(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 534 506**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/4045 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.08.2011 E 11746212 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2624829**

(54) Título: **Uso de inhibidores de porfobilinógeno deaminasa en el tratamiento de la porfiria eritropoyética congénita**

(30) Prioridad:

05.08.2010 ES 201031226

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.04.2015

(73) Titular/es:

ASOCIACIÓN CENTRO DE INVESTIGACIÓN COOPERATIVA EN BIOCIENCIAS-CIC BIOGUNE (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 801 A planta 1º
48160 Derio, Bizkaia, ES

(72) Inventor/es:

MILLET AGUILAR-GALINDO, ÓSCAR y
LAÍN TORRE, ANA

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

ES 2 534 506 T3

DESCRIPCIÓN

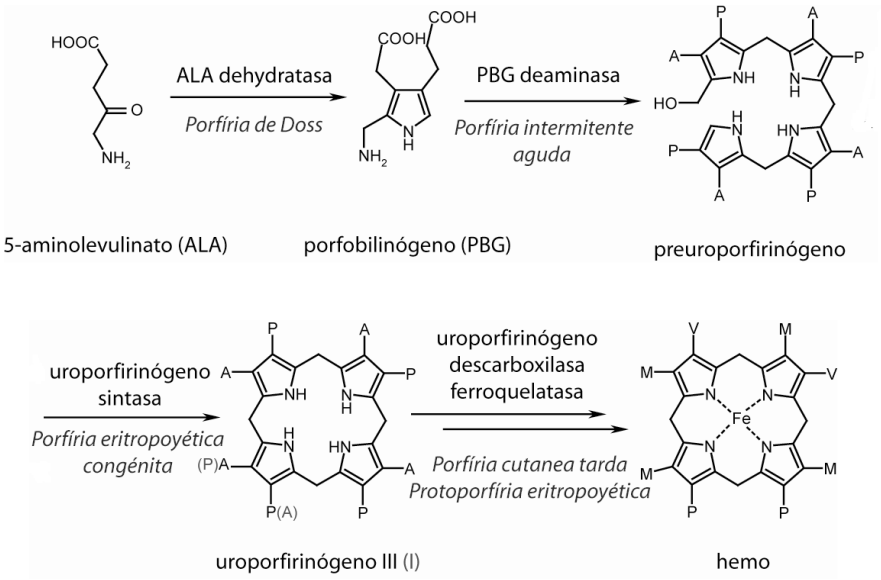
Uso de inhibidores de porfobilinógeno deaminasa en el tratamiento de la porfiria eritropoyética congénita

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que presentan capacidad inhibitoria para su uso en la inhibición de la actividad catalítica de la porfobilinógeno deaminasa en el tratamiento y/o prevención de la porfiria eritropoyética congénita (PEC).

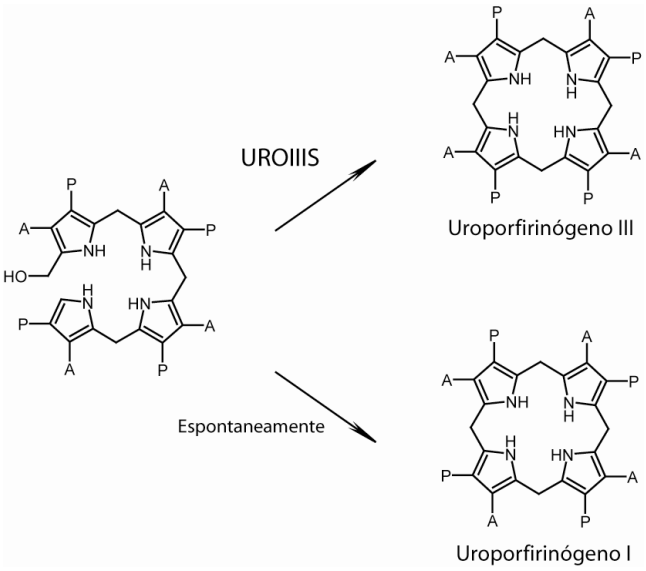
Antecedentes de la invención

Se denomina genéricamente porfiria al conjunto de patologías que se producen por una deficiente actividad en alguno de los enzimas de la biosíntesis del grupo hemo. Normalmente, la perdida de actividad se produce por mutaciones en la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas y la clase de porfiria depende del enzima específico que provoca la mutación. En el esquema 1 se representa la biosíntesis del grupo hemo indicando los enzimas involucrados en cada estadio de la ruta (encima de la flecha de reacción) y detallando los nombres de las patologías específicas provocadas por deficiencias de funcionamiento en cada uno de estos enzimas (debajo de la flecha de reacción) [P=propionato, A=acetato, V=vinilo, M=metilo].



Esquema 1

La porfiria eritropoyética congénita (PEC), también conocida como enfermedad de Günther que lleva el nombre del autor que la describió en 1911, es una enfermedad hereditaria y la menos frecuente de las porfirias. Esta enfermedad es consecuencia de una disfunción en la *uroporfirinógeno III sintasa* (UROIIIS), que es un enzima de 260 residuos (en la isoforma humana) que cataliza la ciclación del tetrapirrol lineal hidroximetilbilano para dar el macrociclo uroporfirinógeno III (o urógeno III), precursor de los grupos hemo, sirohemo, F_{340}, vitamina B_{12} y clorofila. El sustrato tetrapirrólico es altamente inestable y en ausencia del enzima UROIIIS se degrada espontáneamente al uroporfirinogeno I (uroporfirinógeno I y III difieren tan solo en la posición de un grupo P y un grupo A en el anillo D del ciclo). En el esquema 2 se muestra la ciclación del preuroporfirinógeno para producir uroporfirinógeno III (ruta enzimática) o uroporfirinógeno I (degradación espontánea).



Esquema 2

El uroporfirinógeno I y sus derivados son subproductos difíciles de catabolizar que tienden a acumularse en el organismo. Así, en los pacientes de PEC (aquellos que tienen carencia de UROIIIS) se producen grandes cantidades de uroporfirinógeno I, que se acumulan en bolsas bajo los ojos y deforman las extremidades. Dependiendo de su gravedad, otros síntomas comunes de la enfermedad son por ejemplo una sensibilidad extrema a la luz solar desde la infancia que se manifiesta con intensas lesiones dérmicas en las zonas expuestas, destrucciones óseas y cartilaginosas, eritrodoncia (coloración marrón oscuro de los dientes, sobre todo de leche, por el acúmulo de porfirinas), anemia, etc.

Actualmente, el único tratamiento curativo de la PEC es el trasplante de médula ósea, es decir, remplazar la médula ósea del paciente con PEC (receptor) con la médula ósea sana de otra persona (donante). Después de un trasplante eficaz se resuelven las características clínicas de PEC, tales como la fotosensibilidad o la anemia. Sin embargo, las cicatrices de lesiones de la piel previas son permanentes. Además, para que el trasplante tenga éxito se requiere que la médula ósea del donante tenga una alta similitud con la del receptor. En este sentido, el trasplante de médula ósea es un tratamiento de alto riesgo e inicialmente se precisan potentes tratamientos que inhiban el sistema inmune del receptor para prevenir el rechazo. Por todo ello, el trasplante de médula ósea está reservado para aquellos individuos gravemente afectados que tienen un donante de médula ósea idéntica.

Por tanto, el tratamiento de PEC, a día de hoy, se limita únicamente a intentar prevenir o paliar sus síntomas como por ejemplo, el empleo de protectores solares para prevenir las cicatrices de piel y ojos, la administración continuada de hemoderivados o realización de transfusiones sanguíneas para contrarrestar la deficiencia de grupos hemo, etc.

Aunque la inhibición de la porfobilinógeno deaminasa (PBGD; enzima también conocida como hidroximetilbilano sintasa o uroporfirinógeno I sintasa) implicaría la reducción de la cantidad de preuroporfirinógeno y por tanto una mejora de las condiciones de vida de los pacientes de PEC, todos los estudios realizados en este sentido hasta la fecha han resultado desfavorables. El enzima PBGD ha sido sometido a un intenso estudio mecanístico [Louie GV y col. (1992) *Nature* 359: 33-39; Jordan PM, Woodcock SC (1991) *The Biochemical journal* 280 (Pt 2): 445-449]. La identificación del sitio de unión a sustrato ha conllevado el desarrollo de inhibidores "suicidas" (que se unen covalentemente al enzima e impiden la progresión de la reacción). En particular se trata de derivados del sustrato enzimático como 2-bromoporfobilinógeno [Battersby AR (2000) *Natural product reports* 17: 507-526; Jones RM, Jordan PM (1994) *The Biochemical journal* 299 (Pt 3): 895-902; Warren MJ, Jordan PM (1988) *Biochemistry* 27: 9020-9030] o el 6-metilporfobilinógeno y el 6,11-etanoporfobilinógeno [Ahmed R, Leeper FJ (2003) *Org Biomol Chem* 1: 21-23]. También se ha encontrado que las porfirínas pueden inhibir al enzima [Araujo LS y col. (1994) *Int J Biochem* 26: 1377-1381]. A pesar de su especificidad, no se ha demostrado su eficiencia como inhibidores *in vivo*, y su alta reactividad los descarta como potenciales fármacos. De hecho, sería esperable que estos derivados de porfobilinógeno, al unirse covalentemente al enzima e inactivarlo permanentemente, generaran muchos problemas *in vivo*. Además, el sustrato es un metabolito secundario, y por tanto, inhibidores análogos al mismo podrían tener actividad inhibitoria sobre otros enzimas, disminuyendo la selectividad *in vivo*.

Dado que hay una cisteína implicada en el mecanismo de catálisis, se han estudiado también agentes modificantes de la proteína PBGD. Se ha encontrado que algunas sustancias como iones metálicos, o 2-mercaptoetanol pueden alterar significativamente la actividad catalítica la porfobilinógeno deaminasa de *Arabidopsis thaliana* [Jones RM, Jordan PM (1994) *The Biochemical journal* 299 (Pt 3): 895-902]. Sin embargo, esto se debe a un mecanismo no específico de modificación química del enzima y no a una unión específica de la molécula en el centro activo de la proteína. Asimismo, el modelo estudiado está en entredicho, puesto que se observa una baja inhibición por parte de la N-

etilmaleimida, mientras que el mismo reactivo desactiva fuertemente el enzima de *Escherichia coli* [Warren MJ, Jordan PM (1988) *Biochemistry* 27: 9020-9030]. La lista completa de sustancias probadas puede encontrarse en la base de datos Brenda: http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=2.5.1.61

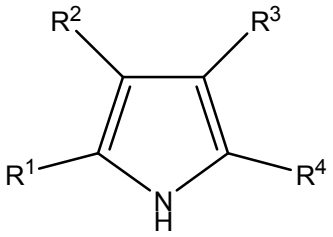
A la vista de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de proporcionar agentes terapéuticos con capacidad inhibitoria de la actividad catalítica de la porfobilinógeno deaminasa potencialmente útiles en la prevención y/o tratamiento de la porfiria eritropoyética congénita (PEC). Además de ser eficaces, ventajosamente, dichos compuestos inhibidores no deberían provocar toxicidad indeseable. Así mismo, desde el punto de vista de su síntesis y detección farmacológica sería altamente deseable que los compuestos fueran fácilmente modulables.

Sumario de la invención

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento y/o prevención de la porfiria eritropoyética congénita (PEC).

Los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente una nueva línea de inhibidores que inhiben la actividad catalítica de la porfobilinógeno deaminasa que no son análogos al sustrato y que proporcionan una inhibición reversible. De manera ventajosa, estos compuestos presentan una parte "inhibitoria", una parte principal responsable de la actividad, y una parte "modulable", cuya modificación estructural permitiría mejorar las propiedades farmacológicas del compuesto sin alterar significativamente la capacidad inhibitoria del mismo. Además, dado que algunos de estos compuestos son metabolitos naturales o muy similares (químicamente) con metabolitos naturales, se espera que la toxicidad de los compuestos sea baja. Este hecho es especialmente importante en el caso de enfermedades raras, como es el caso de la PEC, puesto que la falta de pacientes limita o imposibilita el desarrollo de las fases clínicas del producto medicinal.

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) (compuestos de la invención) para su uso

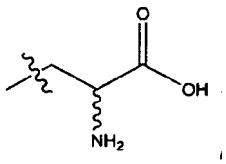


(I)

en la que

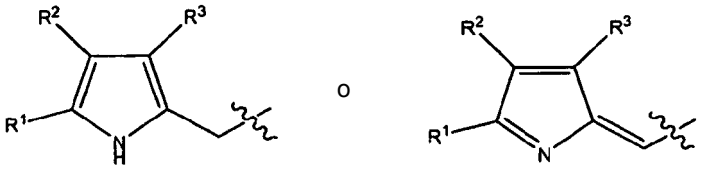
R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C_1-C_6, o R^1 y R^2 están unidos entre sí formando un anillo de benceno condensado opcionalmente sustituido,

R^3 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6



y

R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C_1-C_6, o R^4 representa



en la preparación de un producto medicinal para tratar y/o prevenir la porfiria eritropoyética congénita (PEC).

En otro aspecto, la invención se refiere al compuesto de fórmula general (I) anteriormente definido para su uso en el tratamiento y/o prevención de la porfiria eritropoyética congénita (PEC).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un compuesto para su uso en un método para la prevención y/o tratamiento de la porfiria eritropoyética congénita (PEC) en un sujeto, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula (I). En una realización preferida, dicho sujeto es un ser humano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) para la PBGD en ausencia (●) y en presencia de cantidades crecientes de 7-fluoro-triptófano (F-TRP): 1 mM (■), 5 mM (x), 8.5 mM (♦) y 10 mM (*). Los símbolos corresponden a los valores determinados experimentalmente mientras que las líneas muestran las regresiones lineales de los mismos.

La Figura 2 muestra el diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) para la PBGD en ausencia (●) y en presencia de cantidades crecientes de indol (IND): 500 μM (■), 1 mM (x), 2 mM (♦) y 5 mM (*). Los símbolos corresponden a los valores determinados experimentalmente mientras que las líneas muestran las regresiones lineales de los mismos.

La Figura 3 muestra el diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) para la PBGD en ausencia (●) y en presencia de cantidades crecientes de D-triptófano (DTRP): 1 mM (■), 1,5 mM (x), 2,5 mM (♦) y 5 mM (*). Los símbolos corresponden a los valores determinados experimentalmente mientras que las líneas muestran las regresiones lineales de los mismos.

La Figura 4 muestra el diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) para la PBGD en ausencia (●) y en presencia de cantidades crecientes de pirrol (PYR): 2,5 mM (■), 5 mM (x), 7,5 mM (♦), 10 mM (*) y 15 mM (▼). Los símbolos corresponden a los valores determinados experimentalmente mientras que las líneas muestran las regresiones lineales de los mismos.

Descripción detallada de la invención

Con el fin de facilitar la comprensión de la presente invención, los significados de algunos términos y expresiones, tal como se usan en el contexto de la invención, se incluyen a continuación en el presente documento.

"Alquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado saturado que consiste en átomos de carbono e hidrógeno que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Cuando se indica “alquilo C_1-C_6” se refiere a un grupo alquilo de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis átomos de carbono, como por ejemplo, metilo, etilo, propilo, isopropilo o *n*-butilo. En algunas realizaciones de la presente invención, el grupo alquilo es particularmente metilo.

“Haluro” o “halógeno” significa -F, -Cl, -Br o -I. En algunas realizaciones de la presente invención, el grupo haluro es particularmente flúor.

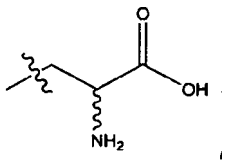
Los autores de la presente invención han demostrado que los compuestos de fórmula general (I) inhiben la actividad de la porfobilinógeno deaminasa (PBGD), de tal modo que se produce menor cantidad de preuroporfirinógeno, y por tanto, se disminuye la acumulación de uroporfirinógeno I derivada de una disfunción de la UROIIIS en los pacientes con porfiria eritropoyética congénita (PEC).

Una de las ventajas asociadas a los compuestos de fórmula (I) es que constituyen una familia de inhibidores que se pueden modular fácilmente, una característica muy importante para el desarrollo farmacéutico. Asimismo, a diferencia de los derivados de porfobilinógeno estudiados en el estado de la técnica como inhibidores de PBGD, los compuestos de la invención compiten con el sustrato por la unión no covalente al centro activo de la proteína (inhibición reversible). Además, el porfobilinógeno es un metabolito secundario y por tanto se evitan los problemas de selectividad *in vivo*, que podrían producir los inhibidores análogos al sustrato.

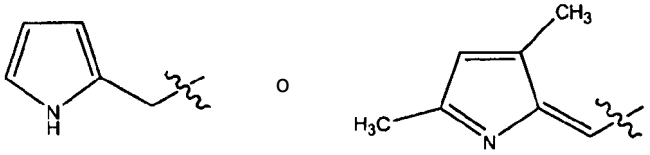
En una realización preferida de la invención, R^1 y R^2 en el compuesto de fórmula general (I) se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y metilo, o R^1 y R^2 están unidos entre sí formando un anillo de benceno condensado sin sustituir o sustituido en posición 4 o 7 del indol con metilo o halógeno (preferentemente flúor).

Además, los compuestos preferidos de fórmula (I) son aquellos en los que al menos dos de R^1, R^2, R^3 y R^4 representan simultáneamente metilo.

En otra realización preferida de la invención, R^3 en el compuesto de fórmula general (I) se selecciona del grupo que consiste en H, metilo y



En otra realización preferida de la invención, R^4 en el compuesto de fórmula general (I) se selecciona del grupo que consiste en H y metilo, o R^4 representa

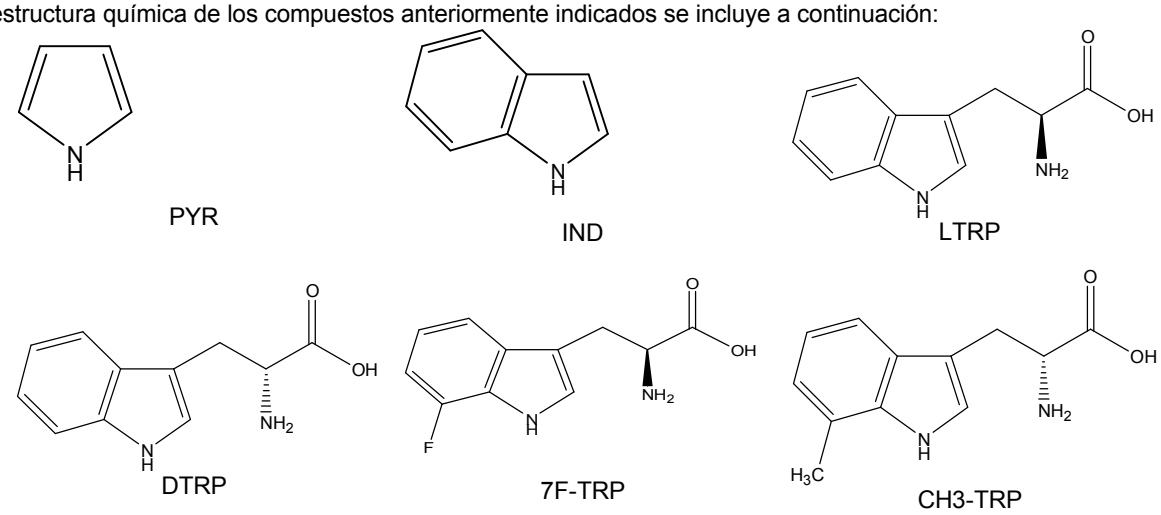


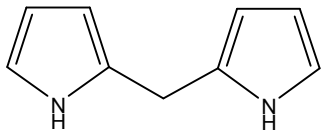
En realizaciones preferidas adicionales, se combinan las preferencias descritas anteriormente para los sustituyentes diferentes. La presente invención también se refiere a dichas combinaciones o sustituciones preferidas en la fórmula (I) anterior.

En la siguiente tabla se enumeran compuestos particularmente preferidos de la invención:

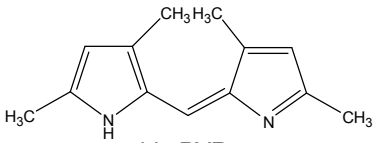
Nombre del compuesto	Acrónimo
Ácido 2S-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico (L-Triptófano)	LTRP
Ácido 2R-amino-3-(1H-indol-3-il) propanoico (D-Triptófano)	DTRP
2,3-benzopirrol (Indol)	IND
Pirrol	PYR
Ácido 2S-amino-3-(1H-indol-7-fluoro-3-il) propanoico	7F-TRP
Ácido 2R-amino-3-(1H-indol-7-metil-3-il) propanoico	CH3-TRP
3, 5, 3′, 5′-tetrametil-1H, 2′H-2, 2′-metililiden-bis-pirrol	bis-PYR
2-(1H-pirrol-2-ilmetil)-1H-pirrol	di-PYR
2,4-dimetil-1H-pirrol	2,4-CH3-PYR
2,5-dimetil-1H-pirrol	2,5-CH3-PYR
Ácido 2S-amino-3-(1H-indol-4-fluoro-3-il) propanoico	4F-TRP

La estructura química de los compuestos anteriormente indicados se incluye a continuación:

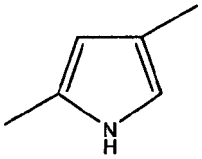




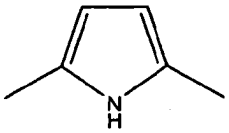
di-PYR



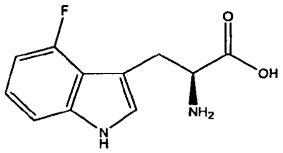
bis-PYR



2,4-CH3-PRY



2,5-CH3-PYR



4F-TRP

El experto en la materia apreciará que los derivados de triptófano tienen un centro quiral. La presente invención también incluye los compuestos racémicos y enantioméricos de los derivados de triptófano anteriormente indicados.

Tal como se ha indicado anteriormente, el uso de los compuestos de fórmula general (I) en el tratamiento y/o la prevención de la porfiria eritropoyética congénita (PEC) está relacionado con su capacidad para inhibir la actividad catalítica del enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD), preferentemente PBGD humana.

Los compuestos de fórmula (I) son fácilmente accesibles, bien comercialmente o bien mediante métodos de síntesis convencionales para el experto en la materia a partir de compuestos o intermedios comerciales o ampliamente conocidos. En este sentido, diversas empresas comercializan un gran variedad de derivados pirrólicos, indólicos y del aminoácido triptófano así como compuestos de fórmula (I) que comprenden dos anillos pirrólicos. Por otro lado, se pueden consultar procedimientos sintéticos para preparar los compuestos de la invención en referencias generales de química orgánica (véase por ejemplo, March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure; Wiley-Interscience, 5ª Ed.) o química heterocíclica. Adicionalmente, documentos relacionados con la síntesis de porfirinas divulgan diferentes métodos de preparación de dipirrometanos y dipirrometenos (véase por ejemplo, Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Roger Guilard, The Porphyrin Handbook: Synthesis and organic chemistry; Academic Press, 1999).

En una realización particular, el compuesto de fórmula (I) se formulará en una composición farmacéutica adecuada, en la cantidad terapéuticamente eficaz, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables para su administración en la prevención y/o tratamiento de porfiria eritropoyética congénita (PEC).

El término “vehículo, adyuvante y/o excipiente” se refiere a entidades moleculares o sustancias con las que se administra el ingrediente activo. Tales vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como aguas y aceites, incluyendo aquellos de petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares, excipientes, disgregantes, humectantes, diluyentes, etc. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” de E.W. Martin.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, vía oral, vía parenteral (por ejemplo, vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intravenosa, vía intramuscular, etc.), etc., preferentemente, por vía oral.

En una realización particular, dichas composiciones farmacéuticas pueden estar en una forma de dosificación farmacéutica administrada por vía oral, bien en forma sólida o líquida. Ejemplos ilustrativos de formas de dosificación farmacéuticas administradas por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubrificantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. Las composiciones farmacéuticas también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados estériles en la forma de dosificación adecuada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas incluirán los excipientes adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc. En cualquier caso, los excipientes se elegirán en función de la forma de dosificación farmacéutica seleccionada. Una revisión de las distintas formas de dosificación farmacéuticas de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. de Ediciones.

Para su aplicación el compuesto de fórmula (I), se encontrará preferiblemente en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los excipientes farmacéuticamente aceptables y no incluyendo material considerado tóxico a los niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el compuesto de fórmula (I) son preferiblemente superiores al 50 %, más

preferiblemente, superiores al 70 %, más preferiblemente, superiores al 90 %. En una realización preferida, son superiores al 95 %.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de componente activo (compuesto de fórmula (I)) calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del compuesto de fórmula (I), y el efecto terapéutico a conseguir. Dependerá asimismo del sujeto que vaya a ser tratado, de la gravedad de la enfermedad que padezca dicho sujeto, de la forma de dosificación elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben ser consideradas tan solo como guías para el experto en la materia, y este debe ajustar las dosis en función de las variables citadas anteriormente. No obstante, se puede administrar el compuesto de fórmula (I), una o más veces al día, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 veces al día, en una cantidad típica total diaria comprendida entre 1 y 10 mg/kg de masa corporal/día, preferentemente 1 mg/kg de masa corporal/día.

Aunque, en principio, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención puede ser utilizada para tratar cualquier sujeto, en una realización particular, la composición farmacéutica de la invención es especialmente útil en humanos al inhibir la actividad catalítica del enzima porfobilinógeno deaminasa humana.

El compuesto de fórmula (I) así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales útiles en la prevención y/o tratamiento de porfiria eritropoyética congénita. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o secuencial a la de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I). Por ejemplo, el tratamiento con un compuesto de fórmula (I) podría ser complementado con la administración de productos hemoderivados para contrarrestar la deficiencia de los grupos hemo.

La invención se ilustra a continuación mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Materiales y métodos

Obtención y purificación del enzima: La obtención y purificación del enzima se ha realizado siguiendo el método publicado por Millet O y col. (2009) *Biochemistry* 48: 454-461.

Ensayo enzimático: El ensayo está basado en el método descrito por Jordan (Shoolingin-Jordan PM y col (1997). *Methods in enzymology* 281: 327-336), con algunas modificaciones. Se precalientan 10 µl de porfobilinógeno deaminasa (PBGD) a una concentración de 150 µM, en 48 µl de tampón (20 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 150 mM), a 37 ºC, durante dos minutos. Si el ensayo se realiza en presencia de inhibidor, este se añade disuelto en el tampón. Posteriormente se añaden 25 µl del sustrato porfobilinógeno (PBG), diluido a diferentes concentraciones (0,15, 0,3, 0,45, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8, 2,1, 2,4, 2,7, 3, 3,3, 3,9 mM) en el tapón anteriormente descrito, y se incuban a 37 ºC durante cinco minutos. Se realiza un ensayo en paralelo de un control que contiene tampón sin sustrato (PBG), en las mismas proporciones. La reacción enzimática se para mediante congelación de las muestras en nitrógeno líquido. A continuación se realiza una nueva incubación de la mezcla con 6 µl de uroporfirinógeno 3 sintasa (U3S) 25 mM, a 37 ºC durante 30 minutos, para transformar el pre-uroporfobilinógeno en uroporfobilinógeno III. La reacción se para nuevamente mediante congelación en nitrógeno líquido. Posteriormente el CO_2 y uroporfirinógenos formados se oxidan a uroporfirinas mediante la adición de 25 µl de solución I2/KI e incubación durante 10 minutos en hielo y oscuridad. A continuación, el exceso de iodo se decolora añadiendo 25 µl de solución saturada de metabisulfito sódico. Se añaden 250 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % para precipitar la proteína, y se centrifugan las muestras a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos. Por último, se realizan diferentes diluciones del sobrenadante en HCl 0,1 M para medir el cambio de absorbancia a 405 nm con respecto a la muestra control.

Cálculo de constantes de inhibición: las constantes de inhibición se han calculado a partir de los datos globales que se ajustan a todos los valores en presencia de inhibidor de acuerdo con las metodologías divulgadas en la técnica anterior (Structure and mechanism in protein Science, Alan Fersht, 1999, Ed. Freeman and Co. (New York), Pág. 105-115).

Ejemplo 1

Evaluación del efecto inhibidor de 7-fluoro-triptófano sobre porfobilinógeno deaminasa

Cantidades crecientes de 7-fluoro-triptófano (F-TRP) muestran una progresiva inhibición de la actividad catalítica siguiendo un esquema de inhibición competitiva (Fersht A. (1999) Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. Ed. Freeman and Co. New York.) en el que el inhibidor y el sustrato compiten por la unión no covalente al centro activo de la proteína. El diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) representado en la Figura 1 refleja los resultados obtenidos. El cambio de pendiente pero con la misma ordenada en un diagrama LwB es indicativo de una inhibición competitiva.

Ejemplo 2

Evaluación del efecto inhibidor de indol sobre porfobilinógeno deaminasa

El indol (IND) también muestra capacidad para inhibir la actividad catalítica de la PBGD siguiendo un esquema de inhibición competitiva en el que el inhibidor y el sustrato compiten por la unión no covalente al centro activo de la proteína. El diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) representado en la Figura 2 refleja los resultados obtenidos. El cambio de pendiente pero con la misma ordenada en un diagrama LwB es indicativo de una inhibición competitiva.

Ejemplo 3

Evaluación del efecto inhibidor de D-triptófano sobre porfobilinógeno deaminasa

El D-triptófano (DTRP) también muestra capacidad para inhibir la actividad catalítica de la PBGD siguiendo un esquema de inhibición competitiva en el que el inhibidor y el sustrato compiten por la unión no covalente al centro activo de la proteína. El diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) representado en la Figura 3 refleja los resultados obtenidos. El cambio de pendiente pero con la misma ordenada en un diagrama LwB es indicativo de una inhibición competitiva.

Ejemplo 4

Evaluación del efecto inhibidor de pirrol sobre porfobilinógeno deaminasa

El pirrol (PYR) también muestra capacidad para inhibir la actividad catalítica de la PBGD siguiendo un esquema de inhibición competitiva en el que el inhibidor y el sustrato compiten por la unión no covalente al centro activo de la proteína. El diagrama de Lineweaver-Burk (LwB) representado en la Figura 4 refleja los resultados obtenidos. El cambio de pendiente pero con la misma ordenada en un diagrama LwB es indicativo de una inhibición competitiva.

Ejemplo 5

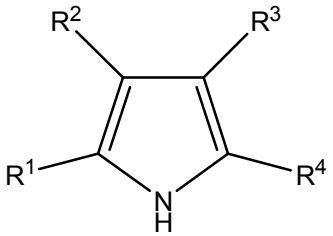
Constantes de inhibición sobre porfobilinógeno deaminasa

La siguiente tabla muestra las constantes de inhibición (Ki) de la actividad catalítica de la PBGD para algunos compuestos de la invención:

Nombre del compuesto	Acrónimo	Ki
2,4-dimetil-1H-pirrol	2,4-CH3-PYR	6 μM
2,5-dimetil-1H-pirrol	2,5-CH3-PYR	3 μM

REIVINDICACIONES

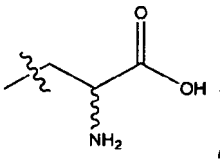
1. Un compuesto de fórmula general (I)



en la que

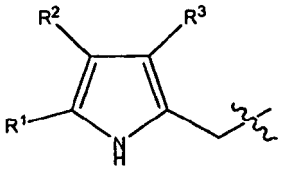
R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C_1-C_6, o R^1 y R^2 están unidos entre sí formando un anillo de benceno condensado opcionalmente sustituido,

R^3 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo C_1-C_6

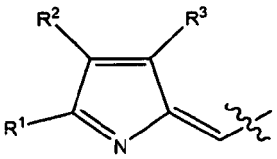


y

R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y alquilo C_1-C_6, o R^4 representa



o

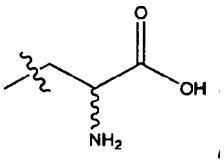


para su uso en el tratamiento y/o prevención de la porfiria eritropoyética congénita (PEC).

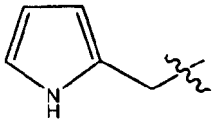
2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y metilo, o R^1 y R^2 están unidos entre sí formando un anillo de benceno condensado sin sustituir o sustituido en posición 4 o 7 del indol con metilo o halógeno.

3. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que al menos dos de R^1, R^2, R^3 y R^4 representan simultáneamente metilo.

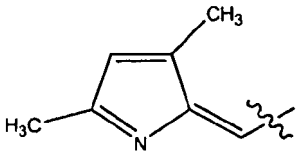
4. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R^3 se selecciona del grupo que consiste en H, metilo, y



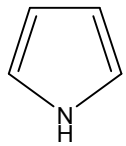
5. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R^4 se selecciona del grupo que consiste en H y metilo, o R^4 representa

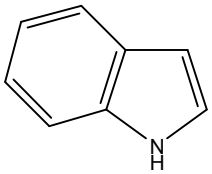


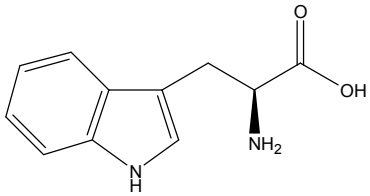
o

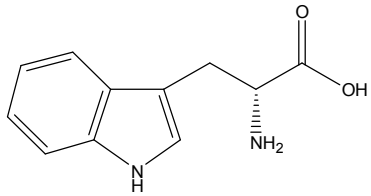


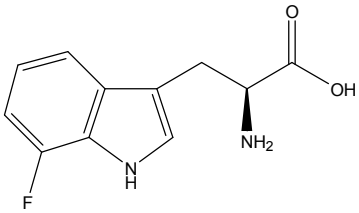
6. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) se selecciona de:

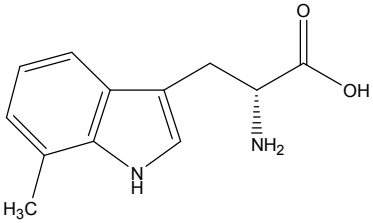


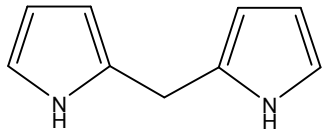


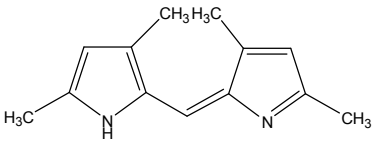


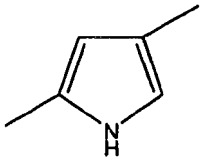


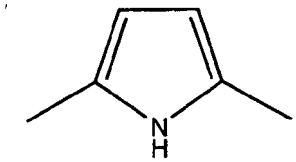


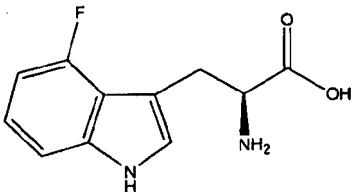












7. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que su uso en el tratamiento y/o prevención de la porfiria eritropoyética congénita (PEC) comprende inhibir la actividad catalítica del enzima porfobilinógeno deaminasa (PBGD).

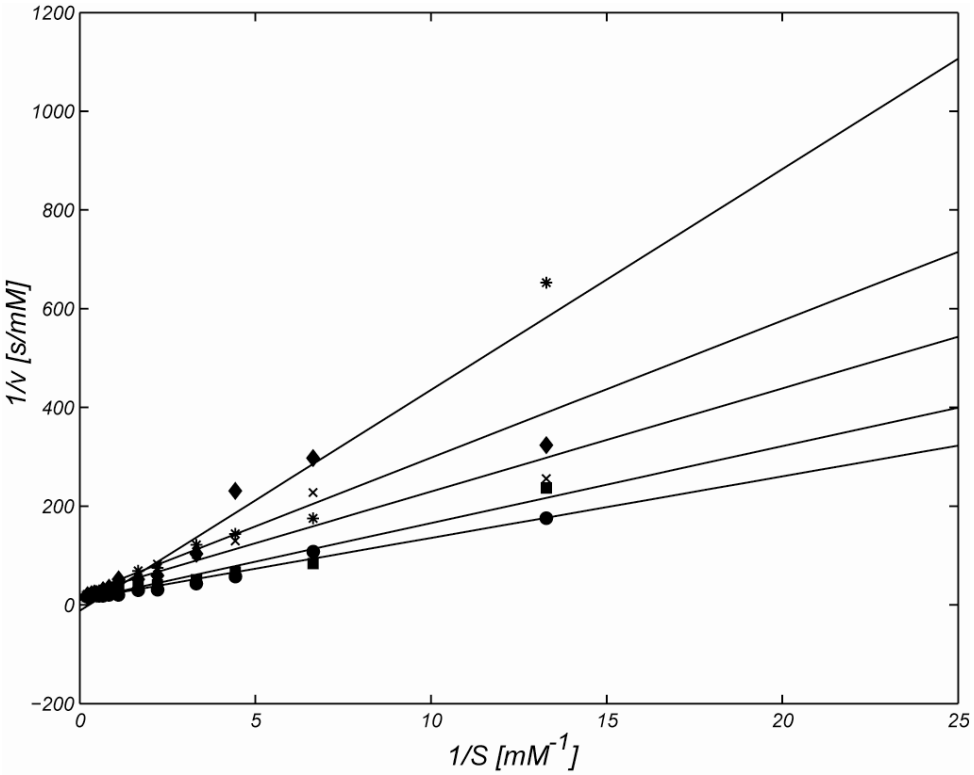


FIGURA 1

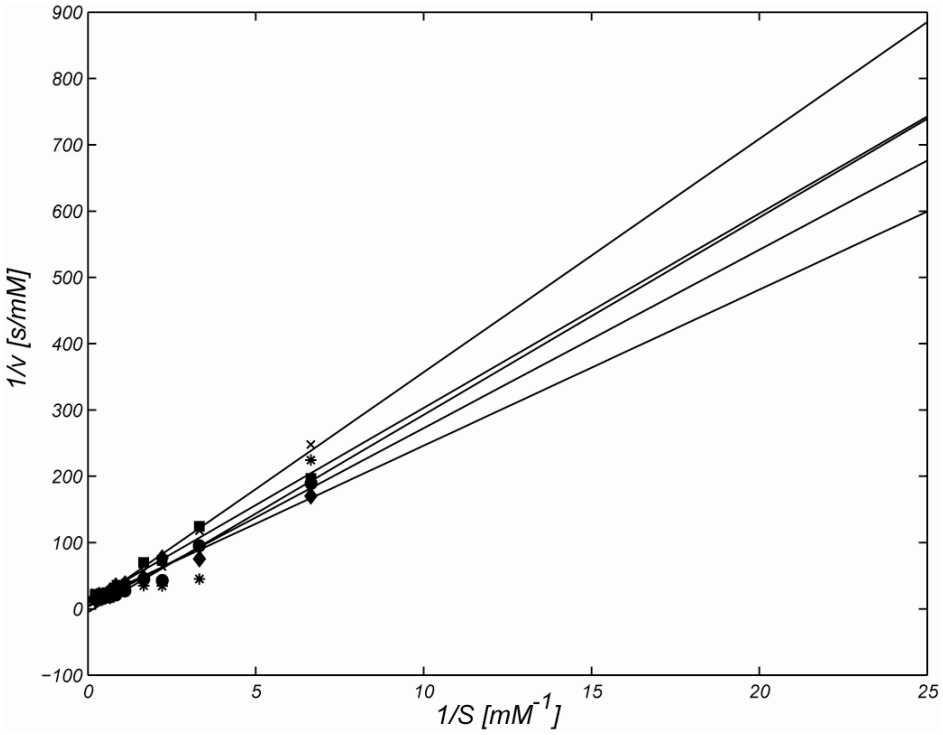


FIGURA 2

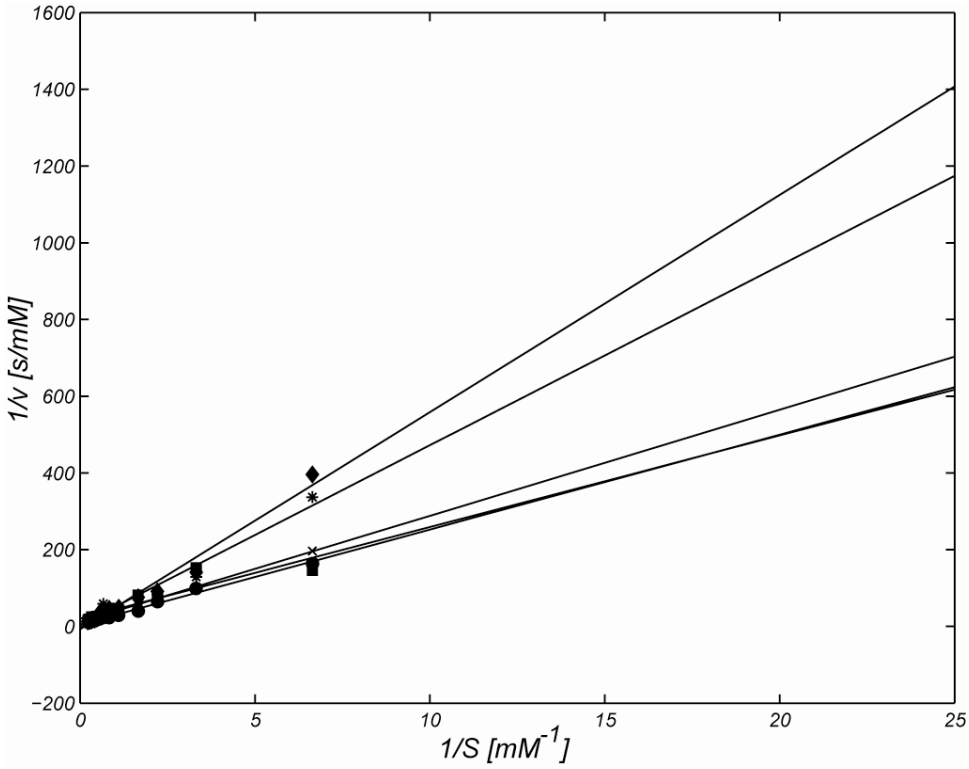


FIGURA 3

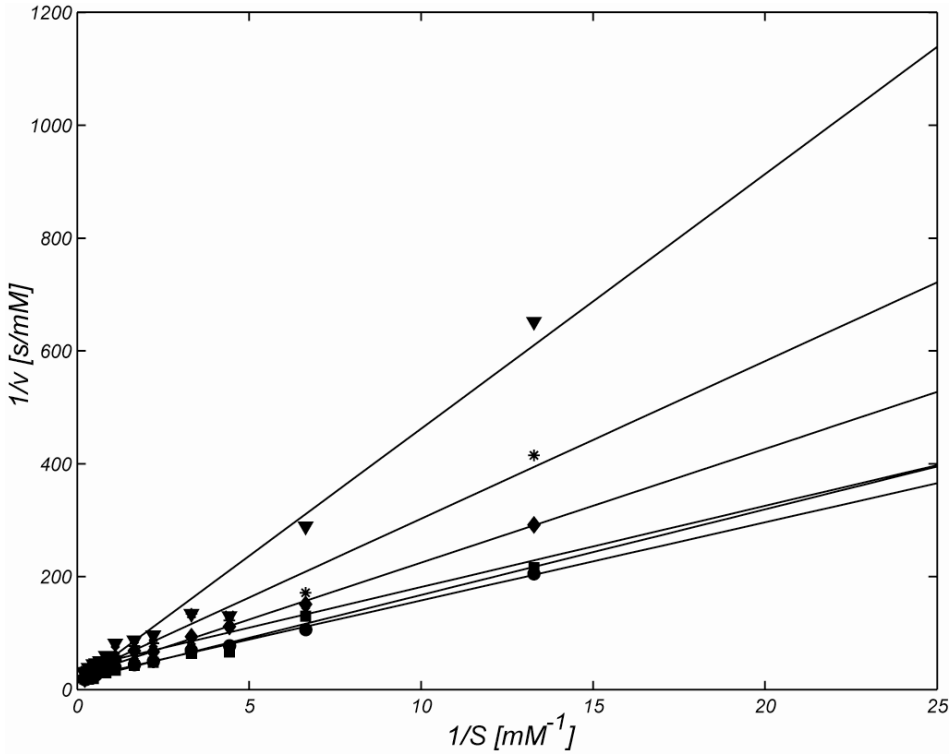


FIGURA 4