

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 243**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/40** (2006.01)

**A61K 31/445** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61P 25/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2010 E 10762468 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2416655**

54 Título: **Agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar trastornos degenerativos del sistema nervioso central**

30 Prioridad:

**09.04.2009 US 168101 P**

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

**09.10.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BOYD, ROBERT y  
LEE, GARY**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 505 243 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

Agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar trastornos degenerativos del sistema nervioso central

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar trastornos degenerativos del sistema nervioso central usando 5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol, 5-(clorometil)piperidin-3,4-diol, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o cualquier combinación de dos o más de los mismos. En particular, la presente invención proporciona agentes terapéuticos para prevenir y/o tratar enfermedad de Parkinson.

Antecedentes de la invención

10 Muchos trastornos degenerativos del sistema nervioso central están asociados con agregación patológica de proteínas o lípidos. Por ejemplo, las sinucleinopatías son un grupo de enfermedades que surgen de la interrupción de la homeostasis de la proteína sinucleína. En particular, la agregación de alfa-sinucleína está asociada con estados patológicos caracterizados por cuerpos de Lewy, tales como enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, y atrofia multisistémica. Igualmente, se encuentra fragmento de alfa-sinucleína, componentes no Abeta, en placas amiloides de la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, se ha mostrado que la potenciación de la actividad de glucocerebrosidasa (beta-glucosidasa; GCasa) en el cerebro previene la acumulación de sinucleína en el cerebro (Sean Clark, Ying Sun, You-Hai Xu, Gregory Grabowski, y Brandon Wustman, "A biochemical link between Gaucher and Parkinson's disease and a potential new approach to treating synucleinopathies: a pharmacological chaperone for beta-glucocerebrosidase prevents accumulation of alpha-synuclein in a Parkinson's mouse model", presentado en la Society for Neuroscience Annual Meeting, San Diego, CA, 2007). De este modo, los agentes que potencian la actividad de GCasa pueden proporcionar alivio para pacientes en riesgo de desarrollar o diagnosticados con trastornos degenerativos del sistema nervioso central.

15 Existe la necesidad de métodos para prevenir y/o tratar trastornos degenerativos del sistema nervioso central que proporcionen a los pacientes una mayor calidad de vida y logren un resultado clínico mejor. En particular, existe una necesidad de métodos para prevenir y/o tratar sinucleinopatías, tales como enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer, que proporcionen a los pacientes una mayor calidad de vida y logren un resultado clínico mejor.

20 El documento US 2008/009156 describe un método para incrementar la estabilidad de beta-glucocerebrosidasa de tipo salvaje. También se proporcionan métodos para tratar y/o prevenir a un individuo que tiene una enfermedad neurológica en la que sería beneficiosa una mayor expresión o actividad de beta-glucocerebrosidasa en el sistema nervioso central. Este método comprende administrar una cantidad eficaz de una chaperona farmacológica para beta-glucocerebrosidasa, con la condición de que el individuo no tenga una mutación en el gen que codifica beta-glucocerebrosidasa. Se proporcionan además inhibidores de beta-glucocerebrosidasa que se han identificado como chaperonas farmacológicas específicas y que se ha mostrado que incrementan la actividad de beta-glucocerebrosidasa in vivo en el sistema nervioso central.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona un agente terapéutico que es 5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o 5-(clorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o cualquier combinación de dos o más de los mismos para uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno degenerativo del sistema nervioso central en un paciente con riesgo de desarrollar o diagnosticado con el mismo.

40 En una realización, el agente terapéutico es (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el agente terapéutico es (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 El trastorno degenerativo se selecciona del grupo que consiste en sinucleinopatía, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y enfermedad de Alzheimer. Como alternativa, el trastorno degenerativo se puede caracterizar por cuerpos de Lewy. Como alternativa, el trastorno degenerativo se puede asociar con agregación del componente no Abeta o alfa-sinucleína. Como alternativa, el trastorno degenerativo está asociado con acumulación de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en glucoesfingolípido y glucolípido.

50 En una realización, el agente terapéutico se administra en combinación con al menos algún otro agente terapéutico. En este caso, el al menos algún otro agente terapéutico puede ser levodopa, un anticolinérgico, un inhibidor de catecol-O-metil transferasa, un agonista del receptor de dopamina, un inhibidor de monoamina oxidasa, un inhibidor de descarboxilasa periférica, o un agente antiinflamatorio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A ilustra los niveles plasmáticos del compuesto de referencia, IFG, y del compuesto de ensayo,

(3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol (denominado aquí como Compuesto A), en ratones a los que se les ha administrado una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de tartrato de IFG o de la forma de la sal de hidrocloreuro de Compuesto A.

5 La Figura 1B ilustra los niveles cerebrales del compuesto referencia, IFG, y del compuesto de ensayo, Compuesto A, en ratones a los que se les ha administrado una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de tartrato de IFG o de la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A.

La Figura 1C ilustra la relación de los niveles cerebral a plasmático del compuesto referencia, IFG, y del compuesto de ensayo, Compuesto A, en ratones a los que se les ha administrado una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de tartrato de IFG o de la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A.

10 La Figura 2 ilustra los niveles cerebrales del compuesto referencia, IFG, y del compuesto de ensayo, (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol (denominado aquí como Compuesto B), en ratones a los que se les ha administrado una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de tartrato de IFG o de base libre de Compuesto B.

15 Las Figuras 3A-D ilustran el nivel de GCasa en cerebro, bazo, hígado y pulmón, respectivamente, de ratones C57BL/6 sometidos a una administración de un régimen de dosificación de 2 semanas que consiste en nueve dosis de (i) vehículo de control; (ii) 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de referencia, tartrato de IFG; o (iii) 10 ó 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A. Obsérvese que los valores que aparecen debajo de las barras en estas figuras representan el incremento en número de veces con respecto al control. Igualmente, en estas figuras, el símbolo “\*” representa prueba de la t de  $p < 0,05$  en comparación con el control, y el símbolo “#” representa la prueba de la t de  $p < 0,05$  en comparación con ratones tratados con el compuesto de referencia, tartrato de IFG.

20 Las Figuras 4A-D ilustran el nivel de GCasa en cerebro, bazo, hígado y pulmón, respectivamente, de ratones C57BL/6 sometidos a una administración de un régimen de dosificación de 2 semanas que consiste en nueve dosis de (i) vehículo de control; (ii) 10 o 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de referencia, tartrato de IFG; o (iii) 1, 3, 10, 30 ó 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A. Obsérvese que los valores que aparecen debajo de las barras en estas figuras representan el incremento en número de veces con respecto al control. Igualmente, en estas figuras, el símbolo “\*” representa prueba de la t de  $p < 0,05$  en comparación con el control, y el símbolo “#” representa la prueba de la t de  $p < 0,05$  en comparación con ratones tratados con el compuesto de referencia, tartrato de IFG.

25 Las Figuras 5A-D ilustran el nivel de GCasa en cerebro, bazo, hígado y pulmón, respectivamente, de ratones C57BL/6 sometidos a una administración de un régimen de dosificación de 2 semanas que consiste en nueve dosis de (i) vehículo de control; (ii) 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de referencia, tartrato de IFG; o (iii) 10 ó 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de ensayo, Compuesto B. Obsérvese que los valores que aparecen debajo de las barras en estas figuras representan el incremento en número de veces con respecto al control. Igualmente, en estas figuras, el símbolo “\*” representa prueba de la t de  $p < 0,05$  en comparación con el control, y el símbolo “#” representa la prueba de la t de  $p < 0,05$  en comparación con ratones tratados con el compuesto de referencia, tartrato de IFG.

30 La Figura 6A ilustra el nivel plasmático del compuesto de ensayo, Compuesto A, en ratas a las que se les administra una dosis intravenosa única de 3 mg/kg (equivalente de base libre) de la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A.

35 La Figura 6B ilustra el nivel plasmático de Compuesto A en ratas a las que se les administra una única dosis p.o. de 10, 30, o 300 mg/kg (equivalente de base libre) de la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A.

Descripción detallada de la invención

Como se usa aquí, los siguientes términos deben tener las definiciones expuestas más abajo.

45 Como se usa aquí, la frase “trastorno degenerativo del sistema nervioso central” significa cualquier trastorno asociado con la degeneración prematura de cualquier componente del sistema nervioso central, tal como neuronas, vainas de mielina o axones. Tales trastornos incluyen, pero no se limitan a, demencia multiinfarto, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, degeneración del lóbulo frontal, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica, o enfermedad de Alzheimer.

50 Como se usa aquí, el término “tratar” significa mejorar uno o más síntomas asociados con el trastorno citado.

Como se usa aquí, el término “prevenir” significa mitigar un síntoma del trastorno citado.

Como se usa aquí, la frase “una cantidad eficaz” significa una cantidad eficaz para prevenir y/o tratar un paciente en riesgo de desarrollar o diagnosticado con el trastorno citado, y de este modo producir el efecto terapéutico deseado.

Como se usa aquí, el término “paciente” significa un mamífero (por ejemplo, un ser humano).

La enfermedad de Parkinson se puede diagnosticar en pacientes según los criterios de diagnóstico clínico del banco de cerebros de la United Kingdom Parkinson's Disease Society (véase Hughes et al., Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55:181-184) y/o los criterios descritos por Gelb et al., Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease. *Arch Neurol.* 1999; 56(1):33-39. Igualmente, la gravedad de la enfermedad de Parkinson se puede averiguar usando la Escala de Clasificación de la Enfermedad de Parkinson Unificada. Véase, por ejemplo, Fahn y Elton, miembros del Comité para el Desarrollo de la Escala de Clasificación de la Enfermedad de Parkinson's Unificada. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. En: Fahn et al., Recent developments in Parkinson's disease. Nueva York: Macmillan, 1987: 153-163.

La enfermedad de Alzheimer se puede diagnosticar en pacientes según los criterios para demencia del tipo Alzheimer del Manual de Diagnóstico y Estadístico de Enfermedades Mentales, 4ª ed.: DSM-IV. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1994. Igualmente, los criterios para la enfermedad de Alzheimer probable se pueden averiguar basándose en criterios del National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke y la Alzheimer's Disease and Related Disorders Association. Véase también, McKhann et al., Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDSADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34:939-944.

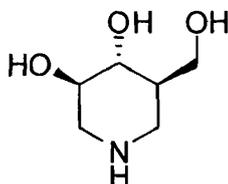
La atrofia multisistémica (MSA) se caracteriza por cuerpos de inclusiones citoplásmicas gliales (también conocidos como cuerpos de Papp-Lantos) en los centros de control del movimiento, del equilibrio y automático del cerebro. El primer signo más habitual de MSA es la aparición de un "síndrome rígido acinético" (es decir, lentitud para iniciar el movimiento, que se asemeja a la enfermedad de Parkinson) encontrado en el 62% en la primera presentación. Otros signos habituales en el comienzo incluyen problemas con el equilibrio (encontrados en el 22%), seguido de problemas genitourinarios (9%). Para los hombres, el primer signo puede ser disfunción eréctil (incapaz de lograr o sostener una erección). Tanto hombres como mujeres experimentan a menudo problemas con sus vejigas, incluyendo tenesmo vesical, polaquiuria, vaciamiento incompleto de la vejiga, o incapacidad para hacer pasar la orina (retención). Alrededor de 1 de 5 pacientes con MSA sufrirán una caída en su primer año de enfermedad. A medida que progresa la enfermedad, predominan tres grupos de síntomas. Éstos son: (i) parkinsonismo (movimiento lento, rígido, el que la escritura se hace pequeña y enmarañada); (ii) disfunción cerebelosa (dificultad para coordinar el movimiento y el equilibrio); y (iii) disfunción autonómica (funciones corporales automáticas alteradas) incluyendo: hipotensión postural u ortostática, que da como resultado mareo o desmayo al ponerse de pie, incontinencia urinaria, impotencia; estreñimiento; boca y piel secas; problemas para regular la temperatura corporal debido a sudoración anormal; respiración anormal durante el sueño. De forma notable, no todos estos síntomas son experimentados por todos los pacientes.

La demencia con cuerpos de Lewy (DLB) es uno de los tipos más habituales de demencia progresiva. El rasgo central de DLB es el deterioro cognitivo progresivo, combinado con tres rasgos definitorios adicionales: (1) "fluctuaciones" notables en la lucidez y atención, tal como somnolencia frecuente, letargo, períodos prolongados de tiempo gastados en mirar fijamente al espacio, o discurso desorganizado; (2) alucinaciones visuales recurrentes; y (3) síntomas motores parkinsonianos, tal como rigidez y la pérdida del movimiento espontáneo. Las personas también pueden sufrir depresión. Los síntomas de la DLB son provocados por la acumulación de cuerpos de Lewy – trozos acumulados de proteína alfa-sinucleína – en el interior de los núcleos de neuronas en áreas del cerebro que controlan aspectos particulares de la memoria y el control motor. Los investigadores no saben exactamente por qué la alfa-sinucleína se acumula en los cuerpos de Lewy, o cómo los cuerpos de Lewy provocan los síntomas de la DLB, pero sí saben que la acumulación de alfa-sinucleína también está relacionada con la enfermedad de Parkinson, atrofia multisistémica, y otros trastornos diversos, que se denominan las "sinucleinopatías". La similitud de los síntomas entre DLB y la enfermedad de Parkinson, y entre DLB y la enfermedad de Alzheimer, a menudo puede hacer difícil a un médico realizar un diagnóstico definitivo. Además, los cuerpos de Lewy también se encuentran a menudo en los cerebros de personas con enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. Estos hallazgos sugieren que DLB está relacionada con estas otras causas de demencia, o que un individuo puede tener ambas enfermedades al mismo tiempo. DLB aparece habitualmente de forma esporádica en personas sin antecedentes familiares conocidos de la enfermedad. Sin embargo, se han dado a conocer ocasionalmente casos familiares raros.

Síntesis químicas

a. Isofagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidindiol)

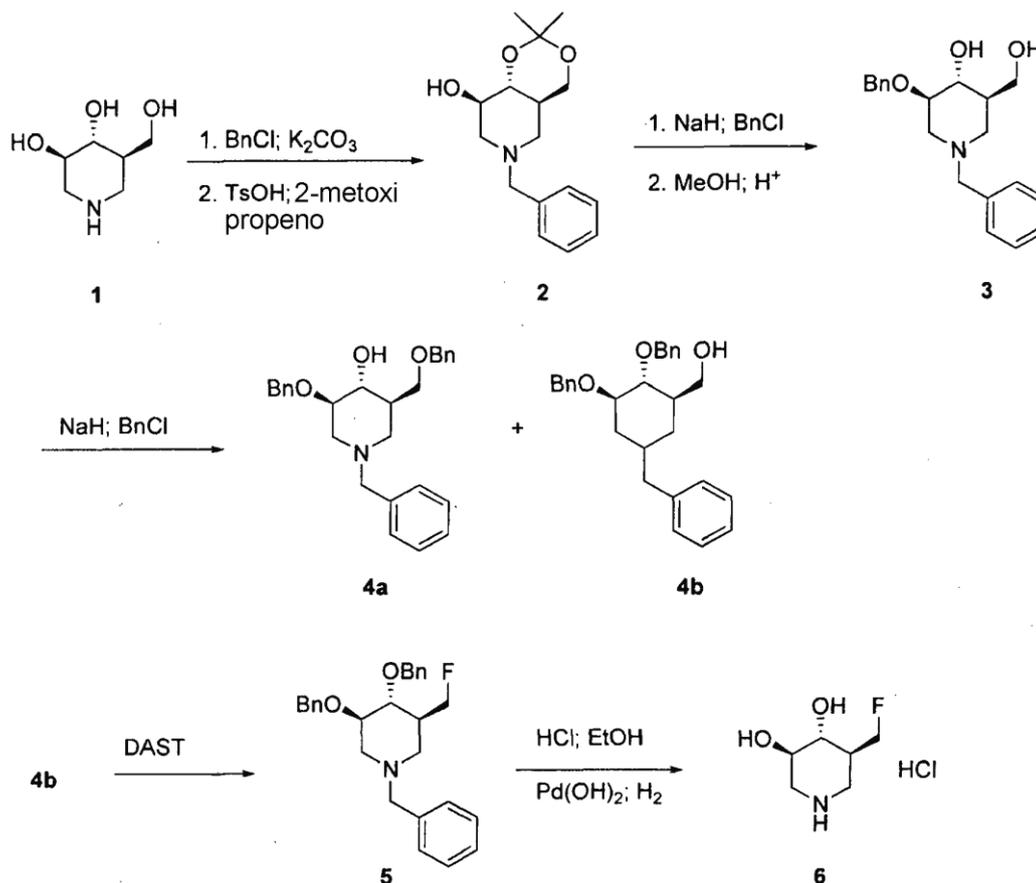
Isofagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidindiol) se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura:



La síntesis de isofagomina se describe en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.844.102 de Sierks et al. en la columna 17, línea 53 hasta columna 20, línea 6, y 5.863.903 de Lundgren et al. en el Ejemplo 1, en la columna 5, línea 20 hasta columna 7, línea 33. Al tartrato de isofagomina, también conocido como IFG y Plicera<sup>TM</sup>, se le ha asignado el número CAS 919364-56-0. La preparación de tartrato de isofagomina se describe en el documento US2007/0281975I en los párrafos [0046] hasta [0050], y la purificación de tartrato de isofagomina se describe en los párrafos [0051] hasta [0053].

5

b. Síntesis de hidrocloreto de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol



(4aR,8R,8aR)-6-bencil-2,2-dimetilhexahidro-4H-[1,3]dioxino[5,4,c]piperidin-8-ol (2).

10 A una disolución de (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)piperidin-3,4-diol (1) (5,9 g, 40,0 mmoles) en DMF seca (75 ml) se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6,4 g, 46,0 mmoles) seguido de cloruro de bencilo (4,8 ml, 42,0 mmoles), y la mezcla resultante se calentó hasta 70°C durante 14 h, en cuyo momento el material de partida no se pudo detectar mediante tlc. El disolvente se evaporó a vacío, y el residuo se volvió a disolver en una cantidad mínima de agua. La disolución se extrajo 10-12x con EtOAc, y los extractos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtraron. El filtrado se evaporó a vacío para dar el compuesto del título (7,5 g, 79%) como un sólido bronceado, que se pudo usar sin purificación adicional. El sólido bronceado se disolvió en DMF (75 ml), y se añadió ácido toluenosulfónico (6,7 g, 35,0 mmoles) seguido de 2-metoxipropeno (7,2 ml, 75,0 mmoles), y la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Después de agitar toda la noche se añadieron 7,2 ml adicionales de 2-metoxipropeno, y la mezcla se agitó nuevamente toda la noche a temperatura ambiente. En este momento no se pudo detectar material de partida mediante tlc. Se añadió hidróxido de sodio (50% ac., 5 ml) a la mezcla de reacción, y el disolvente se evaporó a vacío. El residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. Los lavados acuosos se combinaron y se lavaron 1x con EtOAc. Esto se combinó con los extractos originales, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el disolvente se evaporó para dar un sólido ceroso. Este sólido se puede usar directamente en la etapa siguiente. Se puede obtener una muestra analítica a partir de cromatografía (0 hasta 5% (MeOH/NH<sub>4</sub>OH 9/1) en CHCl<sub>3</sub>) para obtener el compuesto del título. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 1,35 (s, 3H), 1,39 (s, 3H), 1,66 (t, 1 H), 1,83 (m, 1H), 1,95 (t, 1 H), 2,56 (ddd, 1H), 3,03 (ddd, 1 H), 3,30 (t, 1 H), 3,6-3,8 (m, 5H), 7,27 (m, 5H).

25

(3R,4R,5R)-1-bencil-3-(benziloxi)-5-(hidroximetil)piperidin-4-ol (3).

A una disolución de 2 (4,4 g, 15,9 mmoles) en DMF (50 ml) se añadió NaH al 95% (0,43 g, 17,9 mmoles) y la mezcla resultante se agitó 1 h en N<sub>2</sub>. Después se añadió cloruro de bencilo (1,9 ml, 16,3 mmoles), y la mezcla se agitó toda la noche a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 14 h, la DMF se evaporó a vacío. El residuo se

30

disolvió en EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera, y después se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el filtrado se evaporó a vacío para dar el producto bruto. La cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 0-25% de EtOAc/hexano dio 2,1 g de una espuma blanca. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 1,15 (m, 1 H), 1,19 (s, 3H), 1,39 (s, 3H), 1,9-2,05 (m, 4H), 2,53 (ddd, 1 H), 3,04 (ddd, 1 H), 3,3 (s, 1 H), 3,45-3,8 (m, 4H), 7,2 (m, 10H). Ésta se disolvió en MeOH (100 ml), y se añadieron 1,5 ml de HCl 6N en 2-PrOH, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de 1 h, el material de partida había desaparecido según se juzgó mediante tlc. El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% y se extrajo con EtOAc (2x). Los extractos combinados se lavaron con una pequeña porción de agua y después con salmuera, y se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el filtrado se evaporó para dar el compuesto del título (1,7 g, 33%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 1,6-1,95 (m, 3H), 2,63 (ddd, 1H), 3,00 (ddd, 1H), 3,25-3,65 (m, 5H), 4,35 (d, 1 H), 4,5 (d, 1 H), 7,2 (m, 10H).

((3R,4R,5R)-1-bencil-4,5-bis(benciloxi)-piperidin-3-il)metanol (4b).

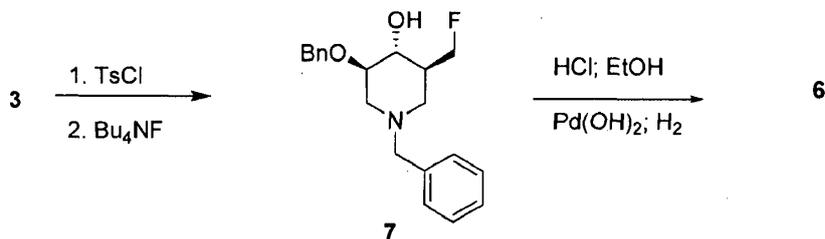
A una disolución de **3** (1,1 g, 3,36 mmoles) en DMF (10 ml), se añadió NaH (0,10 g, 4,0 mmoles), y la reacción se agitó 30 minutos a temperatura ambiente en cuyo momento se añadió cloruro de bencilo (0,38 ml, 3,3 mmoles), y la reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó a vacío, y el residuo se disolvió en EtOAc y se lavó con agua y después con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el filtrado se evaporó para dar una mezcla de **4a** y **4b** (aproximadamente una mezcla 2/1). La mezcla se cromatografió sobre gel de sílice eluyendo con 0-50% de EtOAc/hexano. Las fracciones que correspondían al regioisómero principal se combinaron para dar **4a** (0,49 g, 35%) como un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 1,81 (t, 2H), 1,96 (m, 1H), 2,80 (m, 1 H), 3,05 (ddd, 1 H), 3,3-3,6 (m, 6H), 4,41 (s, 2H), 4,55 (q, 2H), 7,2 (m, 15H). Las fracciones del regioisómero secundario se combinaron para dar **4b** (0,23 g, 16%) como un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 1,8-2,0 (m, 3H), 2,72 (dd, 1 H), 3,05 (ddd, 1H), 3,27 (t, 1 H), 3,4-3,6 (m, 4H), 3,65 (m, 1H), 4,56 (s, 2H), 4,60 (d, 1 H), 4,90 (d, 1H), 7,2 (m, 15H).

(3R,4R,5R)-1-bencil-3,4-bis(benciloxi)-5-(fluorometil)piperidin-4-ol (5).

Una disolución de **4b** (0,32 g, 0,77 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml) se enfrió hasta -15 a -20°C en un baño de agua con sal/hielo. A esto se añadió trifluoruro de (dietilamino)azufre (0,15 ml, 1,15 mmoles), y la reacción se dejó agitar durante alrededor de 20 minutos en cuyo momento el material de partida se consumió según se juzgó mediante tlc. La reacción se paralizó mediante la adición de NaHCO<sub>3</sub>, y la mezcla se extrajo con EtOAc (2x). Los extractos combinados se lavaron con salmuera y después se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el filtrado se evaporó para dar el producto bruto. La cromatografía en gel de sílice (0-25% de EtOAc/hexano) produjo el producto deseado (0,2 g, 63%) como un aceite incoloro. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) 1,9-2,15 (m, 3H), 2,88 (dd, 1 H), 3,12 (ddd, 1 H), 3,36 (t, 1 H), 3,55 (d, 1 H), 3,65 (m, 1 H), 4,3-4,6 (m, 3H), 4,63-4,65 (m, 3H), 4,95 (d, 1H), 7,2 (m, 15H).

Hidrocloruro de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol (6).

A una disolución de **5** (0,24 g, 0,57 mmoles) en EtOH (40 ml) se añadió 0,5 ml de HCl 6N en 2-PrOH. El disolvente se evaporó a vacío y después se co-evaporó 2x más con EtOH. El residuo se disolvió en EtOH y se hidrogenó a 55 psi usando Pd(OH)<sub>2</sub> como catalizador. Después de 14 h, el material de partida ya no se podía detectar, y la disolución se filtró, y el filtrado se evaporó a vacío. El residuo se trituró con acetona y después se filtró para dar sólido blancuzco (0,09 g, 85%) como el compuesto del título. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) 1,95-2,05 (m, 1H), 2,65 (t, 1 H), 2,85 (t, 1 H) 3,15-3,4 (m, 3H), 3,55 (m, 1 H), 4,55 (m, 1 H), 4,65 (m, 1 H), 5,45-5,6 (dd, 2H), 9,05 (br s, 2H).



(3R,4R,5R)-1-bencil-3-(benciloxi)-5-(fluorometil)piperidin-4-ol (7).

A una disolución de **3** (26,0 g, 79,5 mmoles) disuelta en piridina (300 ml) y enfriada en un baño de hielo se añadió TsCl (16,6 g, 87,5 mmoles) en porciones. Después de que la adición estuvo terminada, la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó toda la noche. El disolvente se evaporó a vacío, y el residuo se disolvió en EtOAc. La disolución se lavó con agua (2x) y después con salmuera y después se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el filtrado se evaporó a vacío para dar el producto bruto que se secó a alto vacío. El residuo se disolvió en THF (400 ml), y se añadió Bu<sub>4</sub>NF 1,0 M (100 mmoles, 100 ml), y la mezcla se calentó a reflujo. Después de 2 h, no quedaba material de partida. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con agua (2x) y después con salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtró, y el filtrado se evaporó a vacío. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (25% de EtOAc/hexano) para dar el compuesto del título (7,5 g, 29% durante 2 etapas).

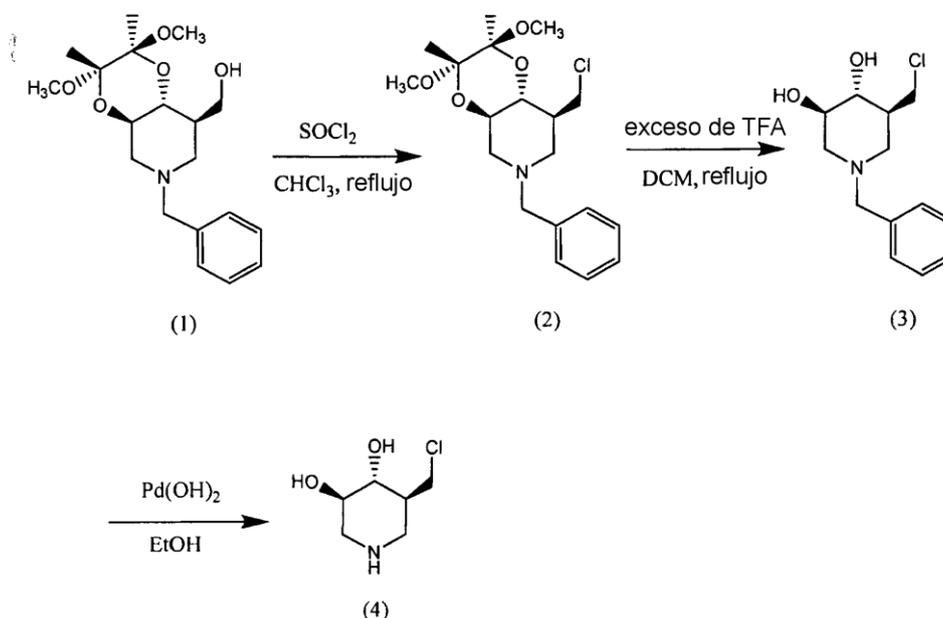
Hidrocloreto de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol (6).

A una disolución de **7** (7,5 g, 22,8 mmoles) en EtOH (150 ml) se añadió HCl 5N en 2-PrOH (7 ml). La disolución se evaporó *a vacío*, después se co-evaporó 2x más con EtOH. El material resultante se disolvió en EtOH (100 ml), y la disolución resultante se hidrogenó toda la noche con Pd(OH)<sub>2</sub> a 50 psi. El catalizador se eliminó mediante filtración, y el filtrado se evaporó *a vacío*. El residuo se trituró con acetona y se recogió un sólido amarillo pálido. El sólido resultante se recristalizó en EtOH para dar el compuesto del título como un sólido blancuzco p.f. 200-202°C. RMN <sup>1</sup>H DMSO *d*<sub>6</sub> consistente con espectros previos.

c. Síntesis de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol

Un enfoque para obtener la base libre de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol es sintetizar hidrocloreto de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol como se describe en la sección "b" anterior seguido de cromatografía de hidrocloreto de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol usando 5-15% de MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9:1) en CHCl<sub>3</sub> que convierte la forma de sal de HCl de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol en su base libre.

d. Síntesis de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol



(2S,3S,4aR,8S,8aR)-6-bencil-8-(clorometil)-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridina (2).

A una disolución de ((2S,3S,4aR,8R,8aR)-6-bencil-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridin-8-il)metanol (**1**) (2,5 g, 7,1 mmoles) en cloroformo (35 ml) se añadió cloruro de tionilo (1,3 ml, 18 mmoles). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 4-8 horas hasta que se juzgó que la reacción estaba terminada mediante TLC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/2-PrOH 98:2). El disolvente y el reactivo en exceso se evaporaron *a vacío*, y el residuo se cromatografió (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/2-PrOH 98:2) para dar el compuesto del título (2,2 g, 85%). El producto se caracterizó vía HPLC/MS (MH<sup>+</sup> = 369). La pureza se juzgó como >95%.

(3R,4R,5S)-1-bencil-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol (3).

A una disolución de (2S,3S,4aR,8S,8aR)-6-bencil-8-(clorometil)-2,3-dimetoxi-2,3-dimetiloctahidro-[1,4]dioxino[2,3-c]piridina (**2**) (2,2 g, 5,9 mmoles) en diclorometano (15 ml) se añadió ácido trifluoroacético (0,35 moles, 26 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante alrededor de 1 hora, en cuyo momento se juzgó que la reacción estaba terminada mediante TLC. El disolvente en exceso y el TFA se evaporaron *a vacío*, y el residuo se cromatografió usando gel de sílice (2-8% de MeOH en CHCl<sub>3</sub>). Las fracciones se combinaron y se evaporaron para dar (1,3 g, 87%) como el compuesto del título. El producto se caracterizó vía HPLC/MS (MH<sup>+</sup> = 255) y se juzgó que era >95% puro.

(3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol (4).

Se añadió HCl 5N (4,7 mmoles, 0,94 ml) a (3R,4R,5S)-1-bencil-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol (**3**) (5,1 mmoles, 1,3 g) disuelto en EtOH. La disolución se evaporó *a vacío* y después se co-evaporó 2-3x con EtOH. El residuo se volvió a disolver en EtOH y se combinó con Pd(OH)<sub>2</sub> (0,27 g), y se hidrogenó a 55 psi durante 12 h. El catalizador se filtró subsiguientemente a través de dicalita, y el filtrado se evaporó para obtener (**4**) bruto como una sal de HCl. Ésta se cromatografió entonces (5-15% de MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9:1) en CHCl<sub>3</sub>) para dar 0,4 g de (**4**) como un sólido blanco con

MH<sup>+</sup> de 165 y RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) 1,6 (m, 1 H), 2,2 (m, 3H), 2,9 (m, 3H), 3,15 (m, 1 H), 3,6(m, 1 H), 3,8 (dd, 1 H), 4,68 (d, 1 H), 4,88 (d, 1 H).

e. Síntesis de hidrocloreto de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol

5 Un enfoque para obtener la sal de hidrocloreto de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol es sintetizar (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol como se describe en la sección "d" anteriormente, seguido de la reacidificación con HCl (ya sea como una disolución acuosa o en 2-PrOH, como se vende a menudo) en el que la base libre se convierte en la forma de sal de HCl de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol, y aislamiento subsiguiente de hidrocloreto de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol.

10 Como alternativa, la síntesis de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol puede seguir como se describe en la sección "d" anterior, con la excepción de la última etapa cromatográfica, en la que la sal de HCl se cromatografió usando 5-15% de MeOH/NH<sub>4</sub>OH (9:1) en CHCl<sub>3</sub> ya que esta etapa da como resultado la conversión de la forma de sal de HCl bruta de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol en la base libre. Además, la forma de sal de HCl bruta de (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol se puede purificar mediante cristalización.

Sales y solvatos

15 Los compuestos de la presente invención incluyen sales farmacéuticamente aceptables de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol (también denominado aquí como Compuesto A) y (3R,4R,5S)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol también denominado aquí como Compuesto B). Las sales farmacéuticamente aceptables 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'-diacetil-etilendiamina, glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, diciclohexilamina, 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 isómeros D o aminoácidos sustituidos; guanidina, guanidina sustituida en la que los sustituyentes seleccionan de nitro, amino, alquilo, alquenoilo, alquinilo, sales de amonio o de amonio sustituido, y sales de aluminio. Las sales pueden incluir sales de adición de ácidos cuando sea apropiado, que son hidrocloreto, sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidroháluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencenosulfonatos, ascorbato, glicerofosfatos, cetoglutaratos. En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable de (3R,4R,5R)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol es la sal de hidrocloreto (también denominada aquí como Compuesto A-HCl).

30 "Solvato" representa una asociación física de un compuesto con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física implica grados variables de enlace iónico y covalente, incluyendo enlace de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato será capaz de ser aislado, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en la red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" engloba tanto solvatos en fase de disolución como aislables. "Hidrato" es un solvato en el que la molécula de disolvente es H<sub>2</sub>O. Otros ejemplos de solvatos adecuados incluyen alcoholes (por ejemplo, etanolatos, metanolatos, y similares).

40 Todos los estereoisómeros (por ejemplo, isómeros geométricos, isómeros ópticos, y similares) de 5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol y 5-(clorometil)piperidin-3,4-diol (incluyendo aquellos de las sales, y solvatos de estos compuestos), tales como aquellos que pueden existir debido a carbonos asimétricos en diversos sustituyentes, incluyendo formas enantioméricas (que pueden existir incluso en ausencia de carbonos asimétricos), formas rotámeras, atropisómeros, y formas diastereoméricas, están contemplados dentro del alcance de esta invención. Los estereoisómeros individuales de estos compuestos pueden estar, por ejemplo, sustancialmente libres de otros isómeros, o pueden estar mezclados, por ejemplo, como racematos o con todos los otros estereoisómeros, u otros estereoisómeros seleccionados. Los centros quirales de los compuestos mencionados anteriormente pueden tener la configuración S o R como se define mediante las Recomendaciones de la IUPAC de 1974. El uso de los términos "sal", "solvato", pretende aplicarse igualmente a la sal, solvato de enantiómeros, estereoisómeros, rotámeros, tautómeros o racematos de 5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol y 5-(clorometil)piperidin-3,4-diol.

Formulaciones

50 El agente o agentes terapéuticos se pueden formular en una forma adecuada para cualquier vía de administración, incluyendo, *por ejemplo*, oralmente en forma de comprimidos o cápsulas o líquido, o en disolución acuosa estéril para inyección. Cuando el agente o agentes terapéuticos se formula para administración oral, los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes 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 de almidón sódico); o agentes humectantes (*por ejemplo*, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por 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 almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); o conservantes (*por ejemplo*, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo, o ácido sórbico).  
 5 Las preparaciones líquidas también pueden contener sales de tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada o sostenida del agente o agentes terapéuticos.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el agente o agentes terapéuticos se administran en una forma de dosificación que permite la captación sistémica, de manera que el agente o agentes terapéuticos pueda atravesar la barrera hematoencefálica para ejercer efectos sobre células neuronales. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas del agente o agentes terapéuticos adecuadas para uso parenteral/inyectable incluyen generalmente disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua), o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril, y debe fluir hasta el grado en que exista una fácil capacidad para introducirla en una jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), sus mezclas adecuadas, o aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede producir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, será razonable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y  
 10  
 15  
 20  
 25 gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando el agente o agentes terapéuticos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enunciados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración o terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los 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 produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de la disolución filtrada de forma estéril previamente del mismo.  
 30

La formulación puede contener un excipiente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en la formulación son tampones tales como tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato, y tampón de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tales como seroalbúmina, colágeno, y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro de sodio; 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. Los sistemas tamponantes para uso con las formulaciones incluyen tampones de citrato; de acetato; de bicarbonato; y de fosfato. El tampón de fosfato es una realización preferida.  
 35  
 40

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

#### Vías de administración

El agente o agentes terapéuticos se pueden administrar oral o parenteralmente, incluyendo intravenosamente, subcutáneamente, intraarterialmente, intraperitonealmente, oftálmicamente, intramuscularmente, bucalmente, rectalmente, vaginalmente, intraorbitalmente, intracerebralmente, intradérmicamente, intracranealmente, intraespinalmente, intraventricularmente, intratecalmente, intracistéricamente, intracapsularmente, intrapulmonarmente, intranasalmente, transmucosalmente, transdérmicamente, o vía inhalación. En una realización preferida, el agente o agentes terapéuticos se administra oralmente.  
 45  
 50

La administración del agente o agentes terapéuticos puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la formulación, o se puede administrar mediante administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (*por ejemplo*, una bolsa i.v.) o interno (*por ejemplo*, un implante bioerosionable). Véanse, *por ejemplo*, las patentes U.S. n<sup>os</sup> 4.407.957 y 5.798.113. Los métodos de suministro intrapulmonar y los aparatos se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.654.007, 5.780.014, y 5.814.607. Otros sistemas de suministro parenteral útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, suministro mediante bomba, suministro celular encapsulado, suministro liposómico, inyección a través de aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosol, electroporación, y parche transdérmico. Los dispositivos inyectoros sin aguja se describen en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.879.327, 5.520.639; 5.846.233 y 5.704.911. Cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente se puede administrar usando estos métodos.  
 55  
 60

Las inyecciones subcutáneas tienen la ventaja de permitir la autoadministración, mientras que también dan como resultado una semivida plasmática prolongada en comparación con la administración intravenosa. Además, con las formulaciones de la presente invención como se discuten aquí, se puede usar una variedad de dispositivos diseñados para la conveniencia del paciente, tales como bolígrafos de inyecciones recargables y dispositivos de inyección sin agujas.

#### Dosificación

Una preparación farmacéutica adecuada está en una forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias de tamaño adecuado que contienen cantidades apropiadas del componente activo, por ejemplo una cantidad eficaz para lograr el fin deseado. En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos se administran en una o más dosis diarias (por ejemplo, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día). En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos se administran intermitentemente.

En la solicitud de patente internacional PCT/US08/61764 publicada como WO 2008/134628 el 11 de junio de 2008, y en la solicitud de patente U.S. 12/604.855, presentada el 23 de octubre de 2009, se describen regímenes de dosificación ejemplares. En una realización, el agente o agentes terapéuticos se administran en un régimen de dosificación intermitente que incluye una "dosis de carga" inicial dada diariamente, seguido de un período de dosificación a intervalos no diarios.

La cantidad de agente o agentes terapéuticos eficaces para prevenir o tratar el trastorno citado se puede determinar caso por caso por aquellos de pericia en la técnica. La cantidad y frecuencia de administración del agente o agentes terapéuticos se regularán según el juicio del médico práctico (médico) considerando factores tales como la edad, estado y tamaño del paciente así como el riesgo de desarrollar trastorno o la gravedad de los síntomas del trastorno citado que se esté tratando.

#### Terapia farmacéutica de combinación

El agente o agentes terapéuticos de la presente invención se pueden administrar en combinación con al menos algún otro agente terapéutico. La administración del agente o agentes terapéuticos de la presente invención con al menos algún otro agente terapéutico se entiende que engloba la administración que es secuencial o concurrente. En una realización, los agentes terapéuticos se administran en formas de dosificación separadas. En otra realización, dos o más agentes terapéuticos se administran concurrentemente en la misma forma de dosificación.

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es un agente anti-discinesia (por ejemplo carbidopa, levodopa), un agente antiinfeccioso (por ejemplo, miglustat), un agente antineoplásico (por ejemplo, busulfano, ciclofosfamida), un agente gastrointestinal (por ejemplo, metilprednisolona), un micronutriente (por ejemplo, calcitriol, colecalciferol, ergocalciferoles, vitamina D), un agente vasoconstrictor (por ejemplo, calcitriol).

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con alopregnanolona, una dieta baja en colesterol, o agentes reductores del colesterol tales como estatinas (*por ejemplo*, Lipitor®); fibratos tales como fenofibrato (Lipidil®); niacina; y/o resinas de unión tales como colestiramina (Questran®).

En una realización, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con terapia génica. La terapia génica se contempla tanto con genes de sustitución tales como glucocerebrosidasa o con ARN inhibidor (siRNA) para el gen SNCA. La terapia génica se describe con más detalle en la patente U.S. nº 7.446.098, presentada el 17 de febrero de 2004.

En una realización, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es un agente antiinflamatorio (por ejemplo, ibuprofeno u otro NSAID).

En una realización, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con un inhibidor sustrato para glucocerebrosidasa, tal como N-butil-desoxinojirimicina (Zavesca®; miglustat disponible de Actelion Pharmaceuticals, US, Inc., South San Francisco, CA, US).

También se contemplan combinaciones del agente o agentes terapéuticos de la presente invención con al menos algún otro agente terapéutico que es un agente terapéutico para una o más enzimas lisosómicas adicionales. A continuación se da una lista de agentes terapéuticos para enzimas lisosómicas.

Tabla 1

ENZIMA LISOSÓMICA	AGENTE TERAPÉUTICO
<p><math>\alpha</math>-Glucosidasa</p> <p>Nº de Acceso de GenBank Y00839</p>	<p>1-desoxinojirimicina (DNJ)</p> <p><math>\alpha</math>-homonojirimicina</p> <p>castanospermina</p>
<p><math>\beta</math>-Glucosidasa ácida (<math>\beta</math>-glucocerebrosidasa)</p> <p>Nº de Acceso de GenBank J03059</p>	<p>isofagomina</p> <p>C-bencil isofagomina y derivados</p> <p>N-alquil de (C9-12)-DNJ</p> <p>Glucoimidazol (y derivados)</p> <p>C-alquil-IFG (y derivados)</p> <p>N-alquil-<math>\beta</math>-valeinaminas</p> <p>Flufenocina</p> <p>calisteginas A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y C<sub>1</sub></p>
<p><math>\alpha</math>-Galactosidasa A</p> <p>Nº de Acceso de GenBank NM000169</p>	<p>1-desoxigalactonojirimicina (DGJ)</p> <p><math>\alpha</math>-<i>alo</i>-homonojirimicina</p> <p><math>\alpha</math>-<i>galacto</i>-homonojirimicina</p> <p><math>\beta</math>-1-C-butil-desoxinojirimicina</p> <p>calisteginas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub></p> <p>N-metil calisteginas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub></p>
<p><math>\beta</math>-Galactosidasa ácida</p> <p>Nº de Acceso de GenBank M34423</p>	<p>4-<i>epi</i>-isofagomina</p> <p>1-desoxigalactonojirimicina</p>
<p>Galactocerebrosidasa (<math>\beta</math>-Galactosidasa acida)</p> <p>Nº de Acceso de GenBank D25283</p>	<p>4-<i>epi</i>-isofagomina</p> <p>1-desoxigalactonojirimicina</p>
<p><math>\alpha</math>-Manosidasa ácida</p> <p>Nº de Acceso de GenBank U68567</p>	<p>1-desoximanojirimicina</p> <p>Swainsonina</p> <p>Manostatina A</p>
<p><math>\beta</math>-Manosidasa ácida</p> <p>Nº de Acceso de GenBank U60337</p>	<p>2-hidroxi-isofagomina</p>
<p><math>\alpha</math>-L-fucosidasa ácida</p> <p>Nº de Acceso de GenBank NM_000147</p>	<p>1-desoxifuconojoirrimicina</p> <p><math>\beta</math>-homofuconojoirrimicina</p> <p>2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol</p> <p>2,5-desoxi-2,5-imino-D-fucitol</p> <p>2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol</p>
<p><math>\alpha</math>-N-Acetilglucosaminidasa</p> <p>Nº de Acceso de GenBank U40846</p>	<p>1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina</p>

$\alpha$ -N-Acetilgalactosaminidasa Nº de Acceso de GenBank M62783	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galactonojirimicina
$\beta$ -Hexosaminidasa A (Nº de Acceso de GenBank NM_000520)	2-N-acetilamino-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina Nagstaína
$\beta$ -Hexosaminidasa B Nº de Acceso de GenBank NM_000521	2-N-acetamido-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina Nagstaína
$\alpha$ -L-Iduronidasa Nº de Acceso de GenBank NM 000203	1-desoxiiduronojirimicina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
$\beta$ -Glucuronidasa Nº de Acceso de GenBank NM_000181	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Sialidasa Nº de Acceso de GenBank U84246	Ácido 2,6-didesoxi-2,6, imino-siálico Siastatina B
Iduronato sulfatasa Nº de Acceso de GenBank AF_011889	2,5-anhidromanitol-6-sulfato
Esfingomielinasa ácida Nº de Acceso de GenBank M59916	desipramina, fosfatidilinositol-4,5-difosfato

5 En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún agente terapéutico que es un agente anti-discinesia (por ejemplo, carbidopa, levodopa), un agente anti-infeccioso (por ejemplo, ciclosporina, miglustat, pirimetamina), un agente antineoplásico (por ejemplo, alemtuzumab, azatioprina, busulfano, clofarabina, ciclofosfamida, melfalano, metotrexato, rituximab), un agente antirreumático (por ejemplo, rituximab) un agente gastrointestinal (por ejemplo, metilprednisolona), un micronutriente (por ejemplo, calcitriol, colecalciferol, ergocalciferoles, ácido fólico, vitamina D), un agente de control de la reproducción (por ejemplo, metotrexato), un agente del sistema respiratorio (por ejemplo, tetrahidrozolina), un agente vasoconstrictor (por ejemplo, calcitriol, tetrahidrozolina).

10 En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un agente terapéutico que es un agente terapéutico para  $\beta$ -hexosaminidasa A y/o un agente terapéutico para  $\beta$ -galactosidasa ácida. En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un agente terapéutico que es un agente antiinfeccioso (por ejemplo, meglustat), un agente antineoplásico (por ejemplo, alemtuzumab, busulfano, ciclofosfamida), un agente gastrointestinal (por ejemplo, metilprednisolona).

15 El agente o agentes terapéuticos de la presente invención se pueden administrar en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que incluye, pero no se limita a, RNAi, sustitución de dopamina (por ejemplo, levodopa (L-DOPA)), estabilizador de la sustitución de dopamina (por ejemplo, carbidopa, y entacapona), anticolinérgico (por ejemplo, trihexifenidilo, mesilato de benzotropina (Cogentin®), trihexifenidilo HCl (Artane®), y prociclidina), inhibidor de catecol-O-metiltransferasa (COMT) (por ejemplo, entacapona (Comtan®) y tolcapona (Tasmar®)), agonista del receptor de dopamina (por ejemplo, bromocriptina (Parlodel®), pramipexol (Mirapex®), ropinirol (Requip®)), pergolida (Permax), e inyección de APOKYN™ (hidrocloruro de apomorfina), inhibidor de monoamina oxidasa (MAO) (es decir, inhibidores de MAO-A y/o MAO-B, por ejemplo, selegilina (deprenilo, Eldepryl®, Carbox®, comprimido que se disgrega oralmente de selegilina HCl (Zelapar®), y rasagilina (Azilect®)), inhibidor de descarboxilasa periférica, amantadina (Symmetrel®), y tartrato de rivastigmina (Exelon®).

20 También se contemplan combinaciones del agente o agentes terapéuticos de la presente invención con más de algún otro agente terapéutico. Combinaciones ejemplares de otros agentes terapéuticos incluyen carbidopa/levodopa (Sinemet® o Parcopa®), carbidopa, levodopa y entacapona (Stalevo®), levodopa con agonista del receptor de dopamina tal como bromocriptina (Parlodel®), pramipexol (Mirapex®), ropinirol (Requip®)), pergolida (Permax), o inyección de APOKYN™ (hidrocloruro de apomorfina).

30 En una realización, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con terapia de vacuna, tal como la vacuna que comprende alfa-sinucleína y un adyuvante (Pilcher et al., Lancet Neurol.

2005; 4(8):458-9).

En una realización, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que puede ser protector, tal como dextrometorfano (Li et al., FASEB J. 2005; abril; 19(6):489-96); genisteína (Wang et al., Neuroreport. 2005; Feb 28; 16(3):267-70), o minociclina (Blum et al., Neurobiol Dis. 2004; dic.; 17(3):359-66).

En una realización, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es agente terapéutico para alfa-sinucleína (por ejemplo, Hsp70).

Los pacientes que tienen enfermedad de Parkinson experimentan temblor, rigidez, bradicinesia, y desequilibrio postural. Los pacientes que tienen demencia con cuerpos de Lewy experimentan fuertes síntomas psicóticos (alucinaciones visuales) además de deterioro mental, tal como pérdida de la memoria y una incapacidad para llevar a cabo tareas simples. Las mejoras observables en los síntomas, o un retraso del comienzo de ciertos síntomas en pacientes con riesgo de desarrollar un trastorno, o un retraso en la progresión del trastorno serán prueba de una respuesta favorable a las terapias proporcionadas aquí.

Además, los marcadores sustitutos medibles también pueden ser útiles para evaluar la respuesta a la terapia. Por ejemplo, algunos investigadores han dado a conocer la detección de mayores niveles de alfa-sinucleína o se han detectado formas oligoméricas de alfa-sinucleína en el plasma de pacientes con enfermedad de Parkinson (Lee et al., J Neural Transm. 2006; 113(10):1435-9; El-Agnaf et al., FASEB J. 2006; 20(3):419-25), mientras que algunos han dado a conocer menor cantidad de alfa-sinucleína plasmática en pacientes con Parkinson en comparación con controles normales (Li et al., Exp Neurol. 2007; 204(2):583-8).

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es un agente disuasorio del alcohol (por ejemplo, acamprosato), un analgésico narcótico (por ejemplo, remifentanilo), un agente anti-discinesia (por ejemplo, amantadina, apomorfina, benserazida, bromocriptina, cabergolina, carbidopa, dexetimida, droxidopa, entacapon, levodopa, lisurida, memantina, piribedilo, pramipexol, ropinirol, selegilina, sinemet), un agente anti-infeccioso (por ejemplo, amantadina, amoxicilina, claritromicina, etanol, interferones, minociclina, PS-K), un agente contra la obesidad (por ejemplo, fenilpropranolamina, topiramato), un anticonvulsivo (por ejemplo, etiracetam, topiramato), un antiemético (por ejemplo, trimetobenzamida), un agente antihipertensivo (por ejemplo, trandolapril), un agente antineoplásico (por ejemplo, cabergolina, PS-K), un depresor del sistema nervioso central (por ejemplo, aripiprazol, benzocaína, clozapina, cocaína, dexmedetomidina, difenhidramina, isoflurano, litio, carbonato de litio, metilperón, morfina, propofol, quetiapina, racloprida, remifentanilo, oxiato de sodio), un estimulante del sistema nervioso central (por ejemplo, citrato de cafeína, modafinilo, nicotina polacrilex), un anticoagulante (por ejemplo, arginina vasopresina, desamino arginina vasopresina, vasopresinas), un agente dermatológico (por ejemplo, loratadina, prometazina), un agente gastrointestinal (por ejemplo, difenhidramina, domperidona, omeprazol, trimetobenzamida), un hipnótico y/o sedante (por ejemplo, remifentanilo), un micronutriente (por ejemplo, alfa-tocoferol, coenzima Q10, ergocalciferoles, hidroxocobalamina, hierro, acetato de tocoferol, tocoferoles, vitamina B 12, vitamina D, vitamina E), un agente neuroprotector (por ejemplo, eliprodilo, modafinilo, rasagilina, rivastigmina, topiramato), un agente nootrópico (por ejemplo, donepezilo, etiracetam), un fármaco psicotrópico (por ejemplo, aripiprazol, citalopram, clozapina, duloxetina, litio, carbonato de litio, metolperón, nortriptilina, paroxetina, quetiapina, racloprida, venlafaxina), un agente del sistema respiratorio (por ejemplo, dextrometorfano, guaifenesina, ipratropio, nafazolina, oximetazolina, fenilefrina, fenilpropranolamina), un agente vasoconstrictor (por ejemplo, nafazolina, oximetazolina, fenilefrina, fenilpropranolamina).

En una realización preferida, los otros agentes terapéuticos mencionados anteriormente se administran cuando el trastorno es enfermedad de Parkinson.

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es un agonista nicotínico alfa-7 (por ejemplo, MEM 3454 o MEM 63908, los cuales están disponibles de Memory Pharmaceuticals). En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es R3487 y/o R4996 (los cuales están disponibles de Roche). También se contemplan combinaciones del agente o agentes terapéuticos de la presente invención con más de algún otro agente terapéutico. Las combinaciones ejemplares de otros agentes terapéuticos incluyen R3487/MEM 3454 y R4996/MEM 63908.

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un inhibidor de colinesterasa donepezilo (nombre comercial *Aricept*), galantamina (nombre comercial *Razadyne*), y rivastigmina (comercializada como *Exelon* y *Exelon Patch*).

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos un antagonista del receptor de NMDA no competitivo (por ejemplo, memantina (nombres comerciales *Akatinol*, *Axura*, *EbixalAbixa*, *Memox* y *Namenda*)).

En ciertas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos de la presente invención se administran en combinación con al menos algún otro agente terapéutico que es un analgésico no narcótico (por ejemplo, celecoxib, resveratrol,

rofecoxib, proteína de fusión TNFR-Fc), un agente anti-discinesia (por ejemplo, dexetimida, gabapentina, levodopa, memantina), un agente anti-infeccioso (por ejemplo, acetilcisteína, aciclovir, benzoatos, desoxiglucosa, doxiciclina, interferón alfa-2a, interferón- $\alpha$ , interferones, moxifloxacina, PS-K, quinacrina, rifampina, ácido salicílico, valaciclovir), un agente anti-inflamatorio (por ejemplo, aspirina, celecoxib, curcumina, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, resveratrol, rofecoxib, proteína de fusión TNFR-Fc), un agente contra la obesidad (por ejemplo, fenilpropanolamina), un agente anticonvulsionante (por ejemplo, gabapentina, homotaurina, lamotrigina), un antiemético (por ejemplo, olanzapina), un agente antihipertensivo (por ejemplo, trandolaprilo), un agente antilipémico (por ejemplo, atorvastatina, colina, ácido clofíbrico, pravastatina, simvastatina), un agente antineoplásico (por ejemplo, briostatina 1, carmustina, ciclofosfamida, interferón alfa-2a, leuprolida, 17-acetato de medroxiprogesterona, metiltestosterona, PK 11195, prednisona, PS-K, resveratrol, 2,3-dihidro-1H-imidazo(1,2-b)pirazol), un agente antirreumático (por ejemplo, aspirina, celecoxib, curcumina, ibuprofeno, indometacina, naproxeno, resveratrol, rofecoxib, proteína de fusión TNFR-Fc), un depresor del sistema nervioso central (por ejemplo, aripiprazol, benzocaína, cocaína, gabapentina, haloperidol, decanoato de haloperidol, litio, carbonato de litio, lorazepam, midazolam, olanzapina, perfenazina, propofol, quetiapina, risperidona, oxibato de sodio, trazodona, ácido valproico, zolpidem), un estimulante del sistema nervioso central (por ejemplo, citrato de cafeína, modafinilo, nicotina polacrilex), un bloqueador de canales (por ejemplo, gabapentina, lamotrigina), un coagulante (por ejemplo, antiplasmina, vitamina K), un agente dermatológico (por ejemplo, aceite mineral, ácido salicílico), un agente gastrointestinal (por ejemplo, colina, haloperidol, lorazepam, olanzapina, omeprazol, proteína de fusión TNFR-Fc), un hipnótico y/o agente sedante (por ejemplo, zolpidem), un agente hipoglucémico (por ejemplo, insulina, Asp(B28)-, rosiglitazona), un micronutriente (por ejemplo, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, coenzima Q10, cobre, ácido fólico, hidroxocobalamina, inositol, hierro, niacina, niacinamida, ácidos nicotínicos, piridoxina, selenio, ácido tióctico, acetato de tocoferol, tocoferoles, vitamina B 12, vitamina B 6, vitamina E, vitamina K), un agente neuroprotector (por ejemplo, huperzina A, modafinilo, nefiracetam, rasagilina, rivastigmina, (ácido 3-aminopropil)(n-butil)fosfínico), un agente nootrópico (por ejemplo, donepezilo, nefiracetam), un inhibidor de la agregación plaquetaria (por ejemplo, resveratrol), un fármaco psicotrópico (por ejemplo, aripiprazol, bupropiona, citalopram, duloxetina, gabapentina, haloperidol, decanoato de haloperidol, litio, carbonato de litio, lorazepam, midazolam, nefiracetam, olanzapina, paroxetina, perfenazina, quetiapina, risperidona, sertralina, trazodona, triptófano, ácido valproico, venlafaxina), un agente de control de la reproducción (por ejemplo, 17 beta-cipionato de estradiol, 3-benzoato de estradiol, valerato de estradiol, indometacina, leuprolida, medroxiprogesterona, 17-acetato de medroxiprogesterona, mifepristona), un agente del sistema respiratorio (por ejemplo, acetilcisteína, dextrometorfano, guaifenesina, nafazolina, oximetazolina, fenilefrina, fenilpropanolamina), o un agente vasoconstrictor (por ejemplo, nafazolina, oximetazolina, fenilefrina, fenilpropanolamina).

En una realización preferida, los otros agentes terapéuticos mencionados anteriormente se administran cuando el trastorno es enfermedad de Alzheimer.

## 35 EJEMPLOS

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, presentados a continuación. El uso de tales ejemplos es solamente ilustrativo.

### EJEMPLO 1 Determinación de constantes de inhibición

La afinidad de unión (definida aquí mediante la constante de unión  $K_i$ ) de GCasa para chaperonas farmacológicas de pequeñas moléculas descritas en este documento se determinaron empíricamente usando ensayos de inhibición enzimática. De forma breve, los ensayos de inhibición enzimática usados monitorizaron la capacidad del compuesto de ensayo para unirse y evitar la hidrólisis de un sustrato fluorogénico de una manera dependiente de la concentración. Específicamente, la actividad enzimática de GCasa humana recombinante (rhGCasa; Cerezyme®, Genzyme Corp.) se midió usando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucopiranosido (4-MU- $\beta$ -D-Glc) en ausencia o en presencia de cantidades variables de cada compuesto de ensayo. Los datos resultantes se analizaron comparando todas las muestras de ensayo con la muestra de control sin inhibición (sin compuesto; que corresponde a 100% de actividad enzimática), para determinar la actividad enzimática residual en presencia de compuesto de ensayo. Los datos de la actividad residual normalizados se representaron gráficamente (en el eje Y) subsiguientemente con respecto a la concentración de compuesto de ensayo (en el eje X) para extrapolar la concentración de compuesto de ensayo que conduce a una inhibición del 50% de la actividad enzimática (definida como  $IC_{50}$ ). El valor de  $IC_{50}$  para cada compuesto de ensayo se insertó entonces en la ecuación de Cheng-Prusoff (detallada más abajo) para derivar la constante de inhibición absoluta  $K_i$  que refleja exactamente la afinidad de unión de GCasa por el compuesto de ensayo. Los ensayos de inhibición enzimática se llevaron a cabo tanto a pH 7,0 (pH del retículo endoplásmico) como a pH 5,2 (pH lisosómico) para obtener un conocimiento más profundo de la afinidad de unión (es decir, potencia) de compuestos por GCasa en el retículo endoplásmico y el lisosoma.

#### Ensayo *in vitro*

Se prepararon diversas concentraciones de compuestos de ensayo en tampón "M", que consiste en tampón de fosfato de sodio 50 mM con 0,25% de taurocolato sódico a pH 7,0 y pH 5,2. La enzima (Cerezyme®, una forma recombinante de la enzima humana  $\beta$ -glucocerebrosidasa) también se diluyó en el mismo tampón "M" a pH 7,0 y pH 5,2. La disolución de sustrato consistió en 4-metilumbeliferona  $\beta$ -D-glucopiranosido 3 mM en tampón "M" con 0,15%

de Triton X-100 a ambos pHs. Se añadieron cinco  $\mu\text{l}$  de enzima diluida a 15  $\mu\text{l}$  de las diversas concentraciones de inhibidor o tampón "M" solo, y se incubaron a 37°C durante 1 hora con 50  $\mu\text{l}$  de la preparación de sustrato, para evaluar la actividad de  $\beta$ -glucosidasa a pH 7,0 y pH 5,2. Las reacciones se detuvieron mediante adición de un volumen igual de glicina 0,4 M, pH 10,6. La fluorescencia se midió en un lector de placas durante 1 s/pocillo usando excitación de 355 nm y emisión de 460 nm. Las incubaciones sin enzima añadida o sin inhibidores añadidos se usaron para definir ninguna actividad enzimática y la actividad máxima, respectivamente, y normalizar el % de inhibición para un ensayo dado. Los resultados de este ensayo de inhibición para el compuesto de referencia, tartrato de IFG, y compuestos de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A y del Compuesto B, se resumen a continuación en la Tabla 2A.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (mM) pH 5,2	Ki ( $\mu\text{M}$ ) pH 5,2	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) pH 7	Ki ( $\mu\text{M}$ ) pH 7
Tartrato de IFG	0,0437 $\pm$ 0,0018	0,023 $\pm$ 0,001	0,00626 $\pm$ 0,00018	0,0033 $\pm$ 0,00013
Compuesto A-HCl	0,014 $\pm$ 0,006	0,006 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,0005	0,003 $\pm$ 0,0003
Compuesto A-HCl*	0,014 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,0004	0,007 $\pm$ 0,0004	0,004 $\pm$ 0,0002
Compuesto B	0,0729 $\pm$ 0,004	0,384 $\pm$ 0,0021	0,0098 $\pm$ 0,0005	0,0051 $\pm$ 0,0003

Nota:  
\* síntesis independiente de la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A

#### Ensayo *in situ*

El efecto de IFG y sus derivados sobre la actividad de GCasa lisosómica se evaluó *in situ* usando fibroblastos establecidos a partir de un sujeto normal. Células sembradas en placas de 48 pocillos se incubaron con las concentraciones indicadas de compuesto durante 16-24 horas. Para los ensayos de respuesta frente a la dosis, las células se incubaron con el sustrato *in situ* 5-(pentafluorobenzoilamino)fluoresceín di- $\beta$ -D-glucopiranosido (PFBFD $\beta$ Glu) durante 1 hora, y se lisaron subsiguientemente para determinar el grado de hidrólisis del sustrato en presencia de compuesto. El ensayo empleó un intervalo de 12 concentraciones que engloban 5 órdenes de magnitud, centradas en la IC<sub>50</sub>. Específicamente, se emplearon los siguientes intervalos de concentración: Compuesto A:  $1 \times 10^{-5}$  a  $3,33 \times 10^{-11}$ ; IFG:  $3,33 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-10}$ ; Compuesto B:  $3 \times 10^{-5}$  a  $9 \times 10^{-11}$ ; en los que el compuesto se diluyó en serie 1:3 desde la concentración más elevada en los intervalos especificados. La inhibición se determinó como la relación de actividad en presencia de compuesto a aquella en ausencia de compuesto. Para los ensayos de lavado, las células se trataron con compuesto durante 16-24 horas a una concentración igual a la IC<sub>90</sub>. Las células se lavaron ampliamente y se incubaron en medio libre de fármaco, para permitir el eflujo neto de compuesto desde las células. Las células se ensayaron entonces para determinar la actividad de GCasa lisosómica a intervalos de 2 horas durante un período total de 8 horas tras la eliminación del compuesto. El incremento en la actividad a lo largo del tiempo se ajustó a una función exponencial individual para determinar el tiempo de lavado de los compuestos. En la Tabla 2B se resumen a continuación los resultados de estos ensayos de inhibición.

Compuesto	IC <sub>50</sub> <i>In Situ</i> ( $\mu\text{M}$ )	Lavado <i>In Situ</i> (h)	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	E <sub>max</sub> (%)
Tartrato de IFG	0,271 $\pm$ 0,012	8,2 $\pm$ 0,04	0,9 $\pm$ 0,2	93,6 $\pm$ 2,5
Compuesto A-HCl	0,017 $\pm$ 0,008	6,6 $\pm$ 0,12	0,00138 $\pm$ 0,00063	96,8 $\pm$ 7,7
Compuesto A-HCl*			0,0056 $\pm$ 0,0015	104 $\pm$ 4,58
Compuesto B	0,121 $\pm$ 0,007	2,9 $\pm$ 0,22	0,0096 $\pm$ 0,001	104,2 $\pm$ 3,4

Nota:  
\* síntesis independiente de la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A

*Ecuación de Cheng-Prusoff:*  $K_i = IC_{50} / (1 + [S]/K_m)$   
 en la que [S] = concentración de sustrato; se usó 2,5 mM de 4-MU- $\beta$ -D-Glc  
 K<sub>m</sub> = constante de Michaelis que define la afinidad por el sustrato; 1,8  $\pm$  0,6 mM para 4-MU- $\beta$ -D-Glc  
 (Liou *et al.*, (2006) J Biol. Chem. 281 (7), 4242-53)

De forma notable, se encontró que los compuestos de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A y de Compuesto B provocan un incremento de la actividad de GCasa dependiente de la concentración. Además, cuando se comparan con el tartrato de IFG, los compuestos de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A y Compuesto B, potenciaron la actividad enzimática hasta el mismo nivel máximo a una concentración mucho menor.

#### EJEMPLO 2: Penetración de la barrera hematoencefálica

La penetración de la barrera hematoencefálica (BBB) por el compuesto de referencia (tartrato de IFG) y por los compuestos de ensayo (derivados de IFG, la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A y Compuesto B) se evaluó tras la administración oral a ratones. Para este fin, a ratones macho de tipo salvaje de 8 semanas (C57BL/6) se les administró una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de referencia o de compuesto de ensayo mediante sonda nasogástrica (n = 3 ratones por punto de tiempo). Se prepararon disoluciones de dosificación en agua. Tras la dosificación, los ratones se eutanasiaron con CO<sub>2</sub> en los siguientes puntos de

tiempo: 0, 0,5, 1, y 4 horas tras la dosis. Tras la eutanasia, se recogió sangre completa de la vena cava inferior en tubos de heparina con litio. De forma similar, se recogieron los cerebros de cada ratón. El plasma se derivó centrifugando sangre completa a 2700 g durante 10 minutos a 4°C, seguido del almacenamiento en hielo seco. Los cerebros completos se lavaron en PBS fría para eliminar sangre contaminante, se secaron con papel secante, se congelaron instantáneamente en hielo seco, y finalmente se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Para preparar muestras de cerebro para análisis, se homogeneizaron 50-100 mg de tejido en 400 µl de agua/mg de tejido. Las muestras se aclararon entonces mediante centrifugación. A continuación, se combinaron 25 µl del sobrenadante de homogenado de cerebro o 25 µl de plasma con 25 µl de acetonitrilo:agua (95/5). Esto se suplementó con 25 µl de acetonitrilo y 50 µl de patrón interno (100 ng/ml de IFG 13C2-15N en ácido fórmico al 0,5% en acetonitrilo: metanol (70:30)). Las muestras se aclararon nuevamente mediante centrifugación, y 75 µl del sobrenadante se combinaron con 75 µl de acetonitrilo. Las muestras se analizaron entonces para determinar los niveles de compuesto mediante LC-MS/MS PPD en (3230 Deming Way, Middleton, WI 53562). De forma breve, se empleó una columna Thermo Betasil, Sílice-100, 50 x 3 mm, 5 µ, equilibrada con una mezcla de fase móvil que consiste en formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico al 0,05% en (A) acetonitrilo:agua 95:5 o (B) metanol:agua:acetonitrilo 70:20:10. Se inyectaron entre 20 y 30 µl de muestra para análisis. De forma notable, los tiempos de retención para IFG, Compuesto A y Compuesto B son 4,91, 4,33 y 4,32 minutos, respectivamente. Para MS/MS, los analitos se monitorizaron mediante MRM con las siguientes masas de iones (Q1/Q3, amu): IFG 13C2-15N patrón interno marcado isotópicamente (151,1/115,1), IFG (148,1/112,1), Compuesto A (150,1/103,1), Compuesto B (166,2/130,1). Cuando se analizó el Compuesto B, se usó el Compuesto A como patrón interno (150,1/130,1). Para calcular las concentraciones de fármaco, los datos en bruto para plasma (ng/ml) y cerebro (ng/g) se convirtieron en nM usando el peso molecular de los compuestos respectivos y suponiendo que 1 g de tejido es equivalente a un volumen de 1 ml. La concentración como una función del tiempo se representó gráficamente en GraphPad Prism versión 4.02.

Los niveles plasmáticos y los niveles cerebrales del compuesto de referencia IFG, y del compuesto de ensayo, Compuesto A, detectados en ratones administrados con una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de tartrato de IFG o la forma de sal de hidrocloreto de Compuesto A, se ilustran en las Figuras 1A y 1B, respectivamente. De forma similar, la relación de niveles cerebrales a plasmáticos de Compuesto A e IFG detectados en estos ratones se ilustra en la Figura 1C. Sorprendentemente, estos resultados reflejan que el Compuesto A atravesó la barrera hematoencefálica más fácilmente en comparación con IFG.

Los niveles cerebrales de compuesto de referencia, IFG, y de compuesto de ensayo, Compuesto B, detectados en ratones administrados con una única dosis p.o. de 30 mg/kg (equivalente de base libre) de tartrato de IFG o de forma de base libre de Compuesto B, se ilustran en la Figura 2. De forma notable, se detectaron niveles incluso mayores de Compuesto B en el cerebro que los observados tras la administración de la forma de sal de hidrocloreto de Compuesto A.

### EJEMPLO 3: Potenciación de GCasa

La capacidad de los compuestos de ensayo administrados oralmente (la forma de sal de hidrocloreto de Compuesto A y Compuesto B) para elevar los niveles de GCasa en comparación con un compuesto de referencia, tartrato de IFG, se evaluó en ratones. Para este fin, a ratones macho de tipo salvaje de 8 semanas (C57/BL6) se les administró una única dosis p.o. (sonda nasogástrica) (detallado en las Figuras 3A-D, 4A-D, y 5A-D) de control, compuesto de referencia (tartrato de IFG) o compuesto de ensayo (la forma de sal de hidrocloreto de Compuesto A o Compuesto B). Se usaron siete animales por dosis. Las disoluciones de dosificación se prepararon en agua. Los compuestos se administraron a lo largo de 2 semanas según lo siguiente: semana 1, lunes-viernes (On), sábado-domingo (Off); semanas 2, lunes-jueves (On); necropsia en viernes. De este modo, se administró un total de 9 dosis (disoluciones de dosificación preparadas recientemente cada día) a cada ratón, con un lavado de 24 horas entre la última dosis y la necropsia.

Tras terminar la dosificación, los ratones se eutanasiaron con CO<sub>2</sub>, y se extrajo sangre completa en tubos de heparina con litio a partir de la vena cava inferior. El plasma se recogió centrifugando sangre a 2700 g durante 10 minutos a 4°C. Se retiraron tejidos del hígado, del bazo, del pulmón y del cerebro, se lavaron en PBS fría, se secaron en papel secante, se congelaron instantáneamente en hielo seco, y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. Los niveles de GCasa se midieron homogeneizando aproximadamente 50 mg de tejido en 500 µl de tampón McIlvane (MI) (citrato de sodio 100 mM, fosfato sódico dibásico 200 mM, 0,25% de taurocolato de sodio, y 0,1% de Triton X-100, pH 5,2) a pH 5,2 durante 3-5 segundos en hielo con un microhomogeneizador. Los homogenados se incubaron entonces a temperatura ambiente sin y con 2,5 mM de epóxido de conductritol-B (CBE) durante 30 min. Finalmente, se añadió 3,7 mM de sustrato 4-metilumbeliferil-β-glucósido (4-MUG) y se incubó a 37°C durante 60 min. Las reacciones se detuvieron mediante adición de glicina 0,4 M, pH 10,6. La fluorescencia se midió en un lector de placas durante 1 s/pocillo usando una excitación de 355 nm y una emisión de 460 nm. La proteína total se determinó en lisados usando el kit MicroBCA según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo en paralelo una curva patrón de 4-metilumbeliferona (4-MU) que oscila de 1,0 nM a 50 µM, para la conversión de datos de fluorescencia en bruto a actividad de GCasa absoluta (en presencia y ausencia de CBE), y se expresó como nanomoles de 4-MU liberados por miligramos de proteína por hora (nmol/mg de proteína/h). Los niveles de GCasa y los niveles de proteína se calcularon usando Microsoft Excel (Redmond, WA) y GraphPad Prism versión 4.02.

5 Las Figuras 3A-D ilustran el nivel de GCasa en cerebro, bazo, hígado y pulmón, respectivamente, de ratones C57BL/6 a los que se les ha administrado un régimen de dosificación de 2 semanas que consiste en nueve dosis de (i) vehículo de control; (ii) 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de referencia, tartrato de IFG; o (iii) 10 ó 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A. Además, las Tablas 3A-C detallan el nivel de potenciación de GCasa en cerebro, bazo, y plasma, respectivamente, de ratones tratados como se describe anteriormente.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Disolución de dosificación	Incremento de GCasa (veces)	Concentración (nM)	IC50 pH 5,2 (nM)
Compuesto A	10	Agua	2,5	124 ± 11 (0,5)	10 ± 1
Compuesto A	100	Agua	3,5	726 ± 51 (3)	
IFG	100	Agua	2,2	182 ± 13 (0,7)	50 ± 3

Notas:  
BLQ < 5 ng/g  
Los valores entre paréntesis indican concentraciones en ensayos de GCasa tras la dilución  
El dato de IC50 es el promedio de tres experimentos independientes

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Disolución de dosificación	Incremento de GCasa (veces)	Concentración (nM)	IC50 pH 5,2 (nM)
Compuesto A	10	Agua	1,9	69 ± 6 (0,3)	10 ± 1
Compuesto A	100	Agua	2,8	304 ± 63 (1,1)	
IFG	100	Agua	1,9	711 ± 100 (2,6)	50 ± 3

Notas:  
BLQ < 8 ng/g  
Los valores entre paréntesis indican concentraciones en ensayos de GCasa tras la dilución  
El dato de IC50 es el promedio de tres experimentos independientes

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Disolución de dosificación	Concentración (nM)
Compuesto A	10	Agua	32 ± 2.4
Compuesto A	100	Agua	254 ± 73.5
IFG	100	Agua	330 ± 36

Nota:  
BLQ < 1ng/ml

10 De forma similar, las Figuras 4A-D ilustran el nivel de GCasa en cerebro, bazo, hígado y pulmón, respectivamente, de ratones C57BL/6 a los que se les ha administrado un régimen de dosificación de 2 semanas que consiste en nueve dosis de (i) vehículo de control; (ii) 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de referencia, tartrato de IFG; o (iii) 1, 3, 10, 30 ó 100 mg/kg (equivalente de base libre) de compuesto de ensayo, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A.

15 Como se refleja en las Figuras 3A-D y 4A-D, así como en las Tablas 3A-3C, los ratones a los que se les administró la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A demostraron una potenciación de GCasa mayor estadísticamente significativa en cerebro, bazo, hígado y pulmón en comparación con ratones a los que se les administró control o tartrato de IFG. Además, la potenciación de GCasa en ratones a los que se les administró la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A fue inesperadamente mayor que la observada con tartrato de IFG, incluso cuando se administraron dosis de la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A muchísimo menores que tartrato de IFG.

20 Igualmente, las Figuras 5A-D ilustran el nivel de GCasa detectado en cerebro, bazo, hígado, y pulmón, respectivamente, de ratones tratados con Compuesto B y tartrato de IFG como se describe anteriormente. Además, las Tablas 4A-4C detallan el nivel de potenciación de GCasa en cerebro, bazo, y plasma, respectivamente, de ratones tratados como se describe anteriormente.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Disolución de dosificación	Incremento de GCasa (veces)	Concentración (nM)	IC50 pH 5,2 (nM)
Compuesto B	10	Agua	2,3	246 ± 42 (0,9)	73±9
Compuesto B	100	Agua	3,5	2066 ± 231 (7,6)	
IFG	10	Agua	1,5	49 ± 2,4 (0,2)	50±3
IFG	100	Agua	2,1	287 ± 74 (1,1)	

Notas:  
BLQ < 5 ng/g  
Los valores entre paréntesis indican concentraciones en ensayos de GCasa tras la dilución  
El dato de IC50 es el promedio de tres experimentos independientes

Tabla 4B Muestras de bazo de estudio de potenciación de GCasa					
Compuesto	Dosis (mg/kg)	Disolución de dosificación	Incremento de GCasa (veces)	Concentración (nM)	IC50 pH 5,2 (nM)
Compuesto B	10	Agua	1,4	645 ± 214 (2,4)	73 ± 9
Compuesto B	100	Agua	2,2	2156 ± 464 (8)	
IFG	10	Agua	1,6	150 ± 12 (0,5)	50 ± 3
IFG	100	Agua	2,0	1139 ± 220 (4,2)	
Notas: BLQ <5 ng/g Los valores entre paréntesis indican concentraciones en ensayos de GCasa tras la dilución El dato de IC50 es el promedio de tres experimentos independientes					
Tabla 4C Muestras de plasma de estudio de potenciación de GCasa					
Compuesto	Dosis (mg/kg)	Disolución de dosificación	Concentración (nM)		
Compuesto B	10	Agua	104,3 ± 15		
Compuesto B	100	Agua	1529 ± 601		
IFG	10	Agua	67 ± 10		
IFG	100	agua	852 ± 134		
Nota: BLQ < 1ng/ml					

5 Como se refleja en las Figuras 5A-D, así como en las Tablas 4A-4C, los ratones a los que se les administró el Compuesto B demostraron una potenciación de GCasa mayor estadísticamente significativa en cerebro, bazo, hígado y pulmón en comparación con ratones a los que se les administró control o tartrato de IFG. Además, la potenciación de GCasa en ratones a los que se les administró Compuesto B fue inesperadamente mayor que la observada con tartrato de IFG, incluso cuando se administraron dosis de Compuesto B muchísimo menores que tartrato de IFG.

10 **EJEMPLO 4: Farmacocinética de ratas**

15 El dato farmacocinético (PK) se obtuvo en ratas para evaluar la biodisponibilidad del compuesto de ensayo. En particular, se calcularon los siguientes parámetros PK: biodisponibilidad, según se mide mediante el área bajo la curva de concentración/tiempo (AUC), fracción de dosis disponible (%F; definida adicionalmente más abajo), aclaramiento (CL), volumen de distribución (Vd), y semivida (t½). Para este fin, a ratas Sprague-Dawley de 8 semanas se les administró una única dosis intravenosa (IV) equivalente a 3 mg/kg de base libre, o dosis individuales p.o. (sonda nasogástrica) que aumentan en escala de compuesto de ensayo equivalentes a 10, 30 y 100 mg/kg de base libre. Se usaron tres ratas por grupo de dosificación. Se recogió sangre durante un período de 24 h. Los puntos de tiempo para la recogida de sangre tras la administración intravenosa fueron: 0, 2,5, 5, 10, 15, 30, 45 min., 1, 2, 4, 8, 12, y 24 h. Los puntos de tiempo para la recogida de sangre después de las administraciones p.o. fueron: 0, 5, 15, 30, 45 min., 1, 2, 3, 4, 8, 12, y 24 h. Las muestras de plasma se analizaron para determinar los niveles de compuesto mediante LC-MS/MS en PPD. El dato bruto se analizó mediante análisis no compartimental en WinNonLin para calcular Vd, %F, CL, y t½.

25 En la Figura 6A se ilustran niveles plasmáticos en ratas tras una única dosis intravenosa de 3 mg/kg (equivalente de base libre) de la forma de sal de hidrocloreuro de Compuesto A. De forma similar, en la Figura 6B se ilustran los niveles plasmáticos en ratas a las que se les administró una única dosis de 10, 30 y 300 mg/kg (equivalente de base libre) de dosis p.o. de la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A. En la Tabla 5 a continuación se detallan diversos parámetros farmacocinéticos para el Compuesto A en base al estudio mencionado anteriormente.

Tabla 5 Datos PK de rata para el Compuesto A								
Dosis (mg/kg)		Ruta	AUC <sub>last</sub> (hr*ng/ml)	%F	t1/2 (h)	Cmax (ng/ml)	CL (ml/h/kg)	V <sub>D</sub> (ml/kg)
Sal	Base libre							
3,72	3	IV	1798 ± 42,7	N/A	1,4 ± 0,1	7274 ± 139	1666 ± 38,5	3481 ± 232
12,4	10	PO	2982 ± 228	50 ± 3,8	1,2 ± 0,4	1289 ± 271	3387 ± 277	13283 ± 1929
37,2	30	PO	8251 ± 388	46 ± 2,5	2,3 ± 0,3	2870 ± 355	4009 ± 509	13532 ± 3291
124	100	PO	29606 ± 1748	49 ± 2,7	2,6 ± 0,1	9393 ± 742	3393 ± 209	13101 ± 1518
Notas: Valores medios del análisis no compartimental (N=3 ratas) BLD Por debajo del límite de detección (<0,5 ng/ml) BLQ Por debajo del límite de cuantificación <b>%F = <math>\frac{AUC\ PO \times 100\ dosis\ normalizada}{AUC\ IV}</math></b> AUC <sub>last</sub> = Área bajo la curva de Concentración/Tiempo hasta el último punto de datos								

Como se refleja en las Figuras 6A y 6B, así como en la Tabla 5, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A tiene un perfil farmacocinético favorable para el desarrollo de fármacos como una chaperona farmacológica. En particular, la forma de sal de hidrocloreuro del Compuesto A muestra buena biodisponibilidad oral (~50%) y proporcionalidad de dosis, una semivida de 1,0 a 2,5 horas, y un volumen de distribución que sugiere penetración adecuada en tejidos periféricos.

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agente terapéutico que es 5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o 5-(clorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o cualquier combinación de dos o más de los mismos, para uso en la prevención y/o tratamiento de un trastorno degenerativo del sistema nervioso central en un paciente con riesgo de desarrollar o diagnosticado con el mismo.
2. Un agente terapéutico para uso según la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico es (3*R*,4*R*,5*R*)-5-(fluorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Un agente terapéutico para uso según la reivindicación 1, en el que el agente terapéutico es (3*R*,4*R*,5*S*)-5-(clorometil)piperidin-3,4-diol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 4. Un agente terapéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno degenerativo se selecciona del grupo que consiste en sinucleinopatía, enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy, atrofia multisistémica y enfermedad de Alzheimer.
5. Un agente terapéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno degenerativo se caracteriza por cuerpos de Lewy.
- 15 6. Un agente terapéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno degenerativo está asociado con agregación de componente no Abeta o alfa-sinucleína.
7. Un agente terapéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el trastorno degenerativo está asociado con acumulación de al menos uno seleccionado del grupo que consiste en glucoesfingolípido y glucolípido.
- 20 8. Un agente terapéutico para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el agente terapéutico se administra en combinación con al menos algún otro agente terapéutico.
9. Un agente terapéutico según la reivindicación 8, en el que el al menos algún otro agente terapéutico es levodopa, un anticolinérgico, un inhibidor de catecol-O-metil transferasa, un agonista del receptor de dopamina, un inhibidor de monoamina oxidasa, un inhibidor de descarboxilasa periférica, o un agente antiinflamatorio.

25

Figura 1A

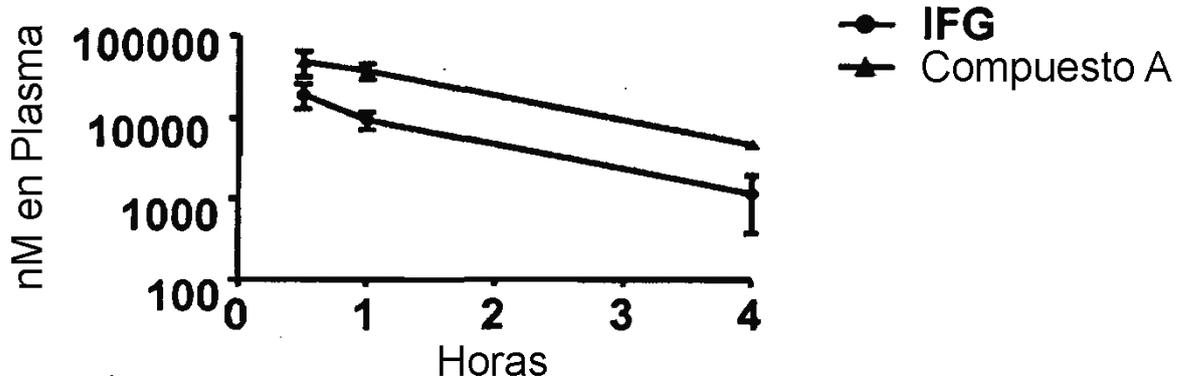


Figura 1B

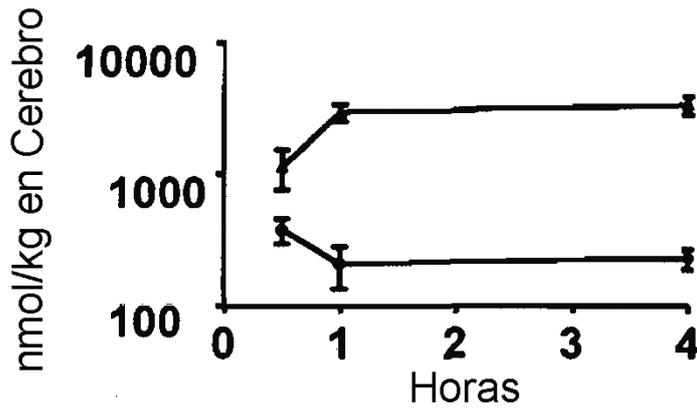


Figura 1C

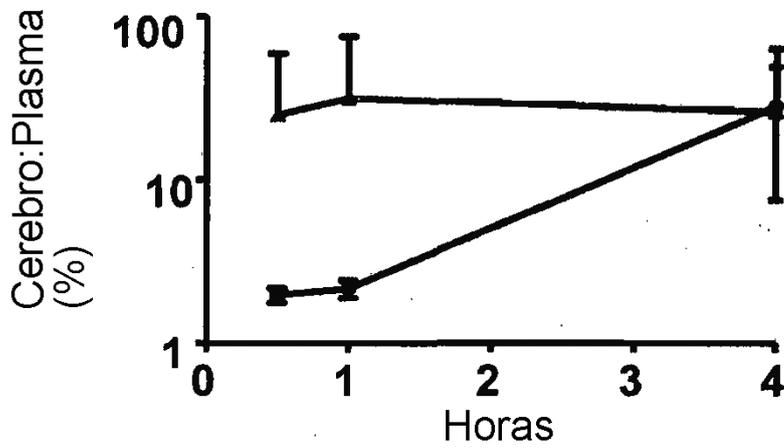


Figura 2

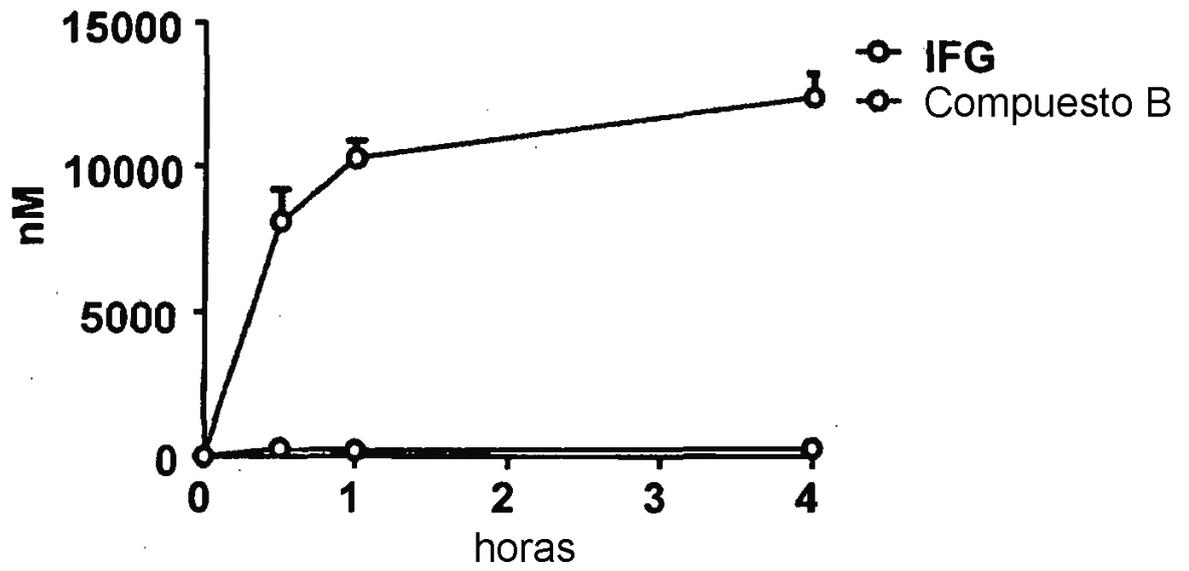


Figura 3

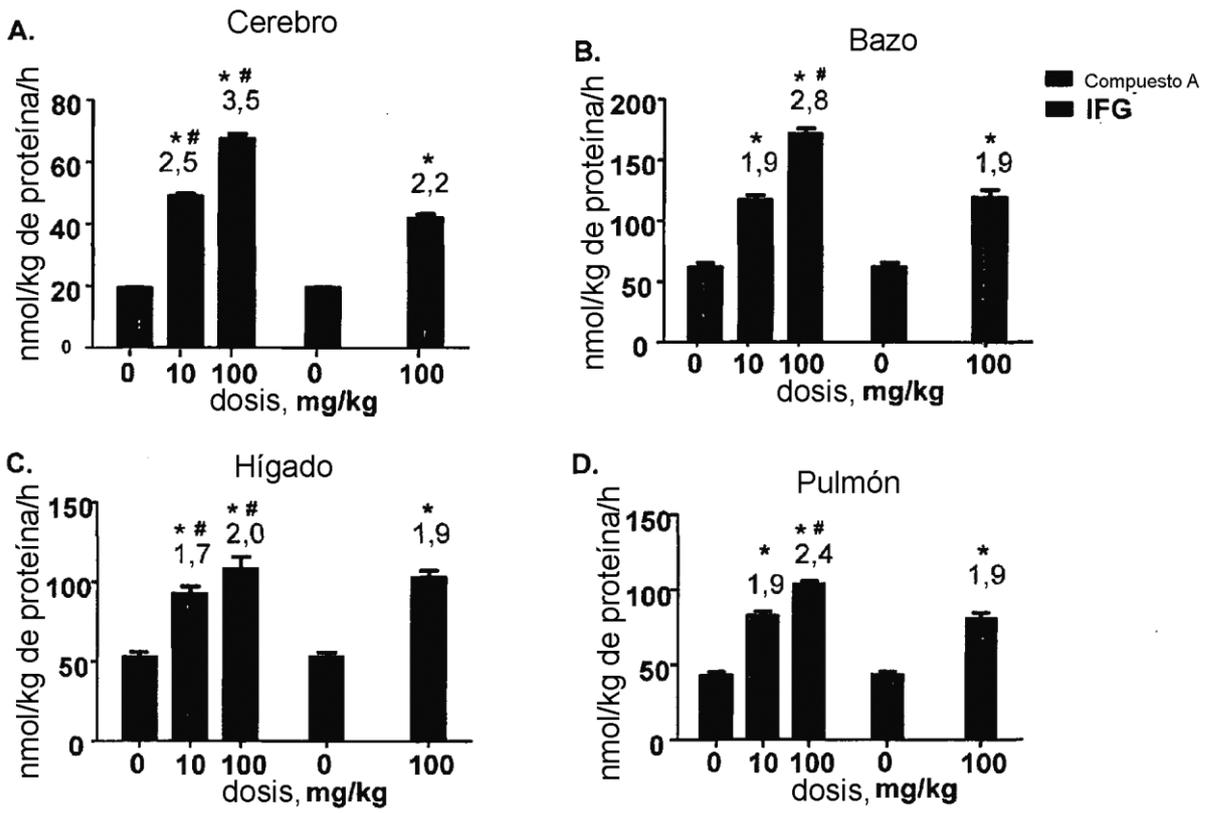


Figura 4

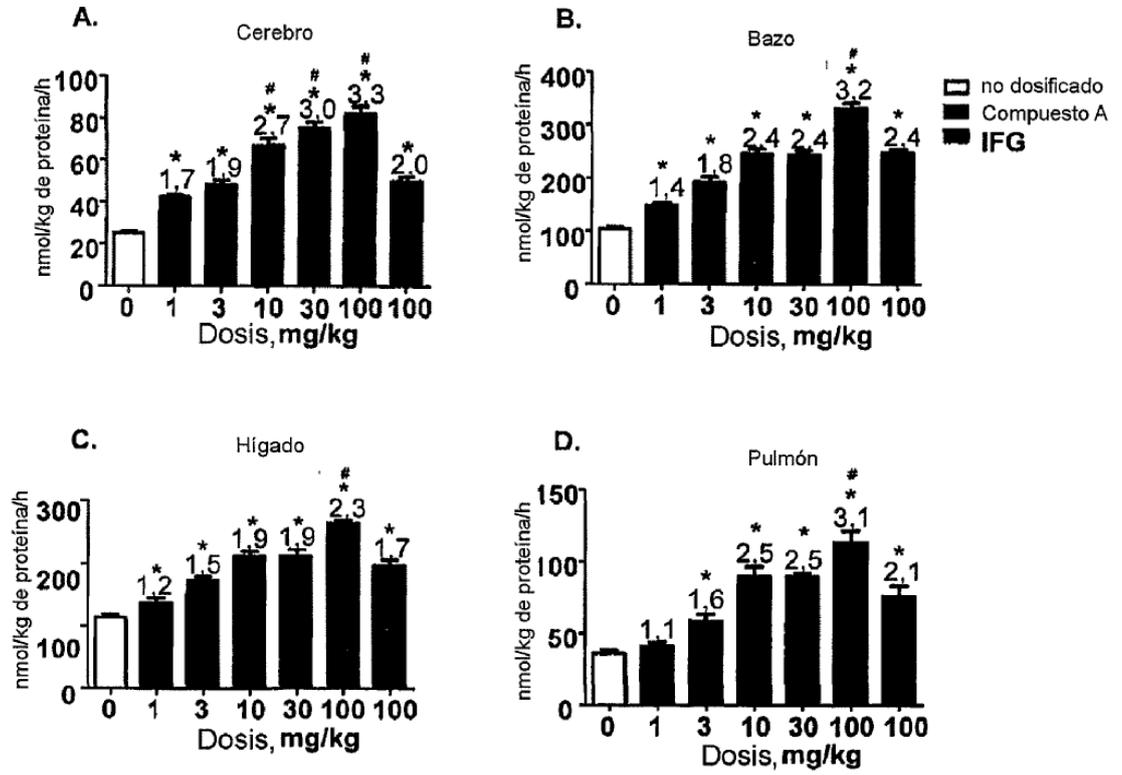


Figura 5

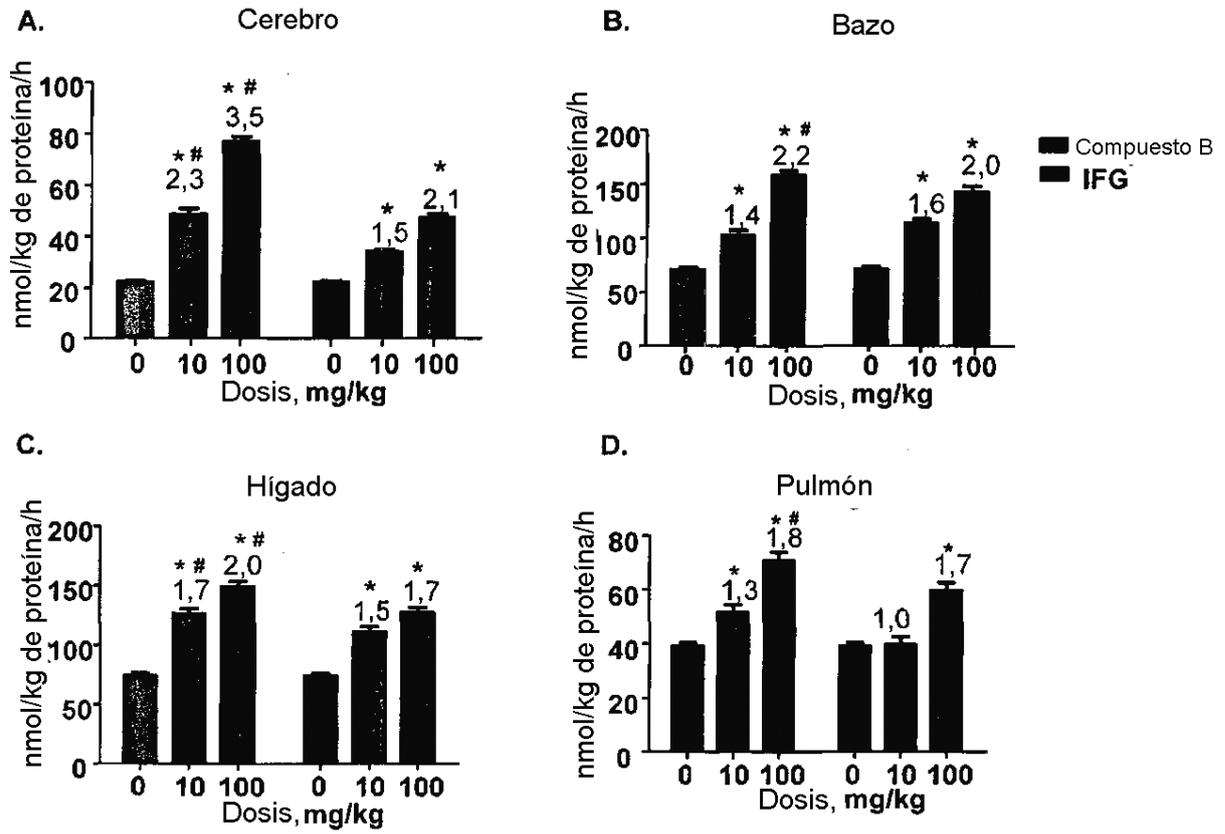


Figura 6A

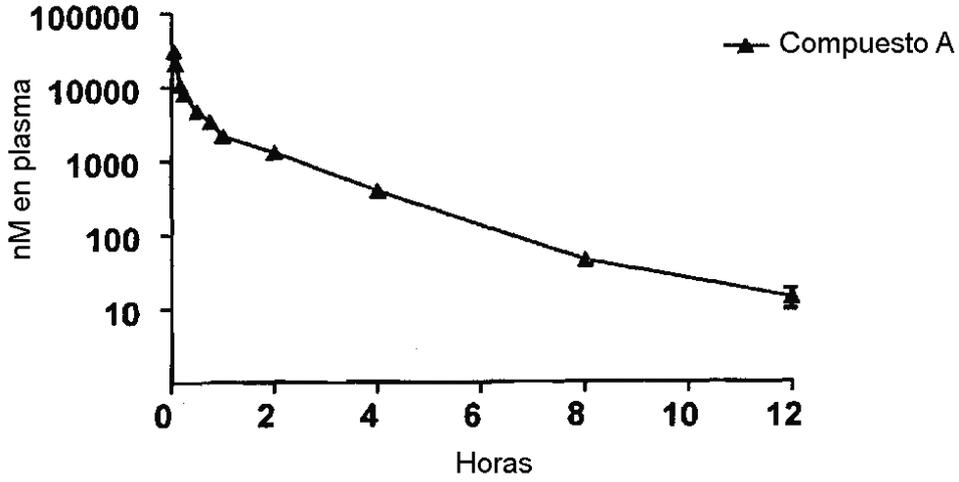


Figura 6B

