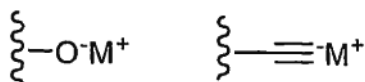
en la que Lv es un grupo saliente.

k) Reacción de un compuesto de fórmula XV con amina bajo condición reductora o reacción de un compuesto de fórmula XV con reactivo de Wittig o reacción de un compuesto de fórmula XVI con

30

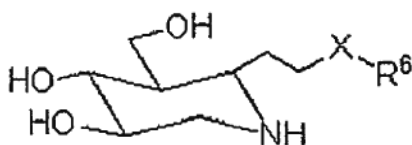


en la que R⁶ es un resto nucleófilo elegido del grupo que consiste en



35

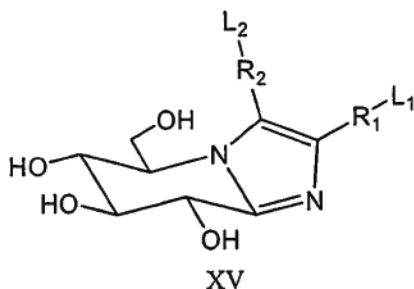
opcionalmente seguido de desprotección con nitrato de amonio cérico o Pd(OH)₂/C/H₂ para formar un compuesto de fórmula XVII (la fórmula XVII representa tanto la configuración R como S para el resto lipófilo de ligador):



en la que X se elige del grupo que consiste en O, NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR, S, CH₂, HC=CH; y C≡C.

5

La presente divulgación describe adicionalmente un método para la síntesis de compuestos según la fórmula XV:



- 10 R¹ y R² opcionalmente presentes son ligadores flexibles cortos con una longitud lineal de aproximadamente 6 Å a aproximadamente 12 Å, preferentemente de aproximadamente 9 Å. R¹ y R² también pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en C₁-C₆ sustituido o sin sustituir: alquilo, alquenilo, o alquinilo opcionalmente interrumpido por uno o más restos elegidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR³, O, S, S(O)_m y -S(O)_mNR³; C₁-C₆; y m es 1 ó 2. Además, R¹-L¹ o R²-L² pueden ser un hidrógeno, si cualquiera de R²-L² o R¹-L¹ es distinto de un hidrógeno.

15

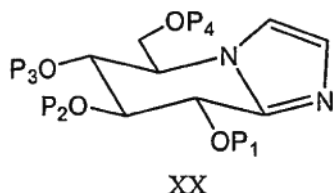
L¹ y L² son grupos lipófilos seleccionados del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₂ sustituido o sin sustituir, alquenilo sustituido o sin sustituir, alquinilo sustituido o sin sustituir; cicloalquilo sustituido o sin sustituir; cicloalquenilo sustituido o sin sustituir; arilo sustituido o sin sustituir; arilalquilo sustituido o sin sustituir; heteroarilo sustituido o sin sustituir; heterocíclico sustituido o sin sustituir; heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir; heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir.

20

R³ se selecciona independientemente de cada aparición de 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; heterocíclico sustituido o sin sustituir; heterocicloalquilo sustituido o sin sustituir; heteroarilalquilo sustituido o sin sustituir, -C(O) unido a un alquilo C₁-C₆ sustituido o sin sustituir; que comprende las etapas de:

25

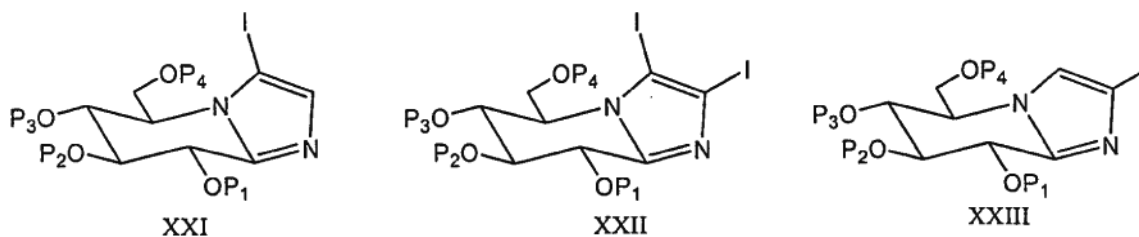
- 30 a) Hacer reaccionar un compuesto de fórmula XX:



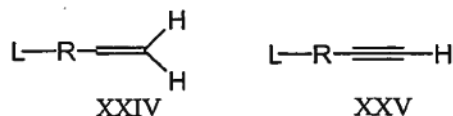
XX

en la que P₁, P₂, P₃ y P₄ son grupos de protección de O, con N-yodo-succinimida en un disolvente aprótico polar o reacciones adicionales para la eliminación selectiva del grupo 3-yodo de la fórmula XXII para proporcionar compuestos de fórmula XXI, XXII o XXIII:

35

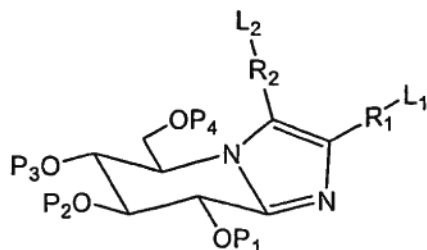


b) Hacer reaccionar un compuesto de fórmula XXI, XXII o XXIII con un compuesto de fórmula XXIV o XXV:



5

en la que L es L¹ o L² y R es R¹ o R², en presencia de catalizador de paladio tal como Pd(PPh₃)₄ en un disolvente aprótico polar para proporcionar un compuesto de fórmula XXVI:

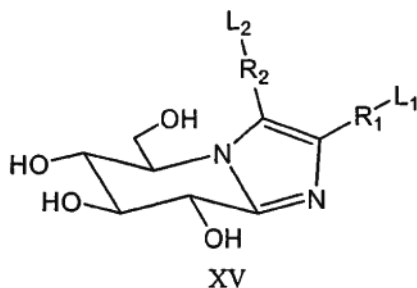


10

y:

c) Desproteger los grupos de O-protección proporciona la fórmula XV:

15



Aplicaciones terapéuticas

20 La presente invención proporciona además un compuesto de fórmula I para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, método que comprende aumentar la expresión o actividad de la GCasa mutante, o aumentar o estabilizar la actividad de GCasa sustitutiva natural recombinante (es decir, TSE o terapia génica), en un sujeto o paciente en necesidad de tal tratamiento.

25 Según la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" también significa una cantidad del compuesto de fórmula I que potencia sin inhibir la actividad de la proteína de GCasa, es decir, una cantidad eficaz potencia más que inhibe, por lo que el efecto neto es un potenciamiento. Éste se encontrará generalmente algo por debajo del valor de Cl₅₀ de ese inhibidor para GCasa intracelularmente, o por debajo de aproximadamente 50 μM en medio de cultivo.

30

El análogo de moléculas pequeñas que aumenta la expresión o actividad de GCasa se formula ventajosamente en una composición farmacéutica, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En este contexto, el compuesto de fórmula I es el principio activo o agente terapéutico.

La concentración o cantidad del principio activo depende de la dosificación deseada y la pauta de administración, como se trata más adelante. Intervalos de dosis adecuados del análogo de moléculas pequeñas puede incluir de aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día.

5 *Terapia de combinación*

Chaperonas de HP y sustitución de proteínas. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden incluir otros compuestos biológicamente activos, además de derivado de HP de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, las moléculas pequeñas pueden administrarse en disolución con la GCasa recombinante natural sustitutiva (o de otro modo funcional) durante la infusión de enzimas en la terapia sustitutiva. La terapia sustitutiva de proteínas aumenta la cantidad de proteína introduciendo exógenamente proteína natural o biológicamente funcional a modo de infusión. Esta terapia se ha desarrollado para muchos trastornos genéticos que incluyen enfermedad de Gaucher. La enzima natural se purifica de un sistema de expresión de células recombinantes (por ejemplo, células de mamífero o células de insecto – véanse las patentes de EE.UU. nº 5.580.757 a Desnick y col.; 6.395.884 y 6.458.574 a Selden y col.; 6.461.609 a Calhoun y col.; 6.210.666 a Miyamura y col.; 6.083.725 a Selden y col.; 6.451.600 a Rasmussen y col.; 5.236.838 a Rasmussen y col.; y 5.879.680 a Ginns y col.), placenta humana o leche animal (véase la patente de EE.UU. nº 6.188.045 a Reuser y col.).

Después de la infusión se espera que la GCasa exógena sea captada por los tejidos mediante mecanismo no específico o específico de receptor. En general, la eficiencia de captación no es alta, y el tiempo de circulación de la proteína exógena es corto. Además, la GCasa exógena es inestable y se somete a rápida degradación intracelular.

Por consiguiente, se espera que la co-administración con los compuestos de HP de la presente invención, que actúan de chaperonas para la enzima, mejore la estabilidad y prevenga la degradación de la GCasa exógenamente administrada.

En otra realización, el análogo de moléculas pequeñas también puede administrarse conjuntamente con, pero no necesariamente la misma composición, que la proteína de GCasa natural recombinante, o de otro modo funcional. En esta realización, la proteína de GCasa sustitutiva y los compuestos de HP de la presente invención se formulan en composiciones separadas. El derivado de HP y la GCasa sustitutiva pueden administrarse según la misma vía, por ejemplo, infusión intravenosa, o diferentes vías, por ejemplo, infusión intravenosa para la proteína sustitutiva y administración por vía oral para el compuesto de HP.

Derivados de HP y terapia génica. Además, las composiciones de HP de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con un vector recombinante que codifica un gen GCasa natural, o de otro modo funcional, es decir, en asociación con terapia génica. Recientemente, los métodos de terapia génica recombinante están en desarrollo clínico o preclínico para el tratamiento de trastornos por almacenamiento lisosómico, véanse, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 5.658.567, para Terapia con alfa-galactosidasa A recombinante para la enfermedad de Fabry; patente de EE.UU. nº 5.580.757, para Clonación y expresión de β-galactosidasa A biológicamente activa como una proteína de fusión; patente de EE.UU. nº 6.066.626 para Composiciones y método para tratar enfermedad por almacenamiento lisosómico; patente de EE.UU. nº 6.083.725 para Células humanas transfectadas que expresan proteína alfa-galactosidasa A humana; patente de EE.UU. nº 6.335.011 para Métodos para administrar ADN a células musculares usando viriones de virus adenoasociados recombinantes para tratar enfermedad por almacenamiento lisosómico; Bishop, D. F. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:4859-4863; Medin, J. A. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:7917-7922; Novo, F. J., *Gene Therapy* 1997; 4:488-492; Ohshima, T. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:2540-2544; Sugimoto Y. y col., *Human Gene Therapy* 1995; 6:905-915; Sly y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2002; 99 (9):5760-2; Raben y col., *Curr. Mol. Med* 2002; 2 (2):145-66; Eto y col., *Curr. Mol. Med.* 2002; 2 (1):83-9; Vogler y col., *Pediatr. Dev. Pathol.* 2001; 4 (5):421-33; Barranger y col., *Expert Opin. Biol. Ther.* 2001; 1 (5):857-67; Yew y col., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2001; 3 (4):399-406; Caillaud y col., *Biomed. Pharmacother.* 2000; 54 (10):505-12 y Ioannu y col., *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000; 11 (8):1542-7.

Es importante observar que, además de estabilizar la enzima de GCasa expresada, el derivado de HP también estabilizará y potenciará la expresión de cualquier GCasa mutante endógena que sea deficiente como resultado de mutaciones que previenen el plegamiento apropiado y el procesamiento en el RE.

Formulaciones y administración

Según la invención, la composición farmacéutica de la invención, por ejemplo, el derivado de HP, puede introducirse parenteralmente, transmucosamente, por ejemplo, por vía oral, nasalmente o rectalmente, o transdérmicamente. Vías parenterales incluyen administración intravenosa, intraarteriolar, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal.

Con respecto a la terapia de combinación sustitutiva de proteína, en la realización en la que el derivado de HP se administra en la misma composición con la enzima de GCasa sustitutiva, la formulación es preferentemente adecuada para administración parenteral, que incluye intravenosa, subcutánea e intraperitoneal; sin embargo, también se contemplan formulaciones adecuadas para otras vías de administración tales como oral, intranasal o

transdérmica.

En una realización, la administración transdérmica se logra por liposomas. Las vesículas bicapa de lípidos son esferas microscópicas llenas de fluido cerradas que se forman principalmente a partir de moléculas individuales que tienen porciones polares (hidrófilas) y no polares (lipófilas). Las porciones hidrófilas pueden comprender fosfato, fosfato de glicerilo, carboxi, sulfato, amino, hidroxilo, colina u otros grupos polares. Ejemplos de grupos lipófilos son hidrocarburos saturados o insaturados tales como alquilo, alquenilo u otros grupos de lípidos. También pueden incluirse esteroides (por ejemplo, colesterol) y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables (incluyendo antioxidantes tales como alfa-tocoferol) para mejorar la estabilidad de las vesículas o conferir otras características deseables.

Los liposomas son un subconjunto de estas vesículas bicapa y principalmente comprenden moléculas de fosfolípidos que contienen dos colas hidrófobas que consisten en cadenas de ácidos grasos. Tras la exposición a agua, estas moléculas se alinean espontáneamente para formar membranas bicapa esféricas con los extremos lipófilos de las moléculas en cada capa asociados en el centro de la membrana y los extremos polares opuestos formando la superficie interna y externa respectiva de la(s) membrana(s) bicapa. Por tanto, cada lado de la membrana presenta una superficie hidrófila, mientras que el interior de la membrana comprende un medio lipófilo. Estas membranas pueden disponerse en una serie de membranas esféricas concéntricas separadas por delgados estratos de agua, de un modo similar a las capas de una cebolla, alrededor de un espacio acuoso interno. Estas vesículas multilaminares (MLV) pueden convertirse en vesículas unilaminares (UV) con la aplicación de una fuerza de cizallamiento.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (si son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. Las prevenciones de la acción de microorganismos pueden provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol y ácido sórbico. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. La ventaja del uso de liposomas para administrar los análogos de ceramida y esfingomielina según el método de la presente invención es que los liposomas atraviesan la barrera hematoencefálica. Como la enfermedad de Gaucher de tipos 2 y 3 se caracteriza por neurodegeneración debido a una acumulación de glucoceramida, la elección del cerebro como diana eficaz es crítica para cualquier agente terapéutico.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando la GCasa purificada y el derivado de HP en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de filtración o esterilización terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y la técnica de liofilización que da un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de la disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Preferentemente, la formulación contiene un excipiente. Excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la formulación son tampones tales como tampón citrato, tampón fosfato, tampón acetato y tampón bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas tales como albúmina de suero, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro sódico; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Sistemas de tampón para su uso con las formulaciones incluyen tampones citrato; acetato; bicarbonato; y fosfato. El tampón fosfato es una realización preferida.

La formulación también contiene preferentemente un detergente no iónico. Detergentes no iónicos preferidos incluyen Polisorbato 20, Polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, octil- α -glucósido, octil- β -glucósido, Brij 35, Pluronic y Tween 20.

Para la liofilización de GCasa y preparaciones de HP, la concentración de enzima puede ser 0,1-10 mg/ml. Agentes de carga, tales como glicina, manitol, albúmina y dextrano, pueden añadirse a la mezcla de liofilización. Además, pueden añadirse posibles crioprotectores tales como disacáridos, aminoácidos y PEG a la mezcla de liofilización. También puede añadirse cualquiera de los tampones, excipientes y detergentes enumerados anteriormente.

Las formulaciones del compuesto de HP (con o sin la GCasa) para administración por inhalación pueden contener lactosa u otros excipientes, o pueden ser disoluciones acuosas que pueden contener 9-lauriléter de polioxitileno, glicocolato o desoxicocolato. Un aerosol para inhalación preferido se caracteriza porque tiene partículas de pequeña densidad de masa y gran tamaño. Las partículas con densidades de masa inferiores a 0,4 gramos por centímetro cúbico y diámetros medios que superan 5 μm administran eficientemente agentes terapéuticos inhalados a la circulación sistémica. Tales partículas son inspiradas profundamente en los pulmones y escapan de los mecanismos de eliminación naturales de los pulmones hasta que las partículas inhaladas administran su carga útil terapéutica (Edwards y col., *Science* 1997; 276:1868-1872). Las preparaciones de proteínas sustitutivas de la presente invención pueden administrarse en forma aerosolizada, por ejemplo, usando métodos de preparación y formulaciones como se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607, cada una incorporada en este documento por referencia. La formulación para administración intranasal puede incluir disoluciones aceitosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel que va a aplicarse intranasalmente.

Las formulaciones para administración tópica a la superficie de la piel pueden prepararse por dispersión de la composición con un vehículo aceptable dermatológico tal como una loción, crema, pomada o jabón. Particularmente útiles son vehículos que pueden formar una película o capa sobre la piel para localizar la aplicación e inhibir la eliminación. Para administración tópica a superficies de tejidos internos, la composición puede dispersarse en un adhesivo de tejido líquido u otra sustancia conocida por potenciar la adsorción a una superficie de tejido. Alternativamente pueden usarse disoluciones de recubrimiento de tejidos tales como las formulaciones que contienen peptina.

En realizaciones preferidas, las formulaciones de la invención se suministran en formulaciones tanto líquidas como en polvo en dispositivos que convenientemente administran una dosis predeterminada de la preparación; ejemplos de tales dispositivos incluyen un inyector sin aguja para inyección tanto subcutánea como intramuscular, y un dispositivo de administración de aerosol dosificado. En otros casos, la preparación puede suministrarse en una forma adecuada para la liberación sostenida, tal como en un parche o apósito que va a aplicarse a la piel para administración transdérmica, o por dispositivos erosionables para administración transmucosa. En los casos en los que la formulación, por ejemplo, el HP se administra por vía oral en forma de comprimido o cápsula, la preparación podría suministrarse en una botella con una tapa de quita y pon o como parches alveolados.

En la realización en la que el derivado de HP se administra por separado de la GCasa (o un vector que comprende un gen GCasa), se administra solo como monoterapia, el compuesto puede estar en una forma adecuada para cualquier vía de administración que incluye, pero no se limita a, todas las formas descritas anteriormente. Alternativamente, en una realización preferida, el análogo de moléculas pequeñas puede formularse para administración por vía oral en forma de comprimidos o cápsulas preparadas mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos muy conocidos en la técnica.

Preparaciones líquidas para administración por vía oral del derivado de HP pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, *p*-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según convenga. Las preparaciones para administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para dar la liberación controlada del compuesto activo.

El análogo de moléculas pequeñas también puede formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, el derivado de HP también puede formularse como una preparación de liberación prolongada. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, el derivado de HP puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

Momento adecuado. Si la proteína de GCasa sustitutiva y el derivado de HP están en formulaciones separadas, la administración puede ser simultánea, o el derivado de HP puede administrarse antes de o después de la proteína

sustitutiva de GCasa. Por ejemplo, si la proteína sustitutiva se administra intravenosamente, el derivado de HP puede administrarse durante un periodo de 0 h a 6 h después. Alternativamente, el derivado de HP puede administrarse de 0 a 6 h antes de la proteína.

- 5 En una realización preferida en la que el derivado de HP y la proteína sustitutiva se administran por separado, y en la que tiene una corta semivida en circulación (por ejemplo, moléculas pequeñas), el derivado de HP puede administrarse por vía oral continuamente, tal como diariamente, con el fin de mantener un nivel constante en la circulación. Tal nivel constante será el que se ha determinado que es no tóxico para el paciente y es óptimo en lo referente a la interacción con una proteína sustitutiva diana durante el tiempo de administración para conferir un efecto terapéutico no inhibidor.

En otra realización, el derivado de HP se administra durante el periodo de tiempo requerido para la reposición de la proteína de GCasa sustitutiva (que se prolongará por la administración del análogo de moléculas pequeñas).

- 15 Independientemente del momento adecuado, la administración debe ser de forma que las concentraciones de la GCasa y el derivado de HP deban ser de forma que se establezca la molécula pequeña, pero no prevenga o inhiba la actividad de proteína *in vivo*. Esto también se aplica cuando la proteína sustitutiva y moléculas pequeñas se administren en la misma formulación.

- 20 Con respecto al momento adecuado del derivado de HP y la terapia de combinación de terapia génica, la administración de la molécula pequeña según la presente invención seguirá generalmente la administración del gen GCasa para permitir la expresión de la enzima recombinante por las células diana/tejido. Como la expresión del gen GCasa será sostenida durante un periodo de tiempo, mientras que el gen sea expresable, el derivado de HP se mantendrá eficaz como una chaperona y estabilizará la enzima recombinante. Por tanto, la administración de la molécula de chaperona será necesaria durante el mismo periodo que el gen se expresa.

- En una realización preferida, como el derivado de HP puede tener una corta semivida en circulación, frecuentemente se prefiere que se administre por vía oral, tal como diariamente, con el fin de mantener un nivel constante en la circulación. Un nivel constante tal será uno que se ha determinado que es no tóxico para el paciente y es óptimo con respecto a la interacción con la proteína, que se producirá continuamente, para conferir un efecto terapéutico no inhibidor.

- Según la presente invención, como el gen GCasa terapéutico complementa la actividad inadecuada de un gen mutante de GCasa endógeno, el momento adecuado de la administración del análogo de moléculas pequeñas se vuelve menos significativo, ya que la cantidad eficaz puede potenciar la actividad de la GCasa mutante endógena, además de aumentar la eficiencia del producto génico de GCasa terapéutico.

- La presencia de una chaperona de moléculas pequeñas, por ejemplo, el derivado de HP de la presente invención, para la GCasa codificada por el gen GCasa administrado tendrá el beneficio de mejorar la eficiencia del procesamiento de proteínas durante la síntesis en el RE (es decir, previniendo la agregación) y prolongar en la circulación y el tejido la semivida de la GCasa, manteniéndose así niveles eficaces durante periodos de tiempo más largos. Esto producirá un aumento de la expresión en tejidos clínicamente afectados. Esto confiere efectos beneficiosos al paciente con Gaucher tales como alivio potenciado, reducción en la frecuencia de tratamiento y/o reducción en la cantidad de gen GCasa administrado. Esto también reducirá el coste de tratamiento.

45 *Dosificaciones*

- La cantidad de compuesto de HP eficaz para estabilizar la proteína de GCasa administrada y/o proteína mutante de GCasa endógena puede determinarse por aquellos expertos en la materia. La farmacocinética y la farmacodinámica tales como la semivida ($t_{1/2}$), concentración pico en plasma ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo hasta la concentración pico en plasma ($t_{m\acute{a}x}$), exposición como se mide por el área bajo la curva (ABC) y distribución de tejido para tanto la proteína sustitutiva de GCasa como el análogo de moléculas pequeñas, además de los datos para la unión de la proteína de GCasa sustitutiva al análogo de moléculas pequeñas (constantes de afinidad, constantes de asociación y disociación y valencia), pueden obtenerse usando métodos normales conocidos en la técnica para determinar cantidades compatibles requeridas para estabilizar la proteína sustitutiva de GCasa, sin inhibir su actividad y, por tanto, confieren un efecto terapéutico.

- La toxicidad y la eficacia terapéutica de la composición pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales, por ejemplo en ensayos de cultivo celular o usando animales experimentales para determinar la DL_{50} y la DE_{50} . Los parámetros DL_{50} y DE_{50} son muy conocidos en la técnica y se refieren a las dosis de un compuesto que son letales para el 50% de una población y terapéuticamente eficaces en el 50% de una población, respectivamente. La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos se denomina en lo sucesivo el índice terapéutico y puede expresarse como la relación: DL_{50}/DE_{50} .

- 65 Una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular y formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración en circulación que incluye la CI_{50} . La concentración

Cl₅₀ de un compuesto es la concentración que alcanza una inhibición al 50% de síntomas (por ejemplo, como se ha determinado a partir de ensayos de cultivo celular). Dosificaciones apropiadas para su uso en un individuo particular, por ejemplo en pacientes humanos, pueden entonces determinarse con más exactitud usando tal información.

- 5 Las medidas de los compuestos en plasma pueden medirse rutinariamente en un individuo tal como un paciente por técnicas tales como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases.

La dosificación particular usada en cualquier tratamiento puede variar dentro de este intervalo, que depende de factores tales como la forma de dosificación particular empleada, la vía de administración utilizada, las condiciones del individuo (por ejemplo, paciente), etc.

Según métodos actuales, la concentración de proteína de GCasa sustitutiva es entre 0,05-5,0 mg/kg de peso corporal, normalmente administrada semanalmente o bisemanalmente. La proteína puede administrarse a una dosificación que oscila de 0,1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. Dosis regularmente repetidas de la proteína son necesarias durante la vida del paciente. Las inyecciones subcutáneas mantienen exposición sistémica a largo plazo al fármaco. La GCasa se administra preferentemente intravenosamente, por ejemplo, en una inyección en bolo intravenosa, en una inyección intravenosa de empujón lento o por inyección intravenosa continua. La infusión IV continua (por ejemplo, durante 2-6 horas) permite el mantenimiento de niveles específicos en la sangre.

Las concentraciones óptimas del derivado de HP se determinarán según la cantidad requerida para estabilizar la proteína de GCasa recombinante *in vivo*, en tejido o circulación, sin prevenir su actividad, biodisponibilidad del análogo de moléculas pequeñas en tejido o en circulación, y el metabolismo del análogo de moléculas pequeñas en tejido o en circulación. Por ejemplo, la concentración de C-nonil-HP puede determinarse calculando el valor de Cl₅₀ del C-nonil-HP para GCasa. Teniendo en cuenta la biodisponibilidad y el metabolismo del compuesto, las concentraciones alrededor del valor de Cl₅₀ o ligeramente superiores al valor de Cl₅₀ pueden entonces evaluarse basándose en efectos sobre la actividad de GCasa, por ejemplo, la cantidad de análogo de moléculas pequeñas necesaria para aumentar la cantidad de actividad de GCasa o prolongar la actividad de GCasa sustitutiva.

30 Ejemplos

EJEMPLO 1: Síntesis de 6-alkil-hidroxipiperidinas

35 a. α-L-(+)-Xilopiranósido de bencilo

Se combina L(-)-xilosa (5,0 g, 33,3 mmoles) con 25 ml de alcohol bencílico y se trata con 1 ml de cloruro de acetilo. La mezcla resultante se calienta a 50°C y se agita durante 24 h. Después de enfriarse hasta temperatura ambiente se añaden 80 ml de éter *terc*-butilmetílico y la mezcla se mantiene a 5°C durante 24 h. Los cristales que se forman se recogen y se lavan con éter *terc*-butílico frío en hielo dando el compuesto del título como el α-anómero. P.f. 120°C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,40-7,28 (m, 5H), 4,93 (d, 1H, J=4,8 Hz), 4,71 (d, 1H, J=3,6 Hz), 4,82-4,78 (m, 2H), 4,65 (d, 1H, J=12,4 Hz), 4,44 (d, 1H, J=12 Hz), 3,47-3,38 (m, 2H), 3,36-3,27 (m, 3H), 3,25-3,21 (m, 1H). EM: 258 [M + NH₄⁺].

45 b. 2,3-Isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo

Una mezcla de α-L-xilopiranósido de bencilo (15 g, 62,5 mmoles), 2-metoxipropeno (15 ml, 156,6 mmoles) y ácido *p*-toluenosulfónico monohidratado (300 mg, 1,6 mmoles) se disuelven en THF anhidro y se agitan a 0°C durante 1,5 h. Se añade trietilamina (1 ml) y la agitación continúa durante 10 min. La mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo (400 ml), se lava con NaCl ac. sat., agua con hielo y la fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. Después de la filtración, la disolución se concentra usando un rotavapor y el producto bruto se purifica usando una columna de cromatografía ultrarrápida eluida con heptano/EtOAc (4:1). El compuesto del título se aísla como un jarabe incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,27-7,20 (m, 5H), 5,10 (d, 1H, J=2,4 Hz), 4,70 (d, 1H, J=12 Hz), 4,53 (d, J=12 Hz), 3,92-3,88 (m, 2H), 3,65 (dd, 1H, J=4,8 Hz y 11,6 Hz), 3,38-3,36 (m, 1H), 3,27 (t, 1H, J=9,6 Hz), 1,38 (s, 3H), 1,35 (s, 3H). EM (ES⁺): 281 [M+1].

55 c. 4-Ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo

Se disuelven 2,3-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo (4 g, 14,3 mmoles) y piridina (3,8 ml) en 50 ml de CH₂Cl₂, se agitan y se enfrían a -78°C. Se añade lentamente anhídrido trifluorometanosulfónico (3,2 ml, 19 mmoles) y la mezcla de reacción se agita durante 1,5 h, luego se calienta a 0°C durante 2 h adicionales. Se añade EtOAc (500 ml) y la disolución orgánica se lava sucesivamente con NaCl acuoso saturado y agua con hielo. La fase orgánica se seca (Na₂SO₄) y se evapora. La cromatografía ultrarrápida usando CH₂Cl₂ como eluyente da el triflato deseado. EM (ES⁺): 413 [M+1]. El triflato anterior (5,3 g, 12,9 mmoles), KCN (9 g, 138 mmoles), 18-corona-6 (4 g) y tamices moleculares de 4 Å (10 g) se combinan y se agitan en 300 ml de DMF seca a temperatura ambiente durante 16 h. Se añade EtOAc (400 ml) y la disolución se lava sucesivamente con NaCl ac. sat. y H₂O. La fase orgánica se seca

(Na₂SO₄) y se evapora. La cromatografía ultrarrápida (CH₂Cl₂) da el compuesto del título como un jarabe amarillo pálido. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,28-7,22 (m, 5H), 5,28 (d, 1H, J=3 Hz), 4,69 (d, 1H, J=12 Hz), 4,59 (d, 1H, J=12 Hz), 4,04 (dd, 1H, J=4,8 Hz y 9,6 Hz), 3,87-3,80 (m, 2H), 3,70 (dd, 1H, J=3 Hz y 12 Hz), 3,23-3,21 (m, 1H), 1,42 (s, 6H). EM (ES⁺): 290 [M+1], 307 [M+ NH₄⁺].

5

d. 4-(1-Aminopentil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo

Se disuelve 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo (65 mg, 0,225 mmoles) en 1 ml de éter anhidro y se agita a temperatura ambiente. Se añade lentamente cloruro de butilmagnesio (0,225 ml de disolución 2 M en éter dietílico) y la mezcla de reacción se agita durante 14 h. Se añade LiAlH₄ (25 mg) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 5 h adicionales. Se añade agua (5 ml) y NaOH (1 N, 5 ml) y la mezcla se agita durante 30 min. La mezcla se transfiere a un embudo de decantación y se extrae con éter *t*-butilmetílico (2 x 20 ml). La fase orgánica se seca y se evapora usando un rotavapor. El residuo se purifica por cromatografía (CH₂Cl₂, y luego CH₂Cl₂/MeOH/Et₃N 200:20:1) dando el compuesto del título como jarabe amarillo. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,35-7,29 (m, 5H), 5,13 (d, 1H, J=2,4 Hz), 4,69 (d, 1H, J=12 Hz), 4,51 (d, 1H, J=12 Hz), 4,06 (t, 1H, J=10,4 Hz), 3,65 (dd, 1H, J=4,8 Hz y 11,6 Hz), 3,63-3,55 (m, 2H), 3,40 (dd, 1H, J=2,8 y 9,6 Hz), 2,96-2,90 (m, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,35 (s, 3H), 1,20-1,10 (m, 6H), 0,82 (t, 3H, J=6,8 Hz). EM (ES⁺): 350 [M+1].

10

15

e. 4-(1-Aminodecil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo

20

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1d, *n*-C₉H₁₉MgBr se hace reaccionar con 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo dando el compuesto del título. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,35-7,29 (m, 5H), 5,24 (d, 1H, J=2,8 Hz), 4,74 (d, 1H, J=12 Hz), 4,61 (d, 1H, J=12 Hz), 4,31 (dd, 1H, J=5,2 Hz y 10,4 Hz), 3,80 (dd, 1H, J=3,2 Hz y 9,6 Hz), 3,71-3,64 (m, 2H), 3,43-3,40 (m, 1H), 2,41-2,38 (m, 1H), 1,47 (s, 3H), 1,45 (s, 3H), 1,29-1,20 (m, 16H), 0,87 (t, 3H, J=6,4 Hz). EM (ES⁺): 420 [M+1].

25

f. 4-(1-Aminoctil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1d, *n*-C₇H₁₅MgBr se hace reaccionar con 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo dando el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,20-7,31 (m, 5H), 5,19 (d, 1H, J=2,0 Hz), 4,69 (d, 1H, J=7,5 Hz), 4,56 (d, 1H, J=7,75 Hz), 4,26 (dd, 1H, J=3,0 Hz y 6,5 Hz), 3,79 (dd, 1H, J=2,0 Hz y 6,25 Hz), 3,65-3,58 (m, 2H), 3,24-3,20 (m, 1H), 2,22-2,15 (m, 1H), 1,40 (s, 6H), 1,23-1,15 (m, 12 H), 0,9 (t, 3H, J=6,4 Hz); EM (ES⁺): 329 [M+1].

30

35

g. 4-(1-Aminoheptil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1d, *n*-C₆H₁₃MgBr se hace reaccionar con 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo dando el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,30-7,20 (m, 5H), 4,85 (d, 1H, J=11,2 Hz), 4,65 (d, 1H, J=1,6 Hz), 4,55 (d, 1H, J=11,2 Hz), 4,30 (t, 1H, J=3,6), 4,09 (dd, 1H, J=4,8 Hz y 11,6 Hz), 3,94 (dd, 1H, J=2,4 Hz y 12,8 Hz), 3,86 (dd, 1H, J=1,6 Hz y 4,0 Hz), 3,75 (m, 1H), 2,71-2,80 (m, 1H), 1,40-1,21 (m, 16H), 0,83 (t, 3H, J=6,4 Hz). EM (ES⁺): 378 [M+1].

40

h. 4-(1-Aminononil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1d, *n*-C₈H₁₇MgBr se hace reaccionar con 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo dando el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,30-7,20 m, 5H), 5,20 (d, 1H, J=2,0 Hz), 4,70 (d, 1H, J=8,0 Hz), 4,50 (d, 1H, J=8,0 Hz), 4,25 (dd, 1H, J=4,0 Hz y 8,0 Hz), 3,74 (dd, 1H, J=3,1 Hz y 9,3 Hz), 3,65-3,50 (m, 2H), 3,25-3,15 (m, 1H), 2,20-2,10 (m, 1H), 1,40 (s, 6H), 1,25-1,15 (m, 14H), 0,80 (t, 3H, J=6,3 Hz); EM (ES⁺): 406 [M+1].

45

50

i. 4-(1-Amino-2-feniletíl)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1d, PhCH₂MgCl se hace reaccionar con 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo dando el compuesto del título. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7,38-7,26 (m, 10H), 5,24 (d, 1H, J=2,8 Hz), 4,78 (d, 1H, J=13,7 Hz), 4,64 (d, 1H, J=13,3 Hz), 4,34 (dd, 1H, J=5,6 Hz y 11,6 Hz), 3,88 (m, 2H), 3,75 (dd, 1H, J=3,3 Hz y 14,3 Hz), 3,55-3,46 (m, 1H), 3,09 (dd, 1H, J=3,0 Hz y 14,3 Hz), 2,41 (dd, 1H, J=11,3 Hz y 14,4 Hz), 2,21 (m, 1H), 2,13 (s, 2H), 1,45 (s, 3H), 1,40 (s, 3H); EM (ES⁺): 384 [M+1].

55

j. (3R,4R,5R,6S)-5-(Hidroximetil)-6-*n*-butil-3,4-dihidroxipiperidina

60

Se disuelve 4-(1-aminopentil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranosido de bencilo (27 mg) en 2 ml de metanol y se agita. Se añade Pd(OH)₂ (22 mg del 20% en peso sobre carbón) seguido de 1 gota de HCl conc. (conc. 1 gota). La mezcla se agita rápidamente bajo una atmósfera de H₂ durante 24 h. La mezcla de reacción se filtra a través de Celite y el filtrado se concentra usando un rotavapor. El producto bruto se purifica por cromatografía usando la resina de intercambio iónico Amberlite CG-50 (forma NH₄⁺), se eluye con NH₄OH acuoso 0,1 N, dando el compuesto del

65

título. RMN ¹H (400 MHz, D₂O): 3,91 (d, 1H, J=11,6 Hz), 3,79 (d, 1H, J=12 Hz), 3,50-3,43 (m, 2H), 3,11 (dd, 1H, J=2,8 y 10,5 Hz), 2,61 (t, 1H, 9,6 Hz), 2,41 (t, 1H, J=10 Hz), 1,73-1,71 (m, 1H), 1,43-1,21 (m, 6H), 0,90 (t, 3H, J=6,4 Hz). EM (ES+): 204 [M+1].

5 k. (3R,4R,5R,6S)-5-(Hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-dihidroxipiperidina

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1j, 4-(1-aminooctil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo se convierte en el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 3,96 (dd, 1H, J=1,5 Hz y 7,3 Hz), 3,63 (dd, 1H, J=1,8 Hz y 7,3 Hz), 3,45-3,10 (m, 2H), 3,35-3,20 (m, 2H), 3,00-2,95 (m, 1H), 2,65 (t, 1H, J=14,8 Hz), 1,90-1,81 (m, 1H), 1,60-1,25 (m, 14H), 0,90 (t, 3H, J=6,5 Hz); EM (ES+): 246 [M+1].

10 l. (3R,4R,5R,6S)-5-(Hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-dihidroxipiperidina

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1j, 4-(1-aminoheptil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo se convierte en el compuesto del título. RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD): δ 3,95 (dd, 1H, J=2,4 Hz y 11,4 Hz), 3,68 (dd, 1H, J=3,0 Hz y 11,4 Hz), 3,49-3,43 (m, 2H), 3,16 (dd, 1H, J=4,2 Hz y 12 Hz), 2,83-2,76 (m, 1H), 2,51 (dd, 1H, J=10,8 Hz y 12,7 Hz), 1,79-1,75 (m, 1H), 1,46-1,26 (m, 10H), 0,90 (t, 3H, J=6,6 Hz); EM (ES+): 232 [M+1], 254 [M+Na].

20 m. (3R,4R,5R,6S)-5-(Hidroximetil)-6-n-octil-3,4-dihidroxipiperidina

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1j, 4-(1-aminononil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L(?) -xilopiranósido de bencilo se convierte en el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 4,11 (dd, 1H, J=1,3 Hz y 7,3 Hz), 3,79-3,69 (m, 2H), 3,62 (t, 1H, J=12,0 Hz), 3,43 (dd, 1H, J=3,3 Hz y 7,8 Hz), 3,36-3,31 (m, 1H), 2,88 (t, 1H, J=15,0 Hz), 2,06-1,98 (m, 1H), 1,74-1,7 (m, 1H), 1,45-1,40 (m, 14H), 0,99 (t, 3H, J=8,5 Hz); EM (ES+): 260 [M + 1].

25 n. (3R,4R,5R,6S)-5-(Hidroximetil)-6-bencil-3,4-dihidroxipiperidina

De un modo similar al descrito en el ejemplo 1j, 4-(1-amino-2-feniletíl)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo se convierte en el compuesto del título. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 7,42-7,31 (m, 5H), 4,12 (dd, 1H, J=1,3 Hz y 7,5 Hz), 3,88 (dd, 1H, J=2,0 Hz y 7,3 Hz), 3,73-3,66 (m, 1H), 3,58-3,53 (m, 2H), 3,49 (dd, 1H, J=2,3 Hz y 9,3 Hz), 3,26 (dd, 1H, J=2,5 Hz y 13,5 Hz), 2,79 (dd, 1H, J=5,3 Hz y 10,0 Hz), 2,68 (t, 1H, J=15,0 Hz), 1,68 (m, 1H); EM (ES+): 238 [M+1].

30 o. (3R,4R,5R,6S)-5-(Hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina

4-(1-aminodecíl)-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-α-L-xilopiranósido de bencilo (55 mg) se disuelve en THF (2 ml) y se hidrogena sobre 20% de Pd(OH)₂/C (52 mg) a presión atmosférica durante 21 h. La mezcla de reacción se filtra y se concentra dando el producto protegido de isopropilideno (31 mg) como un jarabe amarillo pálido. El jarabe (13 mg) se trata con HCl 1 N (2 ml) durante la noche. El disolvente se elimina a vacío y el residuo se purifica por extracción en fase sólida usando un cartucho de C-18. El residuo se liofiliza en agua (0,5 ml) proporcionando el compuesto del título como espuma blanca. RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD): δ 3,94 (dd, 1H, J=2,1 Hz y 11,4 Hz), 3,60 (dd, 1H, J=2,8 Hz y 11,4 Hz), 3,58-3,51 (m, 1H), 3,45 (t, 1H, J=9 Hz), 3,26 (dd, 1H, J=4,8 Hz y 12,4 Hz), 3,22-3,14 (m, 1H), 2,71 (t, 1H, J=11,6 Hz), 1,88-1,81 (m, 1H), 1,47-1,22 (m, 16H), 0,82 (t, 3H, J=6,4 Hz). EM (ES+): 274 [M+1].

45 EJEMPLO 2: Síntesis de 6-alkil-hidroxipiperidinas usando una estrategia de ligador

a. 4-(1-Aminobut-3-enil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo

50 Se disuelve 4-ciano-4-desoxi-2,3-O-isopropiliden-L(-)-xilopiranósido de bencilo (1,67 g, 5,79 mmoles) en 40 ml de éter anhidro y se agita a temperatura ambiente. Se añade gota a gota bromuro de alilmagnesio (23 ml de disolución 1 M en éter dietílico) y la mezcla de reacción se agita durante 5 h. Se añade NaBH₄ (1,75 g) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche. Se enfría con baño de hielo, se añaden gota a gota metanol (10 ml) y agua (10 ml) y la mezcla se agita durante 30 min. Se añade éter *t*-butilmetílico (100 ml) y el sólido se separa por filtración. El filtrado se transfiere a un embudo de decantación y se lava con agua (2 x 20 ml). La fase orgánica se seca y se evapora usando un rotavapor. El residuo se purifica por cromatografía (CH₂Cl₂/EtOAc 10:1 y luego CH₂Cl₂/MeOH 15:1) dando el compuesto del título (0,674 g, 35%) como un jarabe amarillo pálido. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7,37-7,26 (m, 5H), 5,84-5,77 (m, 1H), 5,24 (d, 1H, J=3,3 Hz), 5,14-5,08 (m, 2H), 4,75 (d, 1H, J=12 Hz), 4,60 (d, 1H, J=12 Hz), 4,30 (dd, 1H, J=4,8 Hz y 10,2 Hz), 3,86 (dd, 1H, J=3,3 Hz y 9,9 Hz), 3,76-3,65 (m, 2H), 3,36-3,29 (m, 1H), 2,49-2,41 (m, 1H), 2,11-1,89 (m, 2H), 1,45 (s, 6H). EM (ES+): 334 [M+1].

60 b. (3R,4R,5R,6S)-6-[(1,3-Dioxolan-2-il)metil]-5-(hidroximetil)-3,4-isopropilidendioxipiperidina

Se trata 4-(1-aminobut-3-enil)-4-desoxi-2,3-isopropiliden-L-xilopiranósido de bencilo con clorofornato de bencilo y luego se lleva a cabo la ozonólisis del alqueno terminal para generar un aldehído. La condensación del aldehído con

etilenglicol da 1,3-dioxolano. La posterior hidrogenación genera el compuesto del título.

c. 2-[(2S,3R,4R,5R)-1-Bencil-4,5-bis(benciloxi)-3-(benciloximetil)piperidin-2-il] acetaldehído

- 5 Se trata (3R,4R,5R,6S)-6-[(1,3-dioxolan-2-il)metil]-5-(hidroximetil)-3,4-isopropilidendioxipiperidina con ácido acético acuoso para escindir selectivamente el acetónido. Tras el tratamiento con bromuro de bencilo se formará el producto de bencilo completamente protegido. El 1,3-dioxolano puede escindirse adicionalmente por ácido trifluoroacético dando el compuesto del título.

- 10 d. (3R,4R,5R,6S)-1-6-[2-(Hexilamino)etil]-5-(hidroximetil)piperidin-3,4-diol

La reacción de 2-[(2S,3R,4R,5R)-1-bencil-4,5-bis(benciloxi)-3-(benciloximetil)piperidin-2-il]acetaldehído con hexilamina en presencia de NaBH₃CN y luego hidrogenación catalítica para eliminar el grupo bencilo dará el compuesto del título.

- 15 EJEMPLO 3: Actividad inhibidora de 6-nonil-HP frente a GCasa

Métodos. La actividad enzimática se ensayó con 4-metilumbeliferil-β-glucósido (concentración final 3 mM) como sustrato en tampón de reacción que consistió en 0,25% de taurocolato de sodio, 0,1% de Triton X-100 en tampón McIlvaine (tampón citrato 0,1 M y fosfato 0,2 M) a pH 5,2. Los compuestos se añadieron a cada mezcla de reacción individualmente a la concentración final indicada. Después de la incubación con la GCasa humana diluida a 37°C durante 30 min, la reacción se detuvo mediante la adición de tampón glicina 0,2 M, pH 10,8, la 4-metilumbeliferona liberada se determinó por un fluorímetro a la longitud de onda de excitación de 355 nm y la longitud de onda de emisión a 460 nm, respectivamente. La actividad enzimática relativa se calculó como porcentaje con respecto a la de reacciones sin inhibidores. La CI₅₀ se calculó usando la representación sigmoide Prism.

Resultados. Se determinó la actividad inhibidora de derivados de 6-alquilo de HP frente a GCasa humana y se resume en la tabla 1. IFG y N-nonil-DNJ son potentes inhibidores conocidos para GCasa con valores de CI₅₀ a aproximadamente 50 nM y 2,5 pM, respectivamente (Fan y col., US1; Sawkar y col., *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99: 15428-33), que se confirmaron (véase la figura 1 para las estructuras). La modificación del grupo imino con cadena de butilo o nonilo disminuyó parcialmente la actividad inhibidora (los valores de CI₅₀ fueron 44 μM, o mayores), que indica que en esa posición se requiere una carga positiva para alta potencia. La adición de un grupo butilo a la posición 6-C del anillo de hidroxipiperidina, 6-C-butil-hidroxipiperidina (11), no afectó la potencia hacia GCasa. Sin embargo, la 6-C-hexil-hidroxipiperidina (12) fue significativamente más potente que la IFG, produciendo un aumento de aproximadamente 13 veces. Por consiguiente, la extensión adicional de la longitud de la cadena de carbono mejoró la potencia (compuestos 13-15). Perceptiblemente, al leer el saber de los inventores, la 6-nonil-hidroxipiperidina (15) es el mejor inhibidor frente a GCasa humana con valor de CI₅₀ a 0,4 nM (figura 2). Esto demuestra que tanto una carga positiva en la posición correspondiente a un carbono anomérico de glucosa como un resto lipófilo extendido desde la posición del oxígeno del anillo de glucosa desempeñan una función importante en la inhibición de GCasa. Como las cadenas de alquilo cortas (C=1-4) de derivados de N-alquilo de DNJ no mejoraron la actividad inhibidora para GCasa, se espera que un resto lipófilo con un ligador (correspondiente a la longitud lineal de aproximadamente 6 o más carbonos) en esa posición sea necesario para la potencia adicional de la actividad inhibidora.

- 45 Tabla 1. Actividad inhibidora frente a GCasa.

Entrada	Inhibidores	CI ₅₀ (nM) ^a	K _i (nM)
	Hidroxipiperidina	56	25
11	6-C-butil-hidroxipiperidina	160	
12	6-C-hexil-hidroxipiperidina	4,2	
13	6-C-heptil-hidroxipiperidina	1,8	
14	6-C-octil-hidroxipiperidina	0,8	
15	6-C-nonil-hidroxipiperidina	0,4	
	N-butil-hidroxipiperidina	44.000	
	N-nonil-hidroxipiperidina	>100.000	
	N-butil-1-desoxinojirimicina	270.000	
	N-nonil-1-desoxinojirimicina	1.800	

^a Todas las actividades inhibidoras se determinaron con 4-metilumbeliferil-β-glucósido a concentración 3 mM.

La estructura de rayos X de GCasa humana sugiere un anillo de residuos hidrófobos que rodea la entrada al sitio

activo (Dvir y col., EMBO reports 2003; 4:1-6). Esto también refuerza el presente descubrimiento de que un resto lipófilo con un cadena flexible corta interactuaría con los residuos hidrófobos de aminoácidos en la entrada de la bolsa catalítica, y contribuiría a la actividad inhibidora.

- 5 Aunque la adición de una cadena de alquilo más corta a la HP, por ejemplo, 6-butil-HP, no gana potencia adicional con respecto a HP (o IFG), sin embargo, todavía son potentes inhibidores de GCasa.

EJEMPLO 4: Actividad de chaperona de 6-nonil-HP para GCasa en células de Gaucher

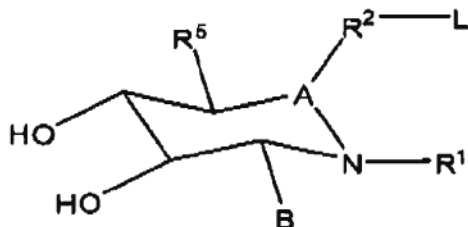
- 10 Métodos. Fibroblastos establecidos de pacientes con Gaucher con la mutación N370S/N370S se cultivaron en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos a 37°C bajo 5% de CO₂. El C-nonil-HP o IFG se añadió al medio de cultivo a las concentraciones finales como se indica durante 4 días antes del ensayo. Después de lavar las células con solución salina tamponada con fosfato, las células se recogieron y se homogeneizaron en presencia de 0,25% (peso/volumen) de taurocolato de sodio y 0,1% (volumen/volumen) de Triton X-100 en tampón McIlvaine (pH 5,2, tampón de reacción), y se usaron 10 l del lisado para la determinación de la actividad enzimática residual. La actividad de GCasa se determinó con 4-MU-β-Glc 3 mM en el tampón de reacción a 37°C durante 1 h como actividad sensible a epóxido de conduritól B (CBE) en ensayos paralelos sin o con pre-incubación con CBE a 1,25 mM durante 30 min a temperatura ambiente. Las concentraciones de proteína en los lisados celulares se determinaron usando el kit de ensayo de proteínas micro BCA de Pierce.

- 20 Resultados. Con el fin de examinar la capacidad de los compuestos novedosos para rescatar la actividad enzimática mutante de la degradación en el RE, los inhibidores de GCasa anteriormente descritos, 6-nonil-HP e IFG, se añadieron a diversas concentraciones en el medio de cultivo de fibroblastos establecido de paciente con Gaucher con la mutación N370S homocigótica. Se mostró que la actividad enzimática residual en células de paciente cultivadas con inhibidores aumentó aproximadamente 2 veces, aunque la concentración óptima de cada compuesto varió según su potencia de la actividad inhibidora (figura 5). 6-Nonil-HP tiene la menor concentración óptima para su actividad de chaperona a aproximadamente 3 nM, mientras que la concentración óptima de IFG se encontró que era 30 μM. Se ha demostrado que la concentración óptima para la actividad de chaperona depende de la potencia de la actividad inhibidora y la biodisponibilidad (Fan y col., *Trends Pharmacol Sci.* 2003; 24:355-60). La combinación de la mayor actividad inhibidora y la buena permeabilidad de C-nonil-HP puede contribuir a la menor concentración óptima como una chaperona para la actividad de GCasa en enfermedad de Gaucher.

- 35 Los derivados de 6-alquilo de HP con cadenas más cortas, es decir, inferiores a 6 carbonos, no son tan potentes como los derivados de 6-alquilo de HP con cadenas más largas, aunque mantienen una potencia comparable al compuesto parental, es decir, HP o IFG. Estos compuestos con cadenas de 6-alquilo más cortas pueden ser mejores ASSC que el compuesto parental debido a que son más lipohidrófilos, que pueden aumentar su biodisponibilidad y bioaccesibilidad con respecto al compuesto parental.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



5

en la que:

A es un carbono;

10

B es un hidrógeno;

R¹ es un hidrógeno;

15

R² es un alquilo C₁-C₆ opcional;

R⁵ es un hidroximetilo; y

20

L es un alquilo C₁-C₁₂ o arilo;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

2. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (3R,4R,5R,6S)-5-(hidroximetil)-6-n-butil-3,4-dihidroxipiperidina.

25

3. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (3R,4R,5R,6S)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-dihidroxipiperidina.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (3R,4R,5R,6S)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-dihidroxipiperidina.

30

5. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (3R,4R,5R,6S)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-dihidroxipiperidina.

6. Un compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto es (3R,4R,5R,6S)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina.

35

7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un método de potenciar en una célula de mamífero la actividad de glucocerebrosidasa, que comprende poner en contacto las células con un compuesto como se expone en la reivindicación 1 en una cantidad eficaz para potenciar la actividad de glucocerebrosidasa, y en el que la cantidad eficaz no inhibe la actividad de glucocerebrosidasa.

40

8. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se expone en la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en un método para tratar la enfermedad de Gaucher.

10. Un compuesto según la reivindicación 9, en el que el tratamiento comprende además administrar al individuo enzima glucocerebrosidasa.

50

11. Un compuesto según la reivindicación 9, en el que el tratamiento comprende además administrar al individuo una glucocerebrosidasa funcional de vector.

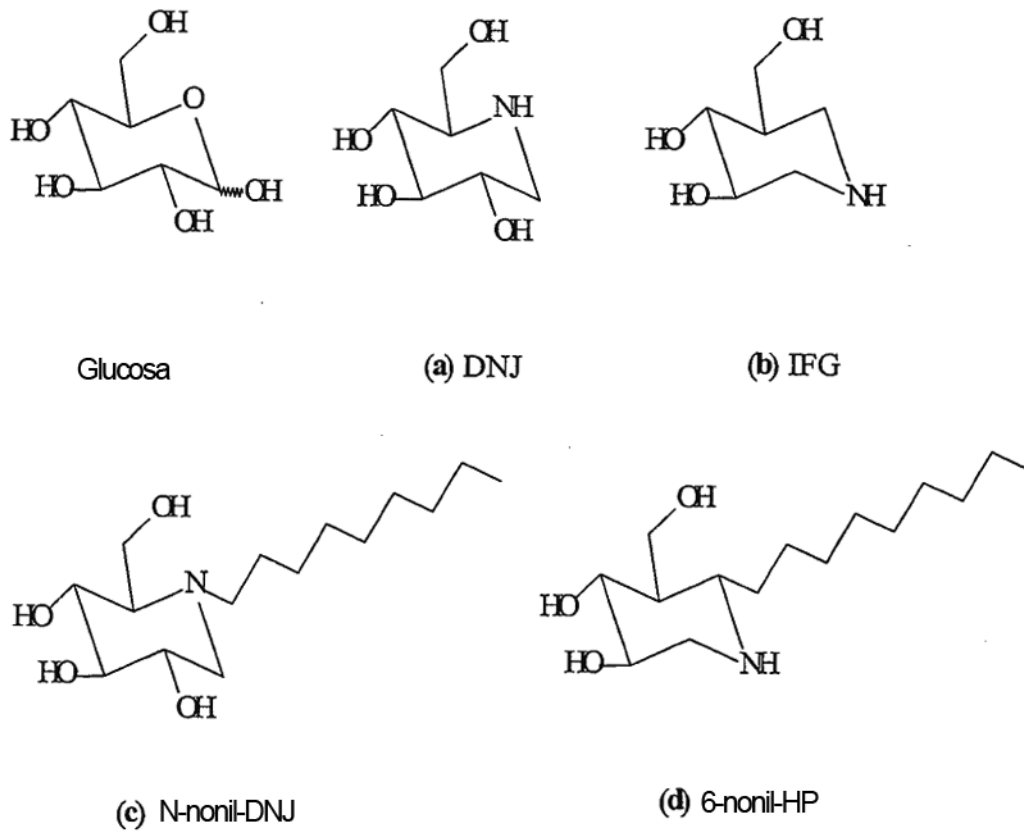


Figura 1

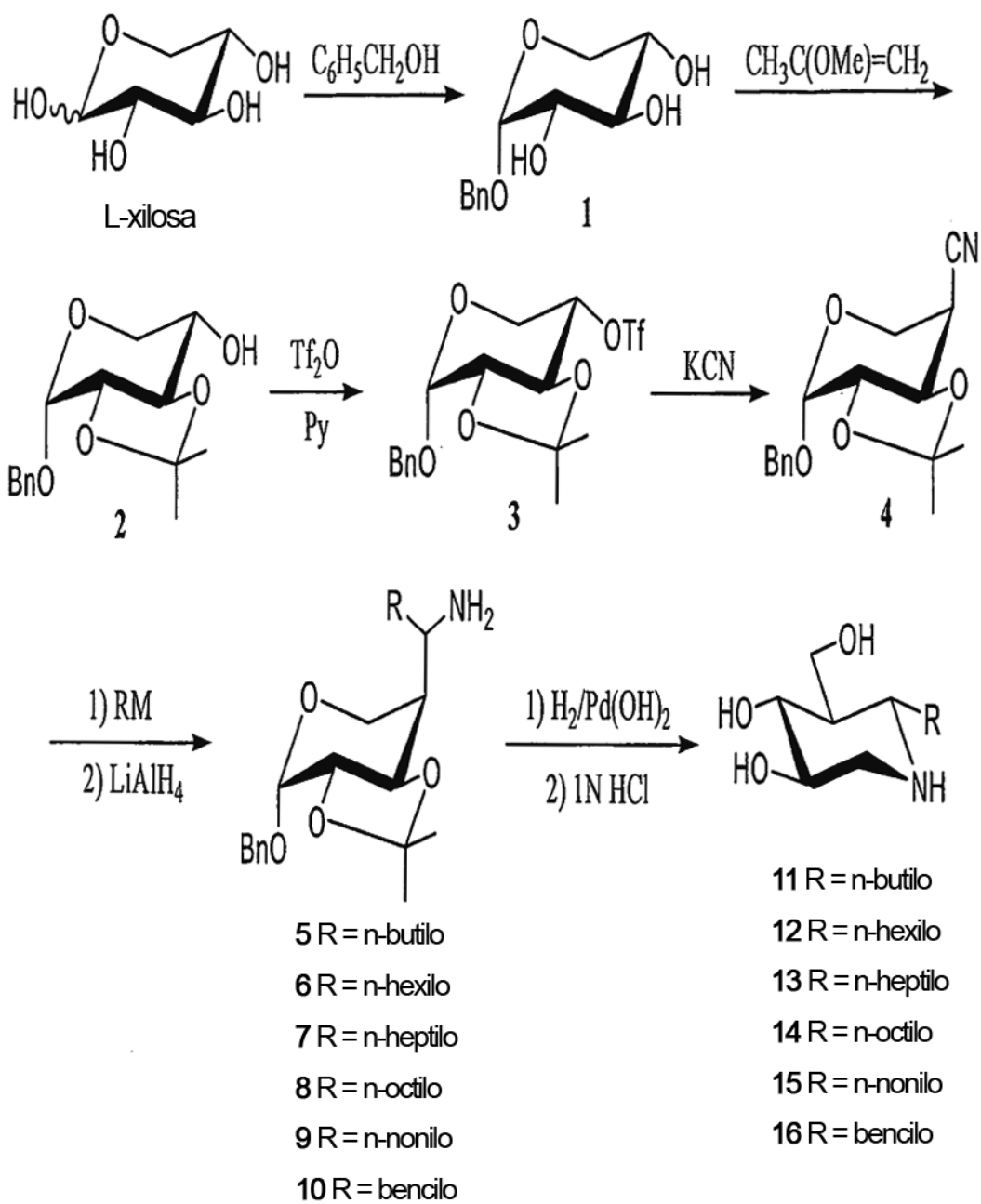


Figura 2

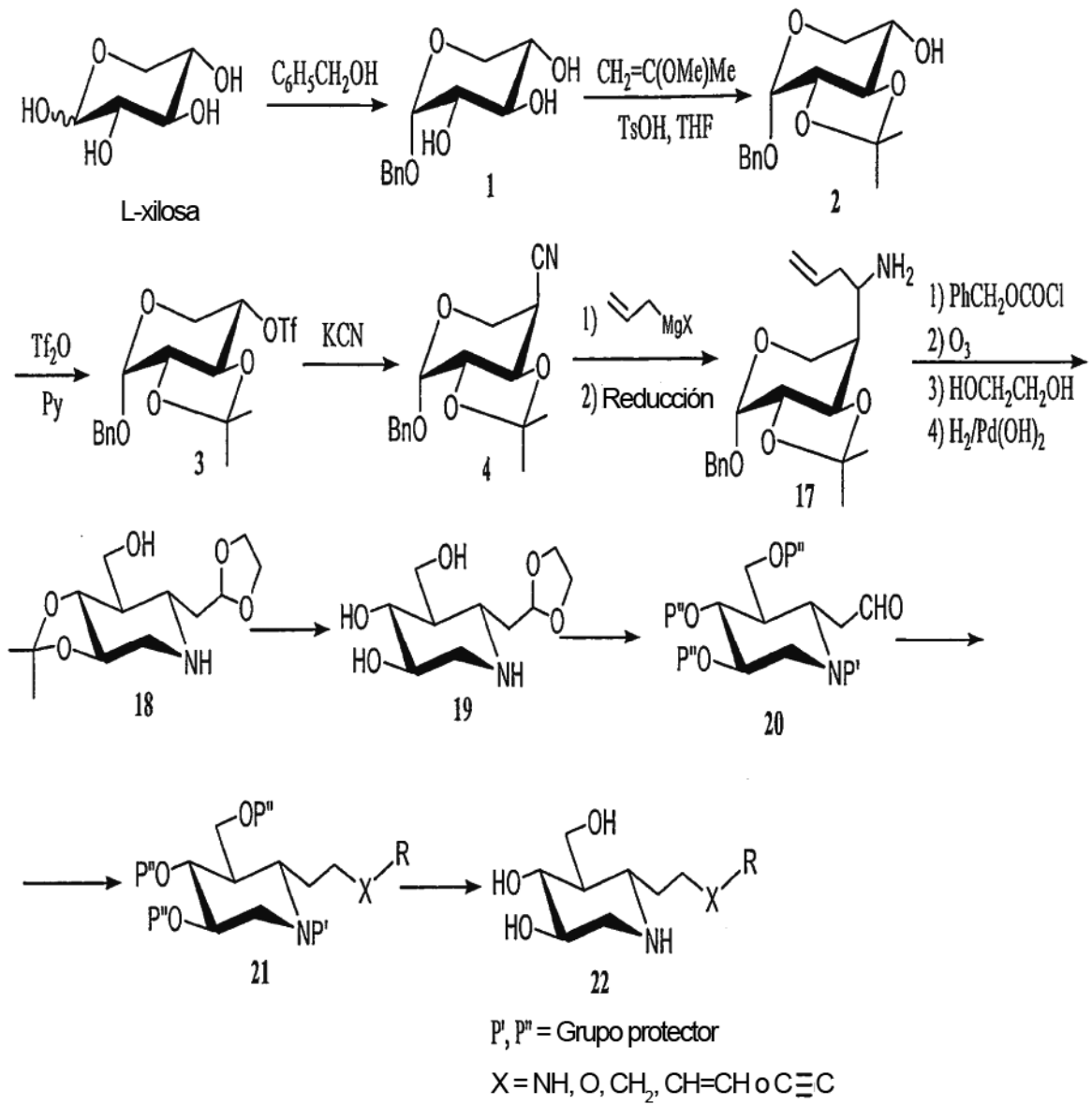


Figura 3

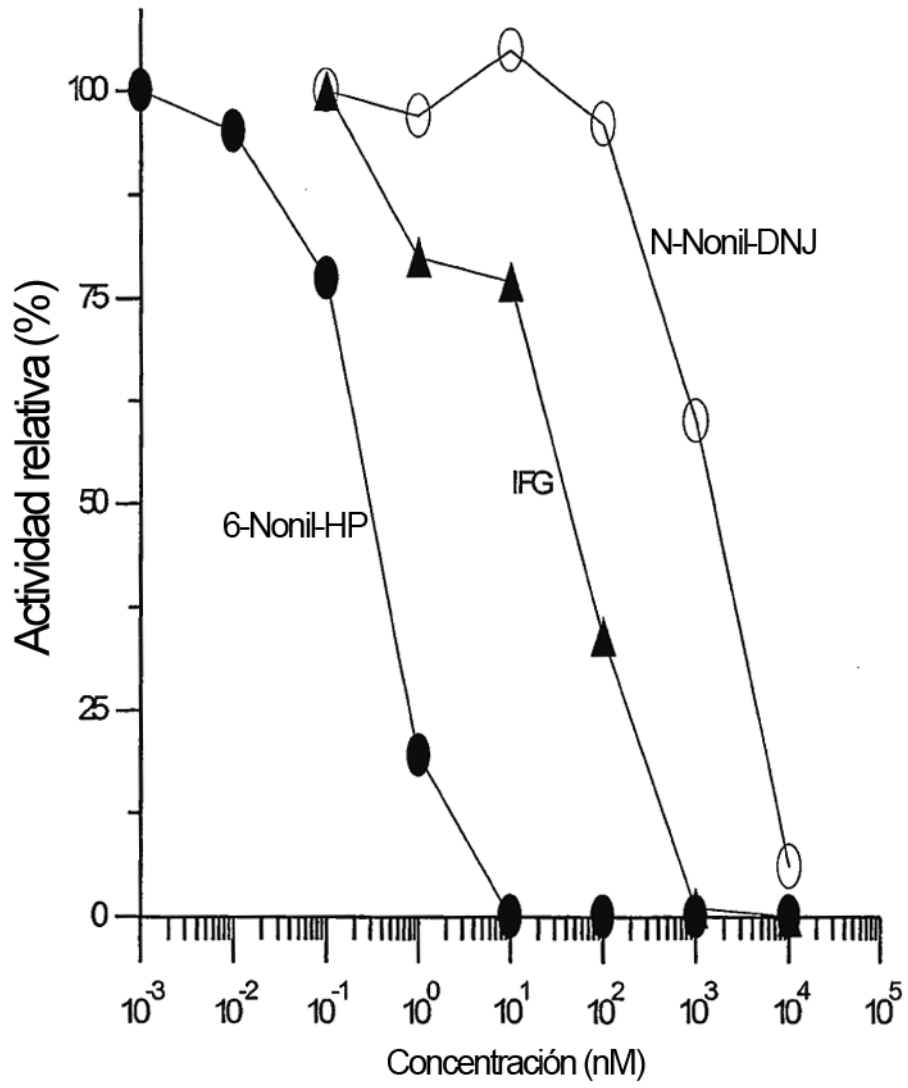


Figura 4

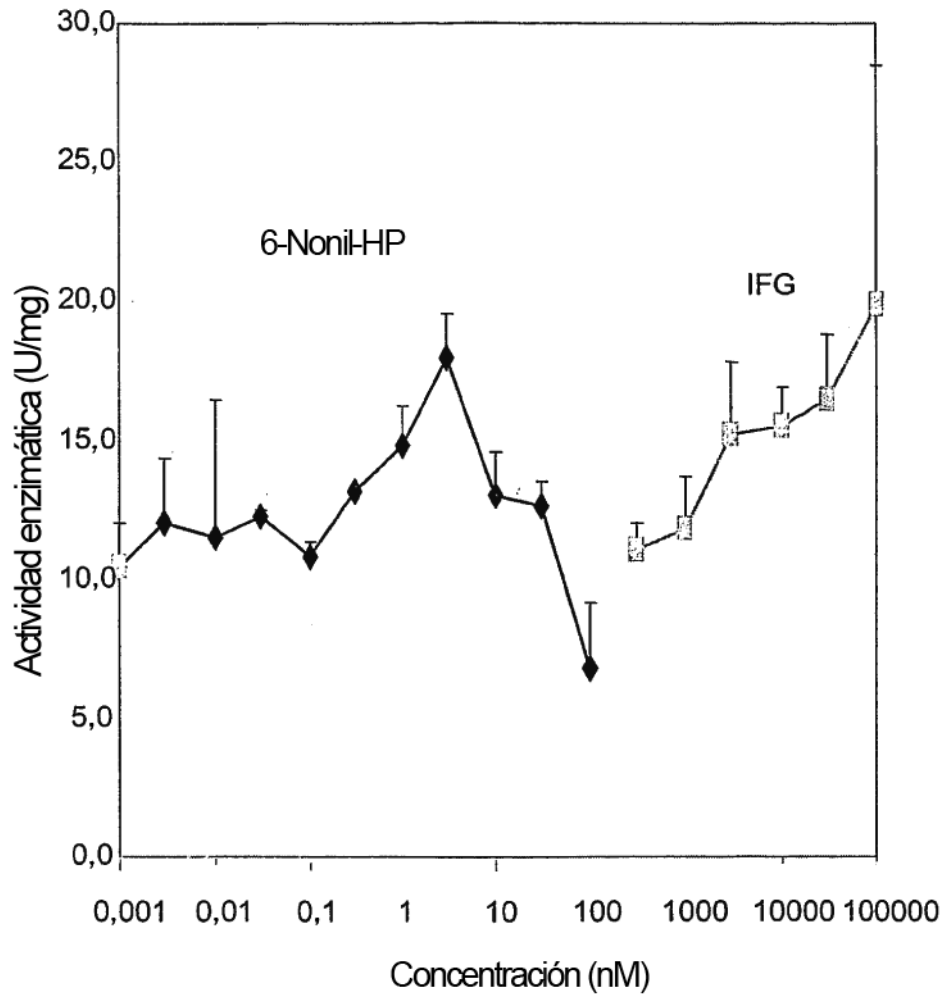


Figura 5