

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 853**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2010** **E 10727003 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 2448600**

54 Título: **Compuestos dirigidos al receptor del manosa 6-fosfato independiente de cationes**

30 Prioridad:

03.07.2009 EP 09305647

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2016

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%) y
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GARCIA, MARCEL;
MORERE, ALAIN;
GARY-BOBO, MAGALI;
CERUTTI, MARTINE;
EL CHEIKH, KHALED;
BASILE, ILARIA y
NIRDE, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 576 853 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

Compuestos dirigidos al receptor del manosa 6-fosfato independiente de cationes

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a compuestos dirigidos al receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes.

10 **Estado de la técnica**

El receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-M6PR), una glucoproteína transmembrana de 300 kDa, desempeña papeles muy importantes en muchos procesos biológicos. El papel principal del CI-M6PR es el transporte y la selección de enzimas lisosomales que contienen en su estructura el marcador de reconocimiento de la manosa 6-fosfato (M6P), desde la red de *trans*-Golgi hacia los lisosomas. El CI-M6PR media igualmente la endocitosis de ligandos extracelulares que contienen la M6P. Las proteínas que contienen la M6P, que se distinguen de las enzimas lisosomales y son internalizadas gracias al transporte por CI-M6PR, incluyen la granzima B, una proteasa implicada en la apoptosis inducida por las células T citotóxicas; el virus del herpes simple (HSV)⁷; e incluso el factor inhibidor de la leucemia (LIF), una proteína multifuncional que desempeña un papel importante en la formación neuronal, de las plaquetas y del hueso. La renina también se internaliza vía el CI-M6PR que permite su eliminación. El CI-M6PR, también actúa sobre las moléculas que no penetran en las células como el precursor latente del factor de crecimiento transformante beta (L-TGFβ), la forma precursora de una hormona que regula el crecimiento celular y actúa en otro proceso implicado en la activación del L-TGFβ, la conversión del plasminógeno en plasmina gracias a una serina proteasa, el activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). El pro-UPA es escindido por proteólisis y por lo tanto activado cuando se une en la superficie de la célula, a un receptor específico de la uroquinasa (uPAR), que tiene una afinidad por el CI-M6PR. Además, los estudios sugieren que el CI-M6PR puede actuar como un supresor del tumor, ya que modula el nivel local del factor de crecimiento insulínico tipo II mitógeno (IGF2) y la pérdida de función del CI-M6PR es asociada con la progresión de una alta proporción de hepatocarcinomas. Como el CI-M6PR se une al IGF2 y lo internaliza por endocitosis para destruirlo en los compartimentos lisosomales, este receptor es llamado también receptor M6P/IGF-2. Otro ligando de este receptor es el ácido retinoico, que está implicado en la apoptosis y en la inhibición del crecimiento. Estos tres ligandos (M6P, IGF2, ácido retinoico) son reconocidos por diferentes sitios de unión extracelulares situados en el CI-M6PR, que contiene 15 dominios repetidos. El resto fosfato, así como los grupos hidroxilos en el anillo manopiranosídico de la M6P, contribuyen a una red de enlaces de hidrógeno con dos sitios de unión situados en los dominios 3 y 9 del CI-M6PR. Esta capacidad de reconocer dos residuos de M6P permite al CI-M6PR enlazar las enzimas lisosomales con una alta afinidad (Kd = 2 nM).

Se ha propuesto el uso de la fuerte afinidad entre la M6P y el CI-M6PR para desarrollar terapias enzimáticas sustitutivas, especialmente para las deficiencias de enzimas lisosómicas.

40 Sin embargo, los aprovisionamientos por las enzimas necesarias son limitados y la producción a gran escala de cantidades suficientes de enzimas para la administración terapéutica es difícil. Además, las enzimas lisosomales purificadas a partir de sistemas de expresión recombinantes están a menudo mal fosforiladas y el grado de fosforilación de la M6P varía considerablemente según las enzimas diferentes. Las enzimas lisosomales que carecen de la fosforilación para M6P mal compiten por la captación endocitótica mediada por el receptor por las células diana y son así de eficacia limitada en la terapia enzimática sustitutiva.

50 Zhu (Patente de Estados Unidos N° 7.001.994) proporciona métodos para la introducción de oligosacáridos de tipo manopiranosil altamente fosforilados que contienen la M6P en grupos carbonilo generados en la porción glicosídica de las enzimas lisosomales, manteniendo al mismo tiempo su propia actividad biológica. Estos oligosacáridos manopiranosidos que contienen la M6P, son generalmente fosfato de pentamanoas y se tratan químicamente para que contengan un grupo que reaccione con el carbonilo en lugar de uno grupo hidroxilo de la estructura del azúcar. Después, este grupo reactivo a carbonilo se hace reaccionar con una glucoproteína oxidada para formar una glucoproteína-M6P. Como se muestra en la sección experimental de la patente de Estados Unidos N.º 7.001.994, estos compuestos, mientras que conservan una buena actividad enzimática, tienen una baja afinidad por el CI-M6PR. Según Zhu, esta baja afinidad es debida a un impedimento estérico de los grupos aldehído próximos.

60 Por lo tanto, estos compuestos no son adecuados para una terapia enzimática sustitutiva satisfactoria y así se necesitan nuevos compuestos que tengan una alta afinidad por el CI-M6PR (lo que permite de este modo un direccionamiento específico de los compuestos al lisosoma) y que conserven una buena actividad biológica.

Un conjugado de la manosa 6-fosfato-colesterilamina actuando como adhesivo molecular específico que enlaza las células cancerosas con vesículas, es descrito por Barragan et al., *Chem. Commun.*, 2001, 85-86.

65 **Objeto de la invención**

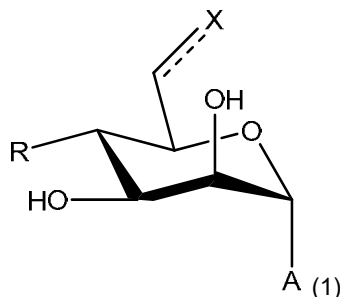
La invención se refiere a conjugados de productos de interés y de compuestos dirigidos al receptor de manosa 6-

fosfato independiente de cationes con una alta afinidad. Estos productos de interés, por ejemplo, las glucoproteínas y nanopartículas, se dirigen por tanto específicamente al lisosoma. Los conjugados de acuerdo con la invención, tienen por tanto muchas aplicaciones en el campo del diagnóstico y la terapia, y en particular en las terapias enzimáticas sustitutivas por el tratamiento de enfermedades por almacenamiento lisosomal en el cuerpo humano o animal.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a un conjugado, en el que dicho conjugado es

- un producto de interés Y seleccionado del grupo que consiste en glucoproteínas, nanopartículas y marcadores para la formación de imágenes médicas, conjugado mediante un enlazador L con
- un compuesto que tiene la fórmula (1)



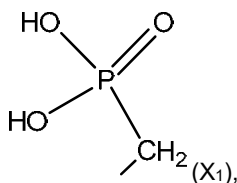
en la que

- la línea punteada representa un enlace que está presente o no,
- X representa un análogo de un grupo fosfato,
- R se selecciona del grupo que consiste en H y OH,
- A se selecciona del grupo que consiste en O, S y CH₂,

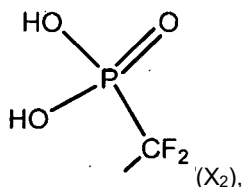
y en la que

- dicho compuesto que tiene la fórmula (1) está unido al enlazador a través del resto A,
- dicho enlazador L separa A e Y mediante una cadena de 4 a 15 átomos consecutivos,
- cuando dicho enlace representado por la línea punteada no está presente, X se selecciona en el grupo que consiste en:

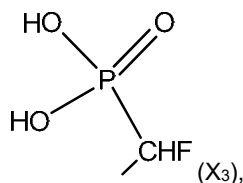
o un grupo fosfonato saturado que tiene la fórmula



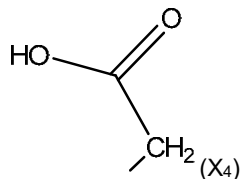
o un grupo bis-fluoro fosfonato que tiene la fórmula



o un grupo fluoro fosfonato que tiene la fórmula

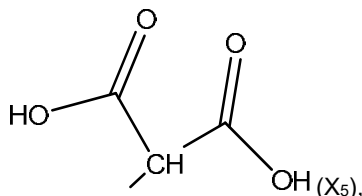


o un grupo carboxilato saturado que tiene la fórmula



y

5 o un grupo malonato que tiene la fórmula

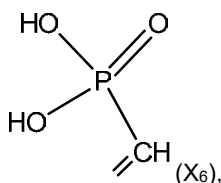


- cuando dicho enlace representado por la línea de puntos está presente, X se selecciona en el grupo que consiste en:

10

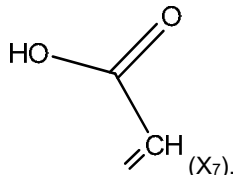
o un grupo fosfonato insaturado que tiene la fórmula

o



y

15 o un grupo carboxilato insaturado que tiene la fórmula



Como se usa en el presente documento, el término "conjugado" se refiere a dos productos/compuestos unidos covalentemente entre sí.

20

Como se usa en el presente documento, el término "conjugar" significa unir dos productos/compuestos entre sí.

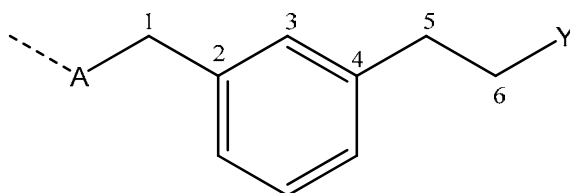
Como se usa en el presente documento, "M6P" significa manosa-6-fosfato.

25 Como se usa en el presente documento, "CI-M6PR" significa receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes.

De acuerdo con la invención, el número de "átomos consecutivos" debe calcularse a partir del primer átomo del enlazador hasta el último átomo del enlazador, siguiendo la cadena más corta de átomos consecutivos. De hecho, si el enlazador contiene sistemas cíclicos o heterocíclicos, el número de átomos debe calcularse siguiendo la cadena más corta de átomos entre A e Y.

30

Un ejemplo de numeración de acuerdo con la invención se da en la siguiente fórmula:



35

Como se muestra en esta fórmula, este enlazador separa A e Y por una cadena de 6 átomos consecutivos.

Los conjugados de acuerdo con la invención, que comprenden un análogo de M6P terminal particular, se dirigen específicamente al CI-M6PR con alta afinidad, no descrita hasta la fecha. Además, en su investigación, los inventores han demostrado también que es posible aumentar la afinidad entre un producto que contiene un análogo de M6P terminal y el CI-M6PR mediante la inserción de un enlazador que tiene una longitud particular entre el análogo de M6P y el producto de interés que debe ser enviado al lisosoma. Sin desear quedar vinculados a teoría alguna, los productos que contienen M6P conocidos hasta la fecha, tales como, por ejemplo, los productos descritos en el documento US 7.001.994, tienen una mala afinidad por el CI-M6PR y por tanto malas propiedades de direccionamiento debido al impedimento estérico inducido por el producto mismo cerca de los sitios de enlace de la M6P en el CI-M6PR. Gracias al enlazador de acuerdo con la invención, el impedimento estérico entorno a los sitios de unión por la M6P del CI-M6PR se reduce o elimina (véase Fig. 1 de la invención), explicando de este modo el considerable aumento de afinidad de los conjugados de acuerdo con la invención para el CI-M6PR en comparación con los productos conocidos en la técnica anterior.

Por tanto, los conjugados de la invención representan candidatos muy prometedores para la terapia de reemplazo enzimático de las enfermedades lisosomales.

Como se ha mencionado anteriormente, los conjugados de la invención tienen una alta afinidad (CI_{50}) para el CI-M6PR. En particular, los conjugados de acuerdo con la invención tienen un CI_{50} mínimo de 100 μM , es decir, un CI_{50} de como máximo 100 μM , según se midió mediante el ensayo de unión al receptor descrito en Jeanjean A. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(2006) 3575-3582.

De acuerdo con la invención, es adecuado cualquier tipo de enlazador L que asegure un espacio suficiente entre el resto del análogo de M6P y el producto que está unido al compuesto de acuerdo con la invención. Los inventores han descubierto que se obtiene el "espaciamiento suficiente" entre el resto análogo del M6P y el producto cuando el enlazador separa A e Y por 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 átomos consecutivos. Se ha descubierto que esta longitud del enlazador permite la penetración óptima del análogo de M6P en el bolsillo de unión del CI-M6PR, asegurando así la máxima afinidad del compuesto de la invención con el CI-M6PR.

De acuerdo con la invención, la elección del enlazador dependerá de la naturaleza del producto de interés que va a conjugarse con el compuesto de fórmula (1). De hecho, el experto entenderá fácilmente que la longitud del enlazador aumentará con el impedimento estérico asociado con el producto que se debe vincular. Por ejemplo, si el producto es una proteína que no causa un gran impedimento estérico cerca de los sitios de unión de la M6P del CI-M6PR, un enlazador de 4 átomos consecutivos es suficiente para asegurar una afinidad satisfactoria de la proteína para el CI-M6PR. En cambio, si el producto es una proteína, una nanopartícula o un producto de interés que causa un alto impedimento estérico cerca de los sitios de unión por la M6P del CI-M6PR, será necesario un enlazador de más de 4 átomos consecutivos para garantizar la afinidad satisfactoria del producto para el CI-M6PR.

Típicamente, en los compuestos de acuerdo con la invención, dicha cadena de átomos de dicho enlazador L es una cadena de alquilo o alquenilo sustituida o no, lineal o ramificada, en particular una cadena de alquilo o alquenilo C_1 - C_{30} sustituida o no sustituida, lineal o ramificada, en la que uno o más átomos de carbono de dicha cadena pueden estar opcionalmente reemplazados por un grupo químico seleccionado del grupo que consiste en éter (-O-), amino (-NH), tioéter (-S-), amida (-CO-NH-), urea (-NH-CO-NH-), carbamato (-NH-CO-O-), y los sistemas cíclicos o heterocíclicos, estando dichos sistemas cíclicos o heterocíclicos saturados o insaturados, y sustituidos o no sustituidos, y a condición de que dicha cadena separe los restos A e Y por al menos 4 átomos consecutivos.

Típicamente, dicha cadena de alquilo o alquenilo C_1 - C_{30} de acuerdo con la invención es una cadena de alquilo o alquenilo C_1 - C_{25} , en particular una cadena de alquilo o alquenilo C_1 - C_{20} , más particularmente una cadena de alquilo o alquenilo C_1 - C_{15} . Dicha cadena de alquilo o alquenilo C_1 - C_{15} es típicamente una cadena de alquilo o alquenilo C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , C_{11} , C_{12} , C_{13} , C_{14} o C_{15} .

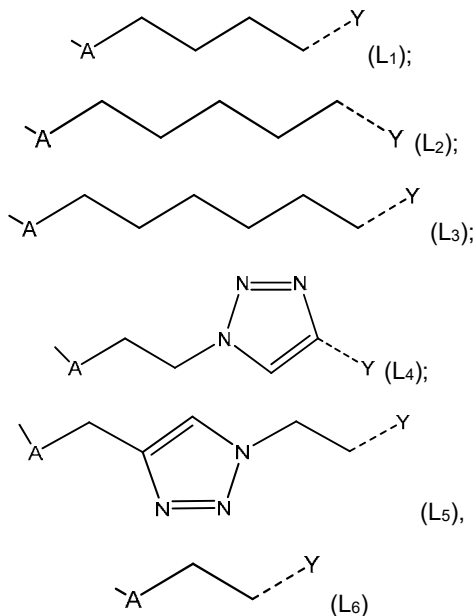
En una realización particular, dichos sistemas cíclicos o heterocíclicos se seleccionan del grupo que consiste en azetidina, oxetano, tietano, pirrol, piranosa, furanosa, furano, pirrolina, tetrahydrofurano, tiofeno, tetrahydrotiofeno, pirazol, imidazol, oxazol, isoxazol, pirazolina, imidazolina, pirazolidina, imidazolidina, dioxolano, tiazol, isotiazol, tiazolidina, isoxazolidina, triazol, oxadiazol, furazano, tiadiazol, tetrazol, piridina, naftiridina, pirano, dihidro-pirano, piperidina, piridazina, pirimidina, purina, pirazina, pteridina, oxazina, dioxina, piperazina, morfolina, dioxano, tiazina, tiomorfolina, oxatiano, ditiano, triazina, trioxano, tiadiazina, ditiazina, tritiano, ciclobutano, ciclobuteno, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, cicloheptano, ciclohexeno, ciclohepteno y el benceno y sus derivados.

Como se ha mencionado anteriormente, dicha cadena de alquilo o alquenilo y dichos sistemas cíclicos o heterocíclicos pueden estar sustituidos, por ejemplo con un alquilo C_1 - C_{10} (es decir, un alquilo C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 o C_{10}), tal como por ejemplo con un metilo, etilo, propilo o isopropilo, o con grupos funcionales, tales como, por ejemplo, con las funciones alcohol, amina, amida, cetona, éster, éter o ácida, etc.

Un ejemplo particular de un sistema cíclico sustituido de acuerdo con la invención es la ciclobut-3-eno-1,2-diona.

Algunos ejemplos de derivados de benceno son indeno, indano, indolizina, indol, benzofurano, indolina, benzotiofeno, indazol, benzimidazol, benzotiazol, naftaleno, tetralina, quinolina, cromoeno, cromano, cinolina, quinazolina, quinoxalina y ftalazina.

- 5 En una realización particular, el enlazador L de acuerdo con la invención tiene una estructura química seleccionada del grupo que consiste en:



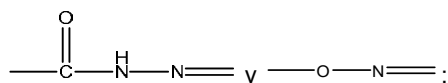
y

en la que:

"-----Y" representa:

(a) -Y, o

(b) -T-Y, en el que T es una parte del enlazador y representa un resto químico seleccionado del grupo que consiste en:



y

"A-" representa el resto del compuesto de acuerdo con la invención como se define en la fórmula (1).

En los conjugados de acuerdo con la invención, Y se conjuga con al menos un compuesto que tiene la fórmula (1). En una realización particular, en los conjugados de acuerdo con la invención, Y se conjuga con más de un compuesto que tiene la fórmula (1). Típicamente, dicho producto de interés Y se conjuga mediante un enlazador L de acuerdo con la invención, con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 1000 o más compuestos que tienen la fórmula (1) de acuerdo con la invención. Este número dependerá de la naturaleza del producto Y que está conjugado. Por ejemplo, si el producto Y es una nanopartícula, dicha nanopartícula puede conjugarse a través de un enlazador L de acuerdo con la invención, con más de 1000 compuestos que tienen la fórmula (1), en particular con 200.000 a 400.000 compuestos que tienen la fórmula (1).

De acuerdo con la invención, cuando Y se conjuga con más de un compuesto de fórmula (1), cada compuesto está unido a Y a través de un enlazador L que puede ser igual o diferente (en otras palabras, y por ejemplo, si Y se conjuga con cinco compuestos que tienen la fórmula (1), cada compuesto que tiene la fórmula (1) se conjuga a Y a través de un grupo enlazador L, siendo cada enlazador L idéntico o diferente.

Además, dado que el CI-M6PR contiene dos sitios de unión para la M6P, la afinidad de los conjugados de acuerdo con la invención para el CI-M6PR será más alta en el orden de 50 a 100 veces si los ambos sitios de unión de dicho CI-M6PR están ocupados por dos análogos de M6P de un mismo conjugado. Del mismo modo, cuando dos CI-M6PR están en forma dimérica, la afinidad de los conjugados de acuerdo con la invención para el dímero CI-M6PR será mejor si por lo menos dos sitios de unión de los cuatro sitios de unión de dicho dímero CI-M6PR están ocupados por los análogos de M6P del conjugado.

En consecuencia, en una realización, el conjugado de acuerdo con la invención es un producto de interés Y

conjugado a través de un enlazador L que comprende al menos dos compuestos que tienen la fórmula (1), en el que al menos dos análogos de M6P de dichos al menos dos compuestos son reconocibles por los dos sitios de unión por la M6P de un mismo CI-M6PR o por dos sitios de unión de la M6P de un dímero de CI-M6PR.

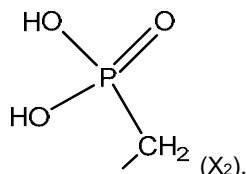
5 En otra realización más, el conjugado de acuerdo con la invención es un producto de interés Y conjugado mediante un enlazador L con al menos cuatro compuestos que tienen la fórmula (1), en el que cuatro análogos de M6P de dichos al menos cuatro compuestos son reconocibles por los cuatro sitios de unión de la M6P de un dímero de CI-M6PR.

10 Alguien experto es capaz de calcular el número de compuestos que tienen la fórmula (1) que es necesario que se conjuguen con Y para obtener compuestos con una alta afinidad para el CI-M6PR. Como es fácilmente comprensible para la persona experta, la probabilidad de tener dos análogos de M6P dispuestos espacialmente de una manera que permita su reconocimiento por dos sitios de unión de un mismo CI-M6PR o por dos sitios de unión de un dímero de CI-M6PR aumentará con el número de compuestos que tienen la fórmula (1) que estén unidos a Y. Cuanto más
15 elevado es el número de compuestos que tienen la fórmula (1) conjugados con Y, más alta es la probabilidad de tener un conjugado con una alta afinidad para el CI-M6PR. De acuerdo con la estructura Y seleccionada, la persona experta es capaz de calcular las concentraciones óptimas de los compuestos de fórmula (1) para lograr una alta afinidad para el CI-M6PR y evitar el impedimento estérico debido a la estrecha proximidad entre los compuestos de fórmula (1).

20 Por lo tanto, la afinidad de los conjugados de acuerdo con la invención generalmente se incrementará típicamente con el número de compuestos que tienen la fórmula (1) conjugados a Y. En consecuencia, cuando dos análogos de M6P de al menos dos compuestos del conjugado son reconocibles por los dos sitios de unión de la M6P del mismo CI-M6PR, o cuando dos análogos de M6P de al menos dos compuestos del conjugado son reconocibles por dos
25 sitios de unión de la M6P de un dímero de CI-M6PR o cuando cuatro análogos de M6P de por lo menos cuatro compuestos del conjugado son reconocibles por los cuatro sitios de unión de la M6P de un dímero CI-M6PR, entonces los conjugados de acuerdo con la invención tienen un CI_{50} de como máximo 100 nM, particularmente de como máximo 50 nM, más particularmente de como máximo 25 nM, y lo más particularmente de como máximo 2 nM.

30 En otra realización, en dichos conjugados de acuerdo con la invención, dicho compuesto de fórmula (1) tiene la fórmula (1) en la que

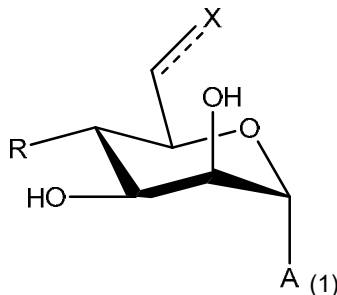
- el enlace representado por la línea punteada no está presente, y
- X es un grupo fosfonato saturado cuya fórmula es



- y
- A es como se ha definido anteriormente.

40 En una realización particular, la invención se refiere a un conjugado, en el que dicho conjugado es

- un producto de interés Y seleccionado entre el grupo que consiste en glucoproteínas, nanopartículas y marcadores para la formación de imágenes médicas, conjugado a través de un enlazador L con
- un compuesto que tiene la fórmula (1)



45 en la que

- la línea punteada representa un enlace que está presente o no,
- cuando dicho enlace no está presente, X se selecciona del grupo que consiste en X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 ,
- cuando dicho enlace está presente, X se selecciona del grupo que consiste en X_6 y X_7 ,
- R se selecciona del grupo que consiste en H y OH,

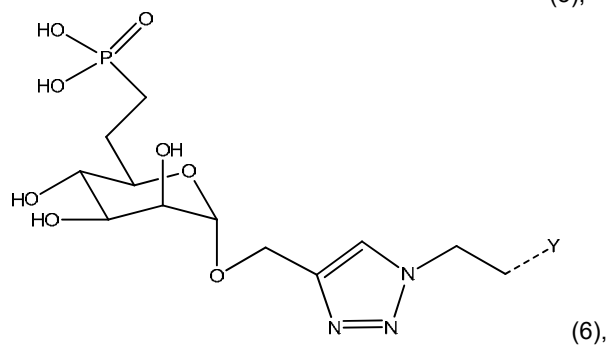
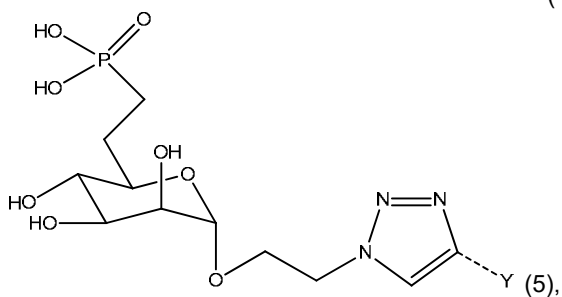
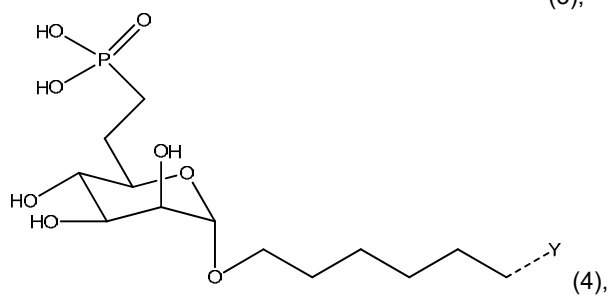
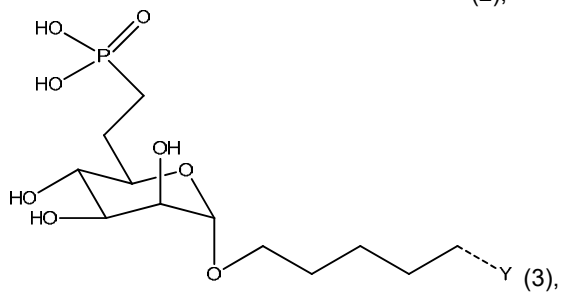
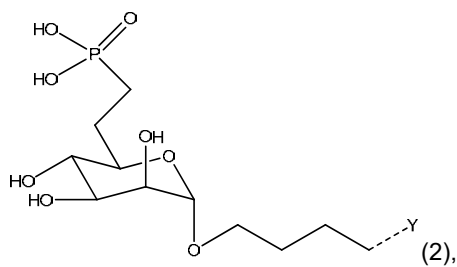
- A es O,

y en la que

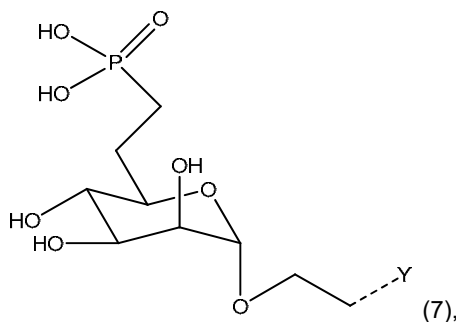
- 5
- dicho compuesto que tiene la fórmula (1) se une al enlazador a través del resto A, y
 - dicho enlazador L separa A e Y por una cadena de 4 a 15 átomos consecutivos, teniendo o comprendiendo dicho enlazador L una fórmula seleccionada del grupo que consiste en L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ y L₆.

En una realización particular de la invención, los conjugados de la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

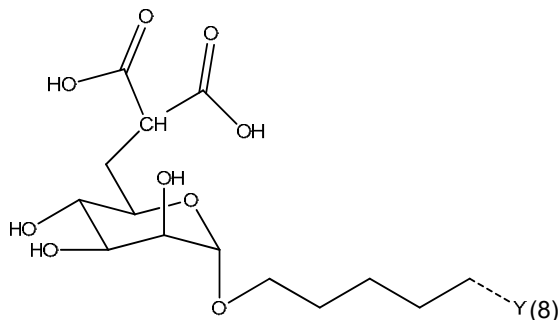
10



15



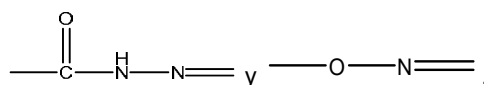
y



5 en el que "----Y" representa:

- (a) -Y, o
- (b) -T-Y, en el que T es una parte del enlazador y representa un resto químico seleccionado del grupo que consiste en

10



15

El producto de interés de acuerdo con la invención se selecciona del grupo que consiste en glucoproteínas, nanopartículas y marcadores para la formación de imágenes médicas (por ejemplo, un radiomarcador, un marcador de fluorescencia, etc.).

20

Las nanopartículas pueden ser de diferentes naturalezas: algunos ejemplos de nanopartículas son nanopartículas de dendrímeros, las nanopartículas de micelas, nanopartículas de liposomas, nanopartículas de sílice mesoporosa y nanopartículas magnéticas. Estas nanopartículas tienen diversas aplicaciones, por ejemplo para la administración de fármacos (fármaco terapéutico o citotóxico), terapia contra el cáncer, resonancia magnética, formación de imágenes de fluorescencia, manipulación magnética o direccionamiento celular, tal como se describe, por ejemplo, por Liong M. et al., *ACS Nano*. 2: 889-96, 2008.

25

En una realización, dicho producto de interés Y es una glucoproteína.
Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a un conjugado, en el que dicho conjugado es

- una glucoproteína conjugada a través de un enlazador L de acuerdo con la invención con
- un compuesto que tiene la fórmula (1) de acuerdo con la invención.

30

Típicamente, la glucoproteína se conjuga con un compuesto que tiene la fórmula (1) de acuerdo con la invención a través de un enlazador L, uniendo dicho enlazador una cadena de oligosacáridos de dicha glucoproteína con el compuesto de fórmula (1). En otras palabras, el análogo de M6P está conjugado con una cadena de oligosacáridos de la glucoproteína a través del enlazador L.

35

Por consiguiente, en una realización particular, la invención se refiere a un conjugado, en el que dicho conjugado es una glucoproteína conjugada a través de un enlazador L de acuerdo con la invención con al menos dos compuestos que tienen la fórmula (1) de acuerdo con la invención, estando dichos compuestos unidos con la misma cadena de oligosacáridos o de dos cadenas de oligosacáridos diferentes de dicha glucoproteína, y en el que dos análogos de M6P de dichos al menos dos compuestos son reconocibles por los dos sitios de unión de M6P de un mismo CI-M6PR o por los dos sitios de unión de M6P de un dímero CI-M6PR.

40

En otra realización más, la invención se refiere a un conjugado, en el que dicho conjugado es una glucoproteína conjugada a través de un enlazador L de acuerdo con la invención, con al menos cuatro compuestos que tienen la

fórmula (1) de acuerdo con invención, estando unidos dichos compuestos a la misma cadena de oligosacáridos o a dos cadenas de oligosacáridos diferentes de dicha glucoproteína, y en el que cuatro análogos de M6P de dichos al menos dos compuestos son reconocibles por los cuatro sitios de unión de la M6P de un dímero de CI-M6PR.

- 5 De acuerdo con la invención, cuando dicha glucoproteína se conjuga con más de un compuesto de fórmula (1), cada compuesto se une a dicha glucoproteína a través de enlazador L que puede ser idéntico o diferente.

Típicamente, el conjugado de acuerdo con la invención, en el que Y es una glucoproteína, tiene una afinidad de unión para el CI-M6PR (CI_{50}) de como máximo 100 nM, según se midió por un método descrito en Jeanjean et al., *Bioorg Med Chem* (2006) 14:3575-82. En particular, dichos conjugados de acuerdo con la invención tienen una
10 afinidad de unión para el CI-M6PR (CI_{50}) de como máximo 50 nM. Más particularmente, dichos conjugados de acuerdo con la invención tienen una afinidad de unión para el CI-M6PR (CI_{50}) de como máximo 25 nM. Del modo más particular, dichos conjugados de acuerdo con la invención tienen una afinidad de unión para el CI-M6PR (CI_{50}) de como máximo 2 nM.

15 En una realización, dichas glucoproteínas son enzimas lisosomales.

En una realización particular, dichas enzimas lisosomales se seleccionan del grupo que consiste en 1-beta-galactosidasa ácida, esfingomielinasa ácida, alfa-D-manosidasa, alfa-fucosidasa, alfa-galactosidasa A, alfa-glucosaminidasa acetiltransferasa, alfa-glucosidasa, alfa-L-iduronidasa, alfa-N-acetilgalactosaminidasa, alfa-N-acetilglucosaminidasa, alfa-neuraminidasa, arilsulfatasa A, arilsulfatasa B, beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa, beta manosidasa, catepsina D, catepsina K, ceramidasa, cistinosina, galactocerebrosidasa, glucocerebrosidasa, activador del gangliósido GM2, heparán sulfatasa, hexosaminidasa A y hexosaminidasa B, hialuronidasa, iduronato sulfatasa, LAMP2, Linclin, lipasa ácida lisosomal, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa, N-acetil glucosamina-1-fosfotransferasa, N-acetilglucosamina-6-sulfato sulfatasa, N-aspartil-beta-glucosaminidasa, palmitoil-proteína tioesterasa-1, proteína protectora / catepsina A (PPCA), sialina, enzima TPP1.

Típicamente, las glucoproteínas que van a unirse a los compuestos de acuerdo con la invención se producen por ingeniería genética con sistemas de expresión recombinantes. Típicamente, dichas glucoproteínas se producen con
30 sistemas de expresión que permiten la producción de altos niveles (hasta 1.000 mg/l) de proteínas recombinantes funcionales y biológicamente activas adecuadamente modificadas post-traduccionalmente (plegamiento, formación de enlaces disulfuro, oligomerización, glicosilación, acilación, escisión proteolítica). Un sistema de expresión típico de acuerdo con la invención es el sistema de expresión por el vector Baculovirus. El sistema de expresión por el vector Baculovirus está basado en la introducción de un gen extranjero en una región del genoma no esencial para la replicación viral a través de una recombinación homóloga con un vector de transferencia que contiene el gen
35 diana. El Baculovirus recombinante resultante carece de un gen no esencial (por ejemplo polh, v-cath, chiA, etc.) reemplazado por un gen extranjero que codifica la proteína heteróloga. Dicha proteína, típicamente una glucoproteína, puede expresarse en células de insecto cultivadas y larvas de insectos. Típicamente, la expresión de la glucoproteína se realiza en células de insecto, que conducen a una glicosilación satisfactoria de las proteínas. Más particularmente, la expresión se realiza en las células de la línea celular Sf9 (*Spodoptera frugiperda*), que permite una glicosilación satisfactoria de las proteínas, estando dicha glicosilación libre de residuos α -1,3-fucosa que son inmunogénicos para los seres humanos.

Otro objeto de la invención se refiere al conjugado de acuerdo con la invención, para su uso en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal. De hecho, debido a que los conjugados de acuerdo con la invención tienen una alta afinidad para el CI-M6PR, pueden ser útiles en el diagnóstico de enfermedades o afecciones asociadas con el aumento o la disminución de la expresión de CI-M6PR.

Otro objeto de la invención se refiere a conjugados de acuerdo con la invención, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal. De hecho, los conjugados de acuerdo con la invención tienen muchas aplicaciones en el campo de la medicina.

Por ejemplo, se ha demostrado que en algunos cánceres de próstata, los CI-M6PR están sobreexpresados y se liberan autoanticuerpos anti-CI-M6PR en la circulación sanguínea (Huang YY, et al., *Clinical Immunology* 2004; 111 (2):202-9): al utilizar un conjugado de acuerdo con la invención que comprende, por ejemplo, un marcador de fluorescencia o un radiomarcador, es posible identificar las áreas del cuerpo donde están sobreexpresados los CI-M6PR y, por lo tanto, es posible irradiar al paciente con mucha precisión, sólo en las zonas que deben tratarse.

Otros ejemplos de enfermedades que pueden tratarse con los conjugados de acuerdo con la invención son las enfermedades causadas por una deficiencia en un producto Y en el lisosoma. Esta deficiencia puede compensarse por la administración de un conjugado de la invención, que es capaz de entregar específicamente el producto Y deficiente hacia el lisosoma.

La invención también se refiere en particular al conjugado de acuerdo con la invención para ser utilizado en un método para el tratamiento de un trastorno por almacenamiento lisosomal en el cuerpo humano o animal. De hecho, cuando Y es una enzima lisosomal, los conjugados de acuerdo con la invención se pueden utilizar en métodos de

tratamiento de un trastorno por almacenamiento lisosomal, en donde dicha enzima lisosomal Y falta o es deficiente.

También se describe un método para tratar a un paciente que padece un trastorno por almacenamiento lisosomal, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado de acuerdo con la invención en la que Y es una enzima lisosomal faltante o defectuosa en dicho trastorno por almacenamiento lisosomal.

Como se usa en el presente documento, por "faltante" se entiende que dicha enzima lisosomal no es producida por el paciente aquejado de dicha enfermedad lisosomal.

Como se usa en el presente documento, por "deficiente" se entiende que dicha enzima lisosomal es producida por dicho paciente aquejado de dicha enfermedad lisosomal en una cantidad que no es suficiente o en una forma inactiva.

Para cada trastorno por almacenamiento lisosomal que debe tratarse, la persona experta es capaz de seleccionar la enzima lisosomal apropiada para ser administrada para tratar dicha enfermedad. De hecho, la base molecular de los trastornos por almacenamiento lisosomal es bien conocida y descrita por ejemplo en B Winchester et al. *Biochem Soc Trans* en. Febrero de 2000; 28 (2): 150-4.

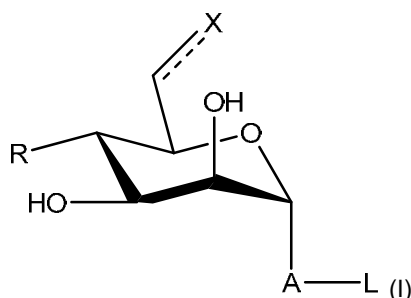
Los ejemplos no limitativos de trastorno por almacenamiento lisosomal que se pueden tratar de acuerdo con la invención son la deficiencia del activador/GM2 gangliosidosis, la alfa mannosidosis, la aspartilglucosaminuria, la enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol, la deficiencia crónica de hexosaminidasa A, la cistinosis, la enfermedad de Danon, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Farber, la fucosidosis, la galactosialidosis, la enfermedad de Gaucher (tipo I, tipo II y tipo III), la gangliosidosis GM1 (infantil, infantil tardía/juvenil, adulta/crónica), la enfermedad de células I /Mucopolipidosis tipo II, la enfermedad infantil de almacenamiento del ácido Siálico libre /ISSD, la deficiencia de hexosaminidasa A juvenil, la enfermedad de Krabbe (aparición infantil, aparición tardía), la leucodistrofia metacromática, los trastornos de Mucopolisacaridosis (Pseudopolidistrofia de Hurler/Mucopolipidosis IIIA, síndrome de Hurler MPSI, Síndrome de Scheie MPSI, síndrome de Hurler-Scheie MPS I, síndrome de Hunter MPS II, síndrome de Sanfilippo tipo A/MPS IIIA, síndrome de Sanfilippo tipo B/MPS III B, síndrome de Sanfilippo tipo C/MPS IIIC, síndrome de Sanfilippo tipo D/MPS III D, Morquio de tipo A/MPS IVA, Morquio de tipo B/MPS IVB, MPS IX deficiencia de hialuronidasa, síndrome de Maroteaux-Lamy MPS VI, síndrome de Sly MPS VII, Mucopolipidosis I / Sialidosis, Mucopolipidosis IIIC, Mucopolipidosis tipo IV), la deficiencia múltiple de sulfatasas, la enfermedad de Niemann-Pick (tipo A, B, C), la lipofuscinosis neuronal ceroid (enfermedad CLN6- tardía infantil atípica, variante de aparición tardía, juvenil de aparición temprana, enfermedad NCL/CLN3 Batten-Spielmeyer -Vogt/Juvenil, variante finlandés infantil tardía CLN5, enfermedad de Jansky-Bielschowsky/CLN2 infantil tardía/enfermedad TPP1, enfermedad de Kufs/aparición adulta NCL / CLN4, epilepsia del Norte/variante infantil tardía CLN8, enfermedad de Santavuori Haltia/CLN1 infantil/PPT, Beta-mannosidosis), la enfermedad de Pompe/enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II, la pichnodisostosis, la enfermedad de Sandhoff/aparición adulta/GM2 gangliosidosis, la enfermedad de Sandhoff/GM2 gangliosidosis - infantil, la enfermedad de Sandhoff/GM2 gangliosidosis - juvenil, la enfermedad de Schindler, la enfermedad de Salla/enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, Tay-Sachs/gangliosidosis GM2, y la enfermedad de Wolman.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en el presente documento, significa revertir, aliviar, inhibir el avance de, o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica éste término.

Como se usa en el presente documento, "sujeto" o "paciente" se refiere a un ser humano o un animal que puede beneficiarse de la administración de un producto como el que se enumera aquí.

Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un producto como se ha descrito anteriormente, se entiende una cantidad suficiente para tratar la enfermedad, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

También se describen compuestos que tienen la fórmula (I):



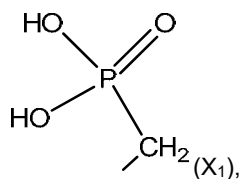
en la que:

- la línea punteada representa un enlace que está presente o no,
- X representa un análogo de un grupo fosfato,
- R se selecciona del grupo que consiste en H y OH,
- A se selecciona del grupo que consiste en O, S y CH₂,
- L representa un enlazador que comprende un grupo reactivo químico terminal Z capaz de reaccionar con un producto de interés Y para formar un conjugado, en donde los restos A e Y están separados por 4 a 15 átomos consecutivos,

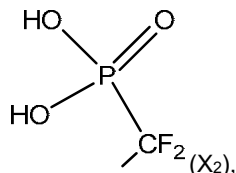
y en la que:

- cuando dicho enlace representado por la línea punteada está ausente, X se selecciona del grupo que consiste en:

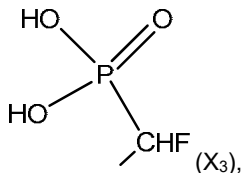
o un grupo fosfato saturado que tiene la fórmula



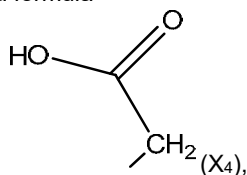
o un grupo bis-fluoro fosfonato que tiene la fórmula



o un grupo fluoro fosfonato que tiene la fórmula

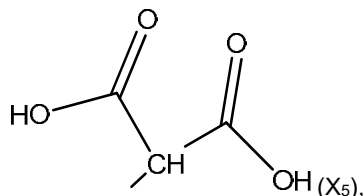


o un grupo carboxilato saturado que tiene la fórmula



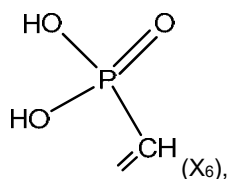
y

o un grupo malonato que tiene la fórmula

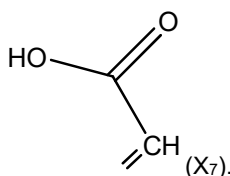


- cuando dicho enlace representado por la línea punteada está presente, X se selecciona del grupo que consiste en:

o un grupo fosfonato insaturado que tiene la fórmula



y
o un grupo carboxilato insaturado que tiene la fórmula



5

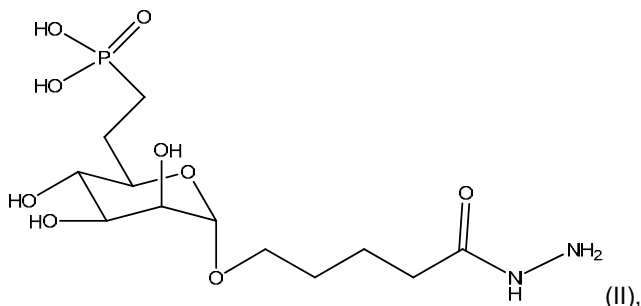
Todas las formas de realización particulares descritas anteriormente por la fórmula (1) son aplicables *mutatis mutandis* a la fórmula (I), y por lo tanto no se repiten en el mismo.

10 En particular, dicho enlazador L es tal como se define anteriormente en la fórmula (1), y comprende además un grupo químico reactivo terminal Z.

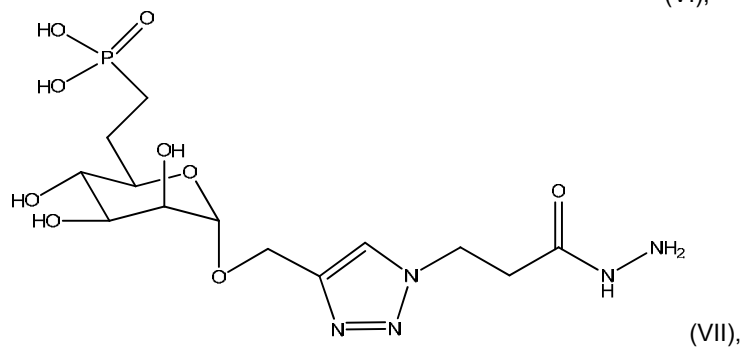
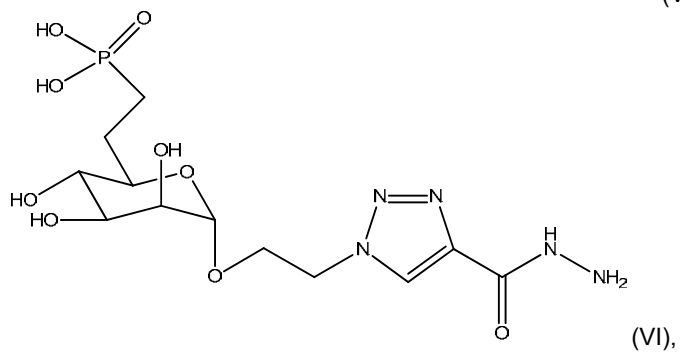
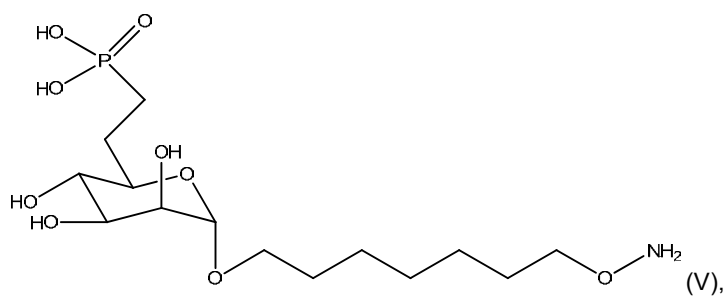
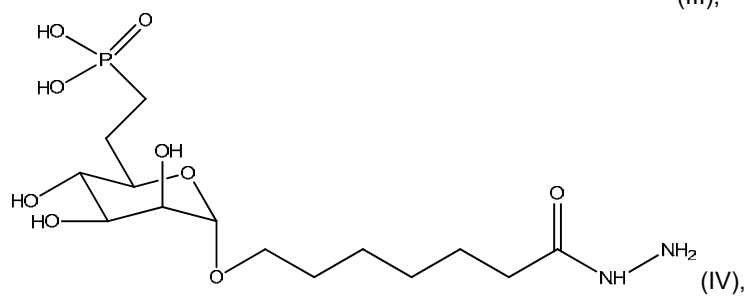
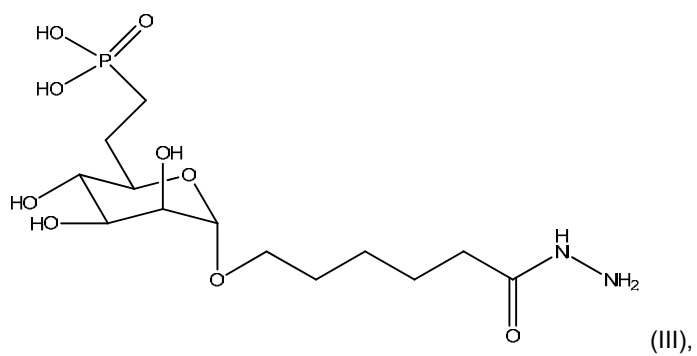
Típicamente dicho grupo reactivo químico Z se selecciona del grupo que consiste en un cualquier grupo funcional capaz de unirse por un enlace covalente, directamente o después de la activación, por lo menos a una de las funciones presentes naturalmente o introducidas artificialmente en Y. A modo de ejemplos no limitantes de funciones químicas reactivas adecuadas para los propósitos de la invención, se pueden citar en particular los grupos funcionales de ácido carboxílico y sus sales, ácido sulfónico y sus sales, anhídrido de ácido, ácido clorhídrico, éster (éster alquílicos, éster de p-nitrofenilo, éster succinimidílico, éster sulfosuccinimidílico, etc.), azida (acil azida, nitrofenilazida, etc.), hidrazida, 3-acil-1,3-tiazolidin-2-tiona, amina, amina sustituida, hidroxilamina de O-alquilo, amonio cuaternario, isocianato, isotiocianato, hidrazina, ftalimida, maleimida, acetamida halogenada, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina mono- o dihalogenada, diazina mono- o dihalogenada, aziridina, tiol, cloruro de sulfonilo, vinilsulfona, disulfuro, metanotiosulfonato, hidroxilo, fosforamidita, epoxi, aldehído, carbonato, glioxal, imidazolilo.

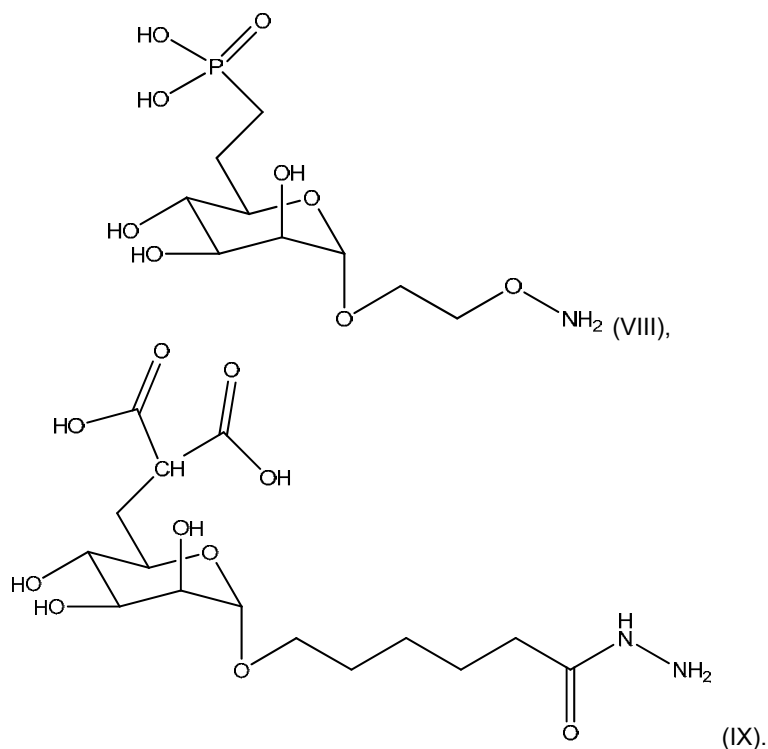
25 En una realización particular, dicho grupo reactivo químico Z es un grupo que reacciona con el carbonilo. Más particularmente, dicho grupo que reacciona con el carbonilo se selecciona del grupo que consiste en el hidrazida y O-alquilo hidroxilamina. La reacción entre dicho grupo hidrazida o O-alquilo hidroxilamina con un grupo carbonilo de Y forma respectivamente un enlace acilhidrazona o oxima. Este tipo de grupos químicos es generalmente útil para vincular las glucoproteínas: los grupos carbonilo (ya sea presentes naturalmente o inducidos por la oxidación de las funciones hidroxílicas de las cadenas glicosílicas de la glucoproteína) disponibles en los restos de oligosacáridos de la glucoproteína se ponen a reaccionar con los grupos que reaccionan con el carbonilo de los compuestos de acuerdo con la invención.

35 En una realización particular de la invención, los compuestos de fórmula (I) se seleccionan entre el grupo que consiste en:

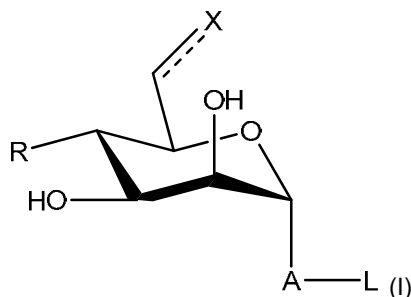


(II),





5 Otro objeto de la invención se refiere a un método para producir un conjugado de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método la etapa que consiste en hacer reaccionar un producto de interés Y seleccionado entre el grupo constituido por glucoproteínas, nanopartículas y marcadores para formación de imágenes médicas, con un compuesto que tiene la fórmula (I)



10 en el que dicho compuesto que tiene la fórmula (I) es como se define anteriormente.

Una vez que Y y el compuesto que tiene la fórmula (I) se hacen reaccionar juntos, se forma un conjugado de acuerdo con la invención, en el que dicho conjugado es un producto de interés Y conjugado con dicho compuesto de fórmula (I) a través de un enlazador L de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho enlazador L el resto del grupo reactivo químico que reaccionó con Y. El resto del producto químico reactivo Z es típicamente el resto T de acuerdo con la invención.

En una realización particular, dicho método para producir un conjugado de acuerdo con la invención comprende además, antes de dicha etapa de reacción, una etapa que consiste en activar una función química de Y, permitiendo dicha etapa de activación que el grupo químico reactivo Z del enlazador L reaccione con la función química de Y. Por ejemplo, la activación de una función química de una glucoproteína puede consistir en oxidar las funciones hidroxílicas de las cadenas glicosílicas para obtener funciones carbonilo (por ejemplo por tratamiento de la glucoproteína con NaIO_4).

La invención se refiere también a los conjugados obtenibles por el método para producir un conjugado de acuerdo con la invención y sus aplicaciones como se ha descrito anteriormente.

A lo largo de la descripción de la invención, y para simplificar la representación de las moléculas, los análogos de los grupos fosfato de M6P y los análogos de M6P están representados en su forma hidrogenada. Sin embargo, la invención se refiere también a las sales de estas moléculas.

Otros aspectos y ventajas de esta invención se describirán en las siguientes figuras y ejemplos, que deben

considerarse como ilustrativos.

Descripción de las figuras

- Figura 1:** Estructura molecular de los análogos de M6P.
Figura 2: Enlaces de hidrógeno potenciales de la M6P insertada en el bolsillo de unión del ligando del CI-M6PR.
Figura 3: Cinética de la degradación de la M6P y del fosfonato **1** en suero humano.
Figura 4: Unión específica de la M6P y el fosfonato **1** en una línea de células humanas normales.
Figura 5: Ninguno efecto citotóxico de la M6P y el fosfonato **1** en la línea celular de fibroblastos humanos normales IMR-90 (A) y dos líneas celulares de cáncer de mama (B).
Figura 6: Modelado molecular del malonato **3** con o sin un espaciador, insertado en el bolsillo de unión del CI-M6PR.
Figura 7: Mejora de la afinidad de unión del carboxilato **4** después del injerto de brazos espaciadores.
Figura 8: Ejemplos de brazos espaciadores injertados en el fosfonato **1** (AMFA-1, AMFA-2)
Figura 9: Síntesis de AMFA-1.
Figura 10: Síntesis de AMFA-2.
Figura 11: Síntesis de AMFA-3.
Figura 12: Síntesis de AMFA-5.
Figura 13: Síntesis de M6P-hexanohidrazida.
Figura 14: Análisis de las propiedades farmacológicas de AMFA-1. (A) CI_{50} ; (B) afinidad de unión al CI-M6PR y estabilidad en suero humano, (C) toxicidad en los fibroblastos humanos.
Figura 15: Análisis de las propiedades farmacológicas de los AMFA-1, AMFA-2, AMFA-3 AMFA-5 en comparación con M6P y M6P-hexanohidrazida: afinidad de unión al CI-M6PR a 20 °C (A) y en suero humano (B).
Figura 16: Efecto del injerto de AMFA-1 sobre las cadenas oligomanósidas de una enzima recombinante humana. (A) afinidad de unión; (B) actividad catalítica.
Figura 17: Purificación de iduronidasa (IDUA) (A), detección inmunohistoquímica de la absorción del neo-IDUA (B-E) y la detección en gel de poliacrilamida-SDS de neo-IDUA intracelular (F) en los fibroblastos de Scheie y Hurler.
Figura 18: Viabilidad de fibroblastos de Hurler tratados con diferentes dosis de Neo-IDUA.

Ejemplos

1.1. Síntesis y caracterización de análogos muy potentes de la M6P.

La síntesis y caracterización de análogos muy potentes de la M6P (M6Pa) se realizaron mediante la sustitución del grupo fosfato con un grupo fosfonato, malonato o carboxilato [Vidal et al., Bioorg Med Chem. 10, 4051, 2002; Jeanjean A et al., Bioorg Med Chem. 14, 2575, 2006; Jeanjean A et al., Bioorg Med Chem Lett. 18, 6240, 2008].

1.2. Ensayo de unión de análogos de M6P en el CI-M6PR.

Los ensayos de unión de los análogos de M6Pa se realizaron utilizando el CI-M6PR biotinilado. En resumen, el CI-M6PR, purificado en una columna de afinidad de Sefarosa-fosfomanosa, fue biotinilado con la biotina N-hidroxisuccinimida. La unión del CI-M6PR biotinilado (CI-M6PR_b) a la pentamano 6-fosfato (PMP) previamente adsorbida sobre una placa de microtitulación fue desplazada por concentraciones crecientes de M6Pa. El CI-M6PR_b unido fue entonces determinado usando el par de estreptavidina/peroxidasa y el sustrato OPD con las medidas de la densidad óptica. En experimentos de control, el método se estandarizó mediante la determinación de la concentración máxima de la PMP adsorbida en la placa de microtitulación y la concentración de CI-M6PR_b necesaria para saturar la PMP adsorbida [Jeanjean A y al, Bioorg Med Chem. 14: 3.575-82, 2006].

La Figura 1 muestra que el fosfonato **1** y el malonato **3**, dos análogos isostéricos de la M6P tienen una mayor afinidad de unión para el CI-M6PR que la de la M6P natural. Sin embargo, los análogos no isostéricos como fosfonato **2**, no son reconocidos por CI-M6PR. Por otro lado, el carboxilato **4** muestra una afinidad de unión para el CI-M6PR inferior a la del malonato **3**. Estos resultados demuestran que el fosfonato **1** y el malonato **3** presentan un potencial fuerte para apuntar las células que expresan el CI-M6PR.

1.3. Modelado de la inserción de los análogos de M6P en el bolsillo de unión del CI-M6PR.

La estructura cristalina de CI-M6PR en un complejo con el ligando natural correspondiente se ha obtenido a partir de los archivos de datos cristalográficos (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>, el código de identificación 1SZ0). Los inventores han construido los análogos de M6P sobre la base de la estructura de M6P pesada (heteroátomo M6P500) con el software del módulo de diseño de ligandos. La inserción del ligando se llevó a cabo primero por la superposición de la estructura del análogo de M6P sobre la estructura del agonista de M6P. Con el fin de equilibrar el complejo, el complejo ligando-receptor se sometió a continuación a la minimización de la energía usando gradientes conjugados para 2000 pasos a 300 °K y un potencial armónico se utilizó para las energías de unión hasta que la derivada máxima fue inferior a 0,07 kcal/Å. A continuación, la simulación dinámica molecular se realizó

utilizando el módulo Discover. Se aplicó el campo de fuerza constante y el algoritmo de gradiente conjugado junto con una distancia de corte de 25 Å. Una restricción de fijación se aplicó al esqueleto del receptor [Jeanjean A. et al. Curr Med Chem. 14: 2945- 53,2007].

La Figura 2 muestra que la M6P natural exhibe 11 posibles enlaces de hidrógeno y sólo seis diferentes puntos de anclaje, mientras que el análogo de fosfonato **1** muestra 12 posibles enlaces de hidrógeno con los residuos esenciales en el dominio de unión de ligando, y está anclado por 8 posiciones diferentes al CI-M6PR. Además, el malonato **3**, que se caracteriza por dos restos carboxilato en lugar de un resto fosfato forma 13 enlaces de hidrógeno potenciales y dispone de 8 puntos de anclaje (datos no mostrados).

Sin embargo, para el carboxilato **4** que exhibe una afinidad de unión inferior a la referencia M6P, la interacción directa entre el residuo Y324 y la manosa faltaba. Estudios anteriores [Hancock, MK. y al, J Biol Chem, 277, 11255-64, 2002] también han demostrado que sencillas sustituciones de aminoácidos están implicados en la estabilidad del ligando.

1.4. Caracterización biológica de análogos muy potentes de M6P

Las propiedades farmacológicas de un análogo muy potente, el fosfonato **1**, han sido comparadas con la M6P.

- En primer lugar, se analizó la estabilidad del fosfonato **1** en el 75 % (v/v) de suero humano. Los resultados muestran que el fosfonato **1** es 10 veces más estable en el suero que la M6P natural (Fig. 3).
- En segundo lugar, el efecto del fosfonato **1** sobre la endocitosis a través del CI-M6PR ha sido comparado con el de la M6P natural. Los resultados anteriores demostraron que un complejo de catepsina D/anticuerpo anti-catepsina D fue internalizado específicamente por el CI M6PR en fibroblastos humanos normales [Laurent-Matha V et al., J. Cell Sci. 111: 2539-49, 1998] El complejo fue aquí detectado por coloración por inmunofluorescencia.

La figura 4A muestra que el 80 % de las células de control han internalizado el complejo catepsina D/anticuerpo anti-catepsina D, mientras que las células pre-incubadas con 10 mM de M6P o fosfonato **1** han internalizado sólo el 30 % y 10 %, respectivamente. Este resultado demuestra que el fosfonato **1** tiene una mayor afinidad de unión que la de la M6P. La figura 4B muestra que la intensidad de la coloración de células es menor en la presencia de fosfonato **1** que en presencia de M6P. Todos estos resultados demuestran el alto potencial de fosfonato **1** para dirigirse al CI-M6PR. -En tercer lugar, se estudió la citotoxicidad del fosfonato **1** in vitro. Líneas de células normales o cancerosas fueron tratadas durante 4 días con dosis crecientes de fosfonato **1**. Los gráficos de barras indican que este compuesto no indujo ninguna citotoxicidad, incluso a alta concentración (0,1 mM) ni en los fibroblastos humanos normales (Figura 5A) ni en las líneas celulares de cáncer de mama, como MCF7 o MDA-MB-231 (Figura 5B).

1.5. Modelado molecular de un análogo de M6P, el malonato **3 en el bolsillo de unión del CI-M6PR, antes (Figura 6A) y después (6B) de acoplamiento con un enlazador (hexano hidrazida)**

Con el fin de eliminar o reducir el impedimento estérico cerca del bolsillo de unión del CI-M6PR debido al injerto de análogos de M6P en una macromolécula, se ha propuesto la adición de un enlazador espaciador. La Figura 6 muestra que un enlazador hexanoil hidrazida permite una separación suficiente entre los sitios de unión por la M6P del CI-M6PR y el producto que se debe unir al grupo hidrazida. Estudios de Modelado molecular muestran que se requiere un espaciador de 6 a 7 Å en el bolsillo de unión del CI-M6PR entre los análogos de M6P y la macromolécula que debe ser injertada. El brazo espaciador podría estar sustituido en diferentes posiciones por un átomo de nitrógeno u oxígeno, que podrían realizar enlaces de hidrógeno con ciertos residuos del bolsillo de unión del ligando tal como Y324, E323, K350, Q356. Este enlazador podría ser o bien una cadena alifática o ciclos como un fenilo sustituido o un triazol. Por lo tanto, de esta manera, la afinidad de unión para análogos de M6P para el CI-M6PR no será alterada por el injerto de una macromolécula tal como una enzima lisosomal.

1.6 Síntesis y caracterizaciones de los enlazadores

La Figura 7 muestra la mejora en la afinidad de unión de lo carboxilato **4** (A) para el CI-M6PR por un factor de 1,7 después del injerto a la posición aglicona de OPhNH₂ (B) y por un factor de 2 después de un injerto adicional de un clorambucil (C).

La Figura 8 describe la estructura del fosfonato **1** unido con diferentes enlazadores (hexanohidrazida AMFA-1), triazol (AMFA-2) y aminoxi (AMFA-3). Estos compuestos (AMFA, análogo de la M6P funcionalizado en el aglicona) son ejemplos de compuestos que tienen la fórmula (I) de acuerdo con la invención. La estructura del malonato **3** (AMFA-5) y M6P vinculado a un brazo hexanohidrazida también se da en la Figura 8.

1.7. Síntesis de AMFA-1, AMFA-2, AMFA-3, AMFA-5 y M6P-hexanohidrazida - figuras 9-13

1.7.1. Síntesis de AMFA-1 (Fig. 9)

2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D- manopiranosido de 5-etoxycarbonilpentilo **1:**

Al pentaacetato de manosa (10,00 g, 25,64 mmol) disuelto en 60 ml de CH_2Cl_2 , se añadió 6-hidroxihexanoato de etilo (8,3 ml, 51,28 mmol) a temperatura ambiente y después $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ a 0 °C. Después de 4 días en agitación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lavó dos veces con NaHCO_3 (2 x 20 ml) y después con solución saturada de salmuera (20 ml). La fase orgánica se secó (MgSO_4) y se concentró al vacío. El compuesto **1** (7,14 g, 57 %) se obtuvo después de cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/ AcOEt ; 6:4).

Fr = 0,58 [hexano/ AcOEt (6:4)]

EM, IEN + m/z: 513 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 529 [$\text{M} + \text{K}$]⁺

α-D-manopiranosido de 5-metoxycarbonilpentilo 2:

Al compuesto **1** (3,7 g, 7,55 mmol) disuelto en 35 ml de metanol anhidro, se añadió metilato de sodio (1,6 g, 30,20 mmol). Después de 30 min en agitación, se añadió resina de intercambio catiónico (Dowex® 50WX2, forma H⁺, 13 g). Después de 1 h se filtró la resina y se lavó con metanol. El filtrado se concentró a presión reducida produciendo **2** (2,1 g, 100 %).

Fr = 0,35 [AcOEt/MeOH (9:1)]

EM, IEN m/z: 331 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 347 [$\text{M} + \text{K}$]⁺

2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilil-α-D-manopiranosido de 5-metoxycarbonilpentilo 3:

Se añadieron sucesivamente Et_3N (8,85 ml, 63,40 mmol), después cloruro de trimetilsililo (7,1 ml, 54,48 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP, a 0 °C, al compuesto **2** (2,10 g, 6,81 mmol) disuelto en 30 ml de THF. La mezcla de reacción se agitó durante 30 h, después se evaporaron los disolventes y el producto en bruto se disolvió en 150 ml de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con salmuera (100 ml), se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó a presión reducida para dar lugar a **3** (1,62 g, 40 %).

Fr = 0,7 [$\text{EP}/\text{Et}_2\text{O}$ (9:1)]

EM, IEN m/z: 619 + [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 635 [$\text{M} + \text{K}$]⁺

2,3,4-tri-O-trimetilsilil-α-D-manopiranosido de 5-metoxycarbonilpentilo 4:

A **3** (2,45 g, 4,11 mmol) en 2 ml de metanol, se añadió una solución metanólica de K_2CO_3 (36 ml, 0,11 mM) a 0 °C. Después de agitar a 0 °C durante 30 min, la mezcla de reacción se diluyó con 170 ml de CH_2Cl_2 . La fase orgánica se lavó con 170 ml de salmuera. La fase acuosa se extrajo con 150 ml de CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas se combinaron, después se secaron con MgSO_4 , se filtraron, se concentraron al vacío y se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice (hexano/ Et_2O , 8:2 + Et_3N (1 %)) dando **4** (1,29 g, 60 %).

Fr = 0,37 [$\text{EP}/\text{Et}_2\text{O}$ (7:3)]

EM, IEN m/z: 547 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 563 [$\text{M} + \text{K}$]⁺

(E)-2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6-desoxi-dietoxifosfinilmetilen- α-D-manopiranosido de 5-metoxycarbonilpentilo 6:

A cloruro de oxalilo ($73 \cdot 10^{-3}$ ml, 0,84 mmol) diluido en 1 ml de THF, se añadió DMSO ($135 \cdot 10^{-3}$ ml, 1,9 mmol) a -78 °C. Después de 10 min, se añadió gota a gota **4** (0,400 g, 0,76 mmol) en 2 ml de THF a -78 °C. Después de 20 min, se añadió Et_3N ($533 \cdot 10^{-3}$ ml, 3,8 mmol). La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 10 min después se dejó a TA durante 30 min. Los disolventes se eliminaron por evaporación y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (20 ml).

La fase orgánica se lavó con salmuera (20 ml), se secó (MgSO_4), se filtró y se concentró al vacío. El aldehído en bruto **5** se utilizó para la siguiente etapa sin purificación adicional. A NaH (80 %, 0,045 g, 1,55 mmol) suspendido en 10 ml de THF, se añadió gota a gota metilendifosfonato de tetraetilo ($385 \cdot 10^{-3}$ ml, 1,55 mmol) a TA. Después de 1 h en agitación, se añadió una solución en THF (5 ml) del aldehído en bruto **5** a TA. Después de 1 h y 15 el THF se evaporó y el residuo se disolvió en CH_2Cl_2 (40 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 10 ml), se secó con MgSO_4 , se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (AcOEt/PE , 8:2) dando lugar a **6** (0,130 g, 30 %).

Fr = 0,72 [AcOEt/EP , (8:2)]

EM, IEN + m/z: 657 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 679 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺, 695 [$\text{M} + \text{K}$]⁺

(E)-6-desoxi-6-diidroxifosfinilmetilen-α-D-manopiranosido de 5-metoxycarbonilpentilo 7:

Al compuesto **6** (0,29 g, 0,44 mmol) disuelto en CH_3CN (3 ml), se añadieron piridina (89 ml 10^{-3} , 1,1 mmol) y después bromuro de trimetilsililo ($700 \cdot 10^{-3}$ ml, 4,4 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 6 h a TA y disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en MeOH y el exceso de sales de piridinio se retiró por filtración. El filtrado se trató con resina de intercambio catiónico (Dowex® 50WX2, forma H⁺, 0,5 g) y después se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice 100 de C₁₈-fase inversa (Fluka) (eluyente: agua y después metanol) dando lugar al compuesto **7** (0,10 g, 59 %).

Fr = 0,33 [AcOEt/MeOH , (6:4)]

EM, IEN + m/z: 385 [$\text{M} + \text{H}$]⁺, 407 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺

6-desoxi-6-diidroxifosfinilmetil-α-D-manopiranosido de 5-metoxycarbonilpentilo 8:

Se agitó **7** (0,048 g, 0,124 mmol) en 3 ml de metanol/H₂O (2:1) durante 18 h en una atmósfera de hidrógeno en presencia de Pd/C (10 %, 8 mg). La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se evaporó al vacío para dar lugar a **8** (0,046 g, 100 %).

Fr = 0,51 [AcOEt/MeOH, (9:1)]

EM, IEN + *m/z*: 387 [**M** + H]⁺, 409 [**M** + Na]⁺, 425 [**M** + K]⁺

Sal disódica de 5-hidrazinocarbonilpentil-6-desoxi-6-diidroxifosfinilmetil- α -D-manopiranosido **9** o AMFA-1

A **8** (0,045 g, 0,12 mmol) en 2 ml de MeOH, se añadió hidrazina monohidrata (28 10^{-3} ml, 0,58 mmol). Después de 18 h, los disolventes se evaporaron y la hidrazina residual se co-evaporó 4 veces con etanol. El producto en bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice 100 C₁₈-fase inversa (Fluka) (eluyente: H₂O) y después se trató por la resina de intercambio catiónico (Dowex® 50WX2, forma Na⁺, 0,200 g). La resina se filtró y **9** se obtuvo después de la liofilización (0,035 g, 68 %).

Fr = 0,44 [MeOH]

$[\alpha]_D^{20}$ = + 69,12° (c 1/D₂O)

EM, IEN- *m/z*: 385 [**M** - 2Na⁺ + H]⁺

1.7.2. Síntesis de AMFA-2 (Fig. 10)

2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilil- α -D-manopiranosido de propargilo **10**

Se preparó **10** de acuerdo con el mismo procedimiento que para **3**.

Fr = 0,95 [EP/Et₂O (7:3)]

Rendimiento = 95 %

EM, IEN⁺ *m/z*: 529 [**M**+Na]⁺

2,3,4-tri-O-trimetilsilil- α -D-manopiranosido de propargilo **11**:

El compuesto **11** se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento que para **4**.

Fr = 0,37 [EP/Et₂O (9:1)]

Rendimiento = 57 %

EM, IEN⁺ *m/z*: 457 [**M**+Na]⁺

(E)-2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6,7-didesoxi-7-dibenziloxifosfinil- α -D-mano-hept-6-enopiranosido de propargilo **13**

El fosfonato **13** se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento que para **7** a través de la preparación del aldehído **12** preparado siguiendo el mismo procedimiento que para **6**. Para obtener el fosfonato de dibencilo **13**, el tetrabencilmetilendifosfonato se utilizó en lugar del tetraetilmetilendifosfonato.

Fr = 0,83 [Et₂O/EP (8:2)]

Rendimiento = 63 %

EM, IEN⁺ *m/z*: 691 [**M**+H]⁺, 713 [**M**+Na]⁺

(E) 2,3,4-Tri-O-trimetilsilil-6,7-didesoxi-7-dibenciloxifosfinil- α -D-mano-hept-6-enopiranosido de (metoxycarboniletil)-1H-1,2,3-triazol-4-il-metilo **14**:

Al fosfonato **13** (250 mg, 0,362 mmol) y 3-azidopropionato de metilo (37 μ l, 0,435 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml), se añadieron sucesivamente Cu(CH₃CN)₄PF₆ (135 mg, 0,362 mmol) y 2,6-lutidina (5 μ l 0,0362 mmol). La mezcla se agitó durante 20 h a temperatura ambiente. Después de la evaporación del disolvente, el producto en bruto se purificó directamente por cromatografía en columna de gel de sílice (eluyente: CH₂Cl₂ después CH₂Cl₂/MeOH, 99:1 y 98:2) para dar **14** (236 mg, 80 %).

Fr = 0,65 [CH₂Cl₂/MeOH, (98:2)]

EM, IEN⁺ *m/z*: 820 [**M**+H]⁺

6-Desoxi-6-diidroxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosido de (metoxycarboniletil)-1H-1,2,3-triazol-4-il-metilo **15**

Una mezcla de fosfonato **14** (130 mg, 0,159 mmol) y 20 mg de Pd/C (10 %) en 6 ml de EtOH/H₂O (5:1) se agitó en una atmósfera de hidrógeno (20 bares). Después de 16 h, se eliminó el catalizador por filtración a través de una almohadilla de Celite y el filtrado se concentró a presión reducida para dar **15**.

Fr = 0,17 [AcOEt/MeOH, (7:3)]

EM, IEN⁻ *m/z*: 424 [**M**-H]⁻

Sal disódica de 6-Desoxi-6-diidroxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosido (hidrazinocarboniletil)-1H-1,2,3-triazol-4-il-metil **16** o AMFA-2

AMFA-2 se preparó siguiendo el procedimiento aplicado a AMFA-1.

Fr = 0,23 [MeOH/AcOEt, (7:3)]

Rendimiento = 30 %

EM, IEN⁻ *m/z*:424 [M- 2Na + H]⁻

5 1.7.3. Síntesis de AMFA-3 (Fig. 11)

2,3,4,6-tetra-O-trimetilsilil- α -D-manopiranosido de 2-bromoetilo 17

Se preparó **17** de acuerdo con el mismo procedimiento que para **3**.

10 *Fr* = 0,88 [EP/Et₂O (9:1)]

Rendimiento = 87 %

EM, IEN⁻ *m/z*:597 [M+Na]⁺

15 2,3,4-tri-O-trimetilsilil- α -D-manopiranosido de 2-bromoetilo 18

El compuesto **18** se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento que para **4**.

Fr = 0,46 [EP/Et₂O (6:4)]

Rendimiento = 48 %

20 **EM**, IEN⁻ *m/z*:525 [M+Na]⁺

20 (E)-2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6,7-didesoxi-7-dietiloxifosfinil- α -D-mano-hept-6-enopiranosido de 2-bromoetilo 20

El fosfonato **20** se preparó de acuerdo con el mismo procedimiento que para **7** a través de la preparación del aldehído **19** preparado siguiendo el mismo procedimiento que para el **6**.

25 *Fr* = 0,53 [Et₂O]

Rendimiento = 60 %

EM, IEN⁻ *m/z*:635 [M+H]⁺

30 (E)-2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6,7-didesoxi-7-dietiloxifosfinil- α -D-mano-hept-6-enopiranosido de 2-(ftalimidoxi)etilo 21

Se añadió N-hidroxiftalimida (468 mg, 2,9 mmol) a NaH (109 mg, 3,3 mmol) en 50 ml de DMF anhidro. Después de 1 h en agitación, el fosfonato **20** (1,21 g, 1,9 mmol) disuelto en 10 de DMF se añadió gota a gota en a la solución. La solución roja se agitó 26 h a 40 °C y después se inactivó con Et₂O (300 ml). La fase orgánica se lavó con salmuera (150 ml), después se secó (MgSO₄), se concentró a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Et₂O/EP 8/2, 9/1 y después Et₂O), dando **21** (835 mg, 61 %).

35 *Fr* = 0,55 [AcOEt/MeOH, (8:2)]

Rendimiento = 61 %

EM, IEN⁻ *m/z*:718 [M+H]⁺, 740 [M+Na]⁺

40 (E)-6,7-didesoxi-7-dietiloxifosfinil- α -D-mano-hept-6-enopiranosido de 2-(ftalimidoxi)etilo 22

Se preparó **22** de acuerdo con el mismo procedimiento que para **7**.

Fr = 0,63 [AcOEt/MeOH, (5:5)]

Rendimiento = 45 %

45 **EM**, IEN⁻ *m/z*:444 [M-H]⁻

(E)-6-desoxi-6-diidroxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosido de 2-(ftalimidoxi)etilo 23

La reducción del doble enlace de **22** se realizó en las mismas condiciones como para **8**.

50 *Fr* = 0,61 [AcOEt/MeOH, (5:5)]

Rendimiento = 98 %

EM, IEN⁻ *m/z*:446 [M-H]⁻

55 Sal disódica de 2-(aminoxi)etil-6-desoxi-6-diidroxifosfinilmetilen- α -D-manopiranosido 24 o AMFA-3

A **23** (0,065 g, 0,145 mmol) en 5 ml de MeOH/H₂O (1:1) se añadió hidrazina monohidrata (21,2 10⁻³ ml, 0,436 mmol). Después de 3 h se evaporaron los disolventes. El producto en bruto se purificó por cromatografía de gel de sílice 100 C₁₈-fase inversa (Fluka) (eluyente:H₂O) y después se trató por la resina de intercambio catiónico (Dowex® 50WX2, forma Na⁺, 0,200 g). La resina se filtró y **24** se obtuvo después de la liofilización (0,035 g, 40 %).

60 *Fr* = 0,42 [MeOH]

Rendimiento = 40 %

EM, IEN⁻ *m/z*:316 [M- 2Na + H]⁻

65 1.7.4. Síntesis de AMFA-5 (Fig. 12)

Uronato de [5-metoxycarbonilpencil 6,7-didesoxi-7-(benziloxycarbonil)- α -D-mano-octopiranosido]bencilo 37

Se añadió gota a gota anhídrido trifluorometansulfónico ($106 \cdot 10^{-3}$ ml, 0,697 mmol) a -40°C a **4** (300 mg, 0,57 mmol) y 2,6-di-*terc*-butil-4-metilpiridina (153 mg, 0,744 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 (3 ml). La mezcla se agitó durante 30 min y después se diluyó con CH_2Cl_2 y el estrato orgánico se lavó con agua, se secó con MgSO_4 y se concentró al vacío. El exceso de 2,6-di-*terc*-butil-4-metilpiridina se eliminó por precipitación en hexano. El triflato bruto **35** se utilizó durante la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una solución del triflato **35** (328 mg, 0,50 mmol) en THF (3 ml) se añadió a TA la sal sódica del malonato dibencílico (0,720 mmol) diluida en THF (15 ml). Después de la terminación de la reacción, la mezcla que contenía **36** se trató con HCl 1 N para desililar el malonato **36**. Después de 10 min, la mezcla se neutralizó con NaHCO_3 ac. La fase acuosa se extrajo dos veces con CH_2Cl_2 . La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (CH_2Cl_2 , y después $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 9:1) dando lugar a **37** (0,075 g, 23 %).

$\text{Fr} = 0,52$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, (9:1)]

EM, $\text{IEN}^+ m/z$:597 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

Acido [5-metoxicarbonilpentil-6,7-didesoxi-7-(carboxi)- α -D-*mano*-octopiranosido]urónico **38**

La desbencilación de **37** se realizó de acuerdo con el mismo procedimiento que para la preparación del fosfonato **15**.

$\text{Fr} = 0,34$ [AcOEt/MeOH , (8:2)]

Rendimiento = 93 %

EM, $\text{IEN}^+ m/z$:395 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

EM, $\text{IEN}^+ m/z$:393 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$

Sal disódica de [5-metoxicarbonilpentil-6,7-didesoxi-7-(carboxi)- α -D-*mano*-octopiranosido]uronato **39** o **AMFA-5**

Partiendo de **38**, el malonato **39** se preparó siguiendo el procedimiento aplicado a AMFA-1.

$\text{Fr} = 0,55$ [MeOH]

Rendimiento = 56 %

EM, $\text{IEN}^- m/z$:393 [$\text{M}-2\text{Na} + \text{H}$] $^-$

1.7.5. Síntesis de M6P-hexanohidrazida (i.e. compuesto **34**) (Fig. 13)

2,3,4-tri-O-trimetilsilil-6-difenoxifosfinil- α -D-manopiranosido de 5-metoxicarbonilpentilo **32**

Se añadieron difenilclorofosfato ($143 \cdot 10^{-3}$ ml, 0,69 mmol), Et_3N ($112 \cdot 10^{-3}$ ml, 0,8 mmol) y una cantidad catalítica de DMAP a **4** (300 mg, 0,57 mmol) disuelto en CH_2Cl_2 (5 ml). La mezcla se agitó durante 5 h, después se evaporaron los disolventes, el producto en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice ($\text{PE}/\text{Et}_2\text{O}$, 6:4 a continuación, 5:5) dando lugar a **6** (0,42 g, 95 %).

$\text{Fr} = 0,63$ [$\text{Hexano}/\text{AcOEt}$, (5:5)]

EM, $\text{IEN}^+ m/z$: 779 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$

6-Fosfato- α -D-manopiranosido de 5-metoxicarbonilpentilo **33**

Se añadió PtO_2 (70 mg) a **32** (0,410 g, 0,54 mmol) disuelto en etanol (15 ml) y la mezcla de reacción se agitó durante 6 h a TA en una atmósfera de H_2 . La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite y se evaporó al vacío para dar lugar a **33** (0,207 g, 97 %).

$\text{Fr} = 0,12$ [AcOEt/MeOH (8:2)]

EM, $\text{IEN}^- m/z$: 387 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$, 775 [$2\text{M}-\text{H}$] $^-$

Sal disódica de 5-hidrazinocarbonilpentil-6-fosfato- α -D-manopiranosido **34**

Partiendo de **33**, el fosfato **34** se preparó siguiendo el procedimiento aplicado a AMFA-1.

$\text{Fr} = 0,28$ [$\text{Isopropanol}/\text{NH}_4\text{OH}$, (5:5)]

Rendimiento = 25 %

EM, $\text{IEN}^- m/z$:387 [$\text{M}-2\text{Na} + \text{H}$] $^-$

1.8. Análisis de las propiedades farmacológicas de AMFA-1.

Como se muestra en la Figura 14, la afinidad de unión, la estabilidad en 75 % (v/v) de suero humano y la ausencia de toxicidad en los fibroblastos humanos de AMFA-1 fueron idénticos a las del fosfonato **1** solo. Del mismo modo, AMFA-1 no mostró ninguna toxicidad en líneas celulares de cáncer de mama humano MCF7 y MDA (datos no mostrados). Esto indica que la adición del enlazador hexanohidrazida en la posición anomérica no altera las propiedades farmacológicas del análogo de la M6P.

1.9. Análisis de las propiedades farmacológicas de los AMFA-1, AMFA-2, AMFA-3, AMFA-5, M6P y M6P-hexanohidrazida

La afinidad de unión del AMFA-1, AMFA-2, AMFA-3 y AMFA-5 al CI M6PR se determinó a 20 °C (A) o en presencia de 75 % de suero humano a 37 °C (B) y se comparó con la del M6P y M6P-hexanohidrazida. Los métodos son los mismos que EN la sección 1.8. AMFA-1, AMFA-2, AMFA-3 y AMFA-5 muestran un alto potencial para dirigirse a CI-M6PR porque se unen al CI-M6PR con una alta afinidad de unión y son estables bajo la incubación con el suero (Fig. 15). M6P-hexanohidrazida y M6P mostraron una afinidad estable en una solución tampón, pero se hidrolizaron en el suero humano con una afinidad disminuida de ~50 % después de 7-8 horas y de 84 % y 100 % después de 16 h, respectivamente. AMFA-1, AMFA-2, AMFA-3 y AMFA-5 parecen conservar una capacidad de unión superior a 85 % después de 16 horas de incubación en suero humano. Esto indica que una mayor estabilidad en el suero y una afinidad mayor para el CI-M6PR se obtienen con sólo ciertos análogos de M6P.

1.10. Síntesis de cathD-AMAF-1 (un conjugado de la invención)

Un ejemplo de acoplamiento con AMFA-1 se realizó sobre una enzima lisosomal humana, la catepsina D. Un mutante de la catepsina D-KDEL se obtuvo mediante la adición de una extensión KDEL en el C-terminal (para la retención en el retículo endoplásmico) por mutagénesis de ADNc dirigido, y fue purificado a continuación después de la expresión estable en células de cáncer de rata [Liaudet E. y al, Oncogene 9: 1145 hasta 1154, 1994]. De hecho, la señal KDEL impide parcialmente la adición de la señal M6P en el aparato de Golgi. Esta proteína fue utilizada como modelo porque sus cadenas oligomanósídicas son similares a las producidas por el sistema Baculovirus/célula de insecto [Liaudet E. y al, Oncogene 9: 1145-1154, 1994].

Para realizar el acoplamiento entre el AMFA y las enzimas lisosomales, hemos desarrollado un protocolo experimental:

- En primer lugar, el análogo fosfonato **1** está funcionalizado en posición anómerica mediante un brazo espaciador hexanohidrazida que contiene un grupo hidrazida para obtener el AMFA-1.
- En segundo lugar, para efectuar el injerto, 0,5 mg / ml de la enzima recombinante humana (aquí cathD-KDEL) y una solución 10 mM de meta-peryodato de sodio (NaIO₄) se ponen a reaccionar en un tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5 durante 30 min a 4 °C en la oscuridad. El glicerol (concentración final 15 mM) se añade durante 5 min a 0 °C para detener la reacción y la muestra es dializada durante la noche frente a un tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,5.
- En tercer lugar, se añade AMFA-1 y se dejó reaccionar con agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se dializan durante la noche contra un tampón PBS. Este protocolo se puede adaptar fácilmente para injertar enzimas humanas recombinantes que provienen de Baculovirus con un muy potente AMFA. Dado que el número de cadenas glicosiladas en diversas enzimas lisosomales es diferente, las proporciones relativas de proteína/AMFA y las condiciones de reacción (tiempo, t°, pH) deberían optimizarse para que cada enzima alcance una alta afinidad por el CI- M6PR y una alta actividad de las neoglucoenzimas.

Este tipo de reacción causa la oxidación del resto oligomanosídico y permite obtener las funciones aldehído que reaccionan con la función hidrazida de AMFA -1 covalentemente para formar funciones acilhidrazona convencionales/ clásicas. Las hidrazidas reaccionan selectivamente con el aldehído para formar el acilhidrazona por condiciones de conjugación sin desperdicio, ya que ningún producto secundario o reactivos potencialmente tóxicos están involucrados. Del mismo modo, los grupos aminoxi (ver AMFA-3) reaccionan con aldehídos para formar funciones oximas. Además, sólo el resto oligomannosídico se remodela y el resto péptido de la enzima no se ve afectado por las condiciones usadas para el injerto de AMFA.

Aquí, las enzimas se injertan por los AMFA a través de enlaces de tipo acilhidrazona u oxima.

1.11. Ensayo de unión y de la actividad catalítica de cathD-AMFA-1.

Los ensayos de unión de la cathD-AMFA-1 se realizaron utilizando el CI-M6PR biotinilado con el mismo protocolo utilizado para el ensayo de unión de AMFA-1, tal como se describe en la sección 1.2.

La afinidad por el CI-M6PR de la catepsina D-KDEL modificada con AMFA-1 (K_d = 3 nM) es 10 veces mayor que la de la catepsina D -KDEL nativa (K_d = 30 nM) (Fig. **16A**). Dato interesante, su afinidad es cinco veces mayor que la de la catepsina D natural (K_d = 15 nM), que es un ligando de alta afinidad por el CI-M6PR, debido a la presencia de cadenas bisfosforiladas capaces de ocupar los dos sitios de unión del M6P del receptor. Estos datos indican que la afinidad de las cadenas conjugadas con AMFA-1 es muy cercana a la de las cadenas bisfosforiladas (K_d = 2 nM), que son las cadenas naturales que muestran la mayor afinidad por el CI-M6PR [Tong PY et al., J Biol Chem. 264, 7962-9, 1989].

Al mismo tiempo, las actividades catalíticas de la catepsina D natural, la catepsina D- KDEL y la catepsina D-KDEL injertada por AMFA-1 se midieron utilizando el sustrato con fluorescencia bloqueada Edans-Arg-Pro-Ile-Leu-Phe Phe-Arg-Leu-Gln-Dabcilo sintetizado por el UMR 5247 (Fig. **16B**). Después de la escisión proteolítica del esqueleto del péptido, el Edans liberado reanuda sus propiedades fluorescentes bajo una excitación luminosa (EXC 355 nm;

Em 538 nm). La actividad de la catepsina D-KDEL se mantuvo por completo después del acoplamiento de AMFA-1, lo que indica que la reacción de remodelación de los carbohidratos no afecta a la estructura de su sitio catalítico. Hemos definido por lo tanto un protocolo reproducible para la obtención de neoglucoenzimas con alta afinidad por el CI-M6PR y una actividad catalítica mantenida.

1.12 Direccionamiento in vivo de la iduronidasa AMFA-1 en fibroblastos de pacientes con la enfermedad lisosomal de Scheie o Hurler y su actividad sobre la secreción de glicosaminoglicanos.

La enzima elegida para este estudio es el α -L-iduronidasa (IDUA) [CE 3.2.1.76] que participa en la mucopolisacaridosis de tipo I (MPS I), un trastorno del almacenamiento de mucopolisacáridos (Neufeld, EF y Muenzer, J. 1995 *In The metabolic basis of inherited disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle y, D., eds, 7ª ed Nueva York: McGraw-Hill, pp 2465-2494). La reducción o ausencia de actividad de IDUA conduce a la acumulación del sustrato de la enzima, los glicosaminoglicanos (GAG), en diferentes tejidos. MPSI es un trastorno multiorgánico y puede afectar la apariencia, el desarrollo mental, y la movilidad y sus manifestaciones clínicas varían de la forma más leve, es decir, de Scheie, a la forma más severa, de Hurler, (Kakkis, N Engl J Med 2001, 344, 3: 182-188). La prevalencia en Europa es de aproximadamente 0,025 para 10.000 personas.

IDUA es una proteína de 653 AA, glicosilada con seis oligosacáridos N-enlazados para producir una molécula precursora de 74 kDa, y que es procesada en una forma madura.

La producción y purificación de la enzima IDUA se llevaron a cabo a partir del sistema de expresión Baculovirus/células de lepidópteros. En resumen, una secuencia FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) se introdujo en el extremo N-terminal del ADNc de IDUA y estas secuencias se insertaron en el vector de transferencia específica del baculovirus, cadena abajo del P10 muy tardío. Los virus recombinantes se generan mediante la cotransfección de células Sf9 con ADN viral purificado y el vector de transferencia que lleva el ADNc de la enzima. Partiendo de entonces, los baculovirus se clonan por el método de las placas. Diez clones virales aislados se amplifican y la expresión de la proteína se controla mediante ELISA y Western Blotting usando un anticuerpo anti-FLAG. Después de la selección de un clon para la producción de la enzima, las células Sf9 se infectaron con el virus recombinante seleccionado con una multiplicidad de infección de 2 PFU (unidad formadora de placa)/célula. Después de cuatro días de incubación a 28 °C, se recogieron los sobrenadantes, se sometieron a diafiltración y se cargaron en una columna de afinidad Concanavalina A (ConA Sepharose, GE Healthcare). Las proteínas se eluyen con α -metil manosa. Posteriormente, el IDUA recombinante se purificó (i) mediante cromatografía de afinidad de níquel His-selectiva (Sigma) y se eluyó con tampón de elución His-selectivo (Sigma, imidazol 250 mM). Una vez eluido, la enzima fue dializada con un tampón NaCl 100 mM, acetato 100 mM de pH 5,8.

La neo IDUA se analizó mediante geles de SDS poli(acrilamida) y su pureza se determinó mediante tinción con plata (Figura 17 A). La identificación de la enzima se obtuvo por transferencia de Western utilizando anticuerpos monoclonales específicos anti-IDUA (R & D Systems).

Después de acoplarse con AMFA-1 como se describe en la sección 1.10, la internalización celular de la neoIDUA, la toxicidad y la reducción del sustrato se evaluaron en los fibroblastos MPSI.

Como se observa bajo un microscopio óptico, la neoIDUA 100 ng/ml ya estaba internalizada por los fibroblastos MPSI de paciente Scheie después de 3 horas de incubación (Fig. 17B-E). La absorción de la neoIDUA por las células se redujo en gran medida por pre-incubación con el M6P 10 mM (Fig. 17D), y completamente impedida por el AMFA-1 10 mM (Fig. 17E). Estos datos demuestran que la absorción de neoIDUA implica el CI-M6PR. Además, la internalización de la neoIDUA también ha sido demostrada mediante transferencia de Western en extractos de células después de 24 h de incubación (Fig. 17F). La inmunodetección de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control interno de la cantidad total de proteínas depositadas.

Mediante la medición con el kit Blyscan (Tebu-Bio) de los niveles de sustrato enzimático (GAG) secretado en el medio de cultivo de fibroblastos de pacientes de Hurler, se observó que la neoIDUA redujo significativamente la secreción de GAG hasta un 50 % de 24 a 72 h (Tabla 1). Esto demuestra que la neoIDUA todavía estaba activa a las 72 horas en las células.

Tabla 1: las concentraciones en GAG secretados en el medio de cultivo de fibroblastos de pacientes de Hurler (μ g/ml).

Tiempo de tratamiento	fibroblastos de paciente de Hurler (control)	fibroblastos de paciente de Hurler + IDUA-AMFA-1
24 h	0,018	0,009
48 h	0,022	0,016
72 h	0,032	0,018

Como se muestra en la figura 18, los tratamientos de fibroblastos de Hurler por neoIDUA 100 a 500 ng/ml no fueron tóxicos y potenciaron ligeramente la viabilidad celular a 72 h. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT [Maynadier et al. FASEB J, 22: 671-81, 2008].

1.13. La eficacia terapéutica de IDUA-AMFA-1 (MPSI) en el modelo de ratón de la mucopolisacaridosis I.

Ratones IDUA homocigotos +/- (6-8 semanas de edad) fueron tratados por vía intravenosa con vehículo solo (control) o con neolDUA 0,16 mg/kg de peso corporal / semana durante 6 semanas. Los GAG secretados en la orina se analizaron después de 6 inyecciones y se normalizaron con respecto a la concentración de creatinina de la orina utilizando los métodos descritos anteriormente [Barbosa et al., *Glycobiology Adv. Access* 13: 647-53, 2003].

Las concentraciones de GAG secretados se redujeron significativamente en la orina en 59,8 % por este tratamiento (véase la **Tabla 2**). Esto indica la eficacia de IDUA-AMFA-1 para el tratamiento de la MPS-I. Estos datos indican la eficacia terapéutica de la enzima IDUA-AMFA-1 obtenida por producción en el sistema de expresión de baculovirus y el subsiguiente injerto AMFA para dirigirse al CI-M6PR.

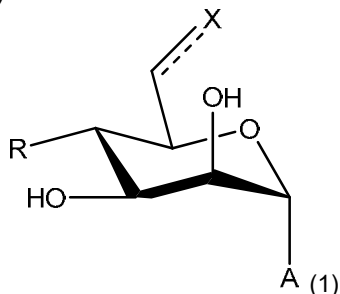
Tabla 2: Relaciones entre las concentraciones de GAG secretados / concentraciones de creatinina en orina de ratones homocigotos MPS-I (% de control).

Tiempo de tratamiento	Ratones MPS-I Control (5 ratones)	Ratones MPS-I + IDUA-AMFA-1 (0,16 mg/kg peso corporal) (6 ratones)
6 semanas	100 ± 18,5	59,8 ± 9,0*
Media ±DT; *p< 0,0005 (prueba de Student)		

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, en el que dicho conjugado es

- 5 - un producto de interés Y seleccionado entre el grupo que consiste en glucoproteínas, nanopartículas y marcadores para la formación de imágenes médicas, conjugado a través de un enlazador L con
 - un compuesto que tiene la fórmula (1)



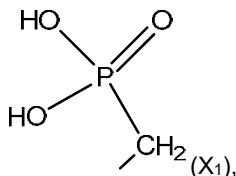
en la que

- 10 - la línea punteada representa un enlace que está presente o no,
 - X representa un análogo de un grupo fosfato,
 - R se selecciona del grupo que consiste en H y OH,
 - A se selecciona del grupo que consiste en O, S y CH₂,

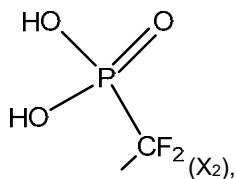
15 y en el que

- 20 - dicho compuesto que tiene la fórmula (1) está unido al enlazador a través del resto A,
 - dicho enlazador L separa A e Y por una cadena de 4 a 15 átomos consecutivos cuando dicho enlace representado por la línea punteada está ausente, X se selecciona del grupo que consiste en:

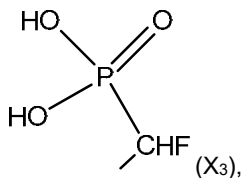
o un grupo fosfonato saturado que tiene la fórmula



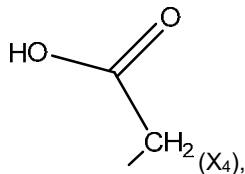
25 o un grupo bis fluoro fosfonato que tiene la fórmula



o un grupo fluoro fosfonato que tiene la fórmula

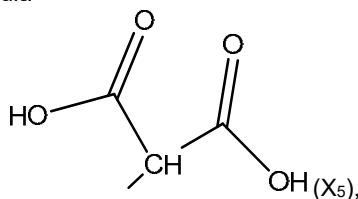


30 o un grupo carboxilato saturado que tiene la fórmula



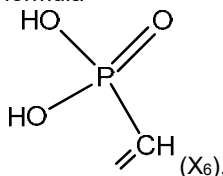
y

o un grupo malonato que tiene la fórmula

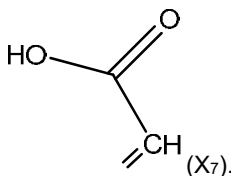


- cuando dicho enlace representado por la línea punteada está presente, X se selecciona del grupo que consiste en:

o un grupo fosfonato insaturado que tiene la fórmula



y
o un grupo carboxilato insaturado que tiene la fórmula



2. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho conjugado tiene un Cl_{50} para el receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CI-M6PR) de como máximo 100 μ M.

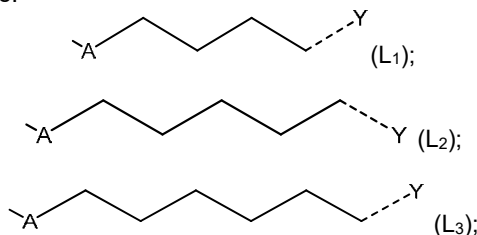
3. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que Y está conjugado a través de un enlazador L con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 1000 o más compuestos de fórmula (1).

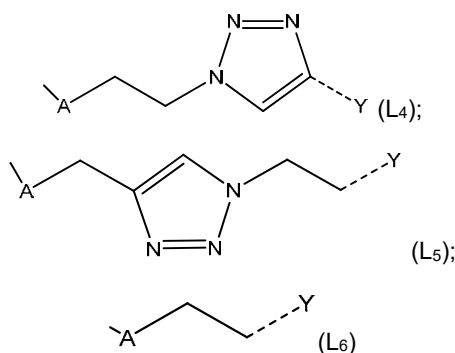
4. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho conjugado es un producto de interés Y conjugado a través de un enlazador L con al menos dos compuestos que tienen la fórmula (1), en los que dos análogos de la manosa 6-fosfato de dichos al menos dos compuestos son reconocibles por los dos sitios de unión de la manosa 6-fosfato de un mismo CI-M6PR, o por los dos sitios de unión de la manosa 6-fosfato de un dímero de CI-M6PR.

5. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho conjugado tiene un Cl_{50} para el receptor de manosa 6-fosfato independiente de cationes de como máximo 100 nM, particularmente de como máximo 50 nM, más particularmente de como máximo 25 nM, más particularmente no más de como máximo 2 nM.

6. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha cadena de átomos de dicho enlazador L es una cadena de alquilo o alqueno C_1-C_{30} , sustituida o no, lineal o ramificada, en la que uno o más átomos de carbono de dicha cadena están opcionalmente reemplazados por un grupo químico seleccionado del grupo que consiste en éter (-O-), amina (-NH-), tioéter (-S-), amida (-CO-NH-), urea (-NH-CO-NH-), carbamato (-NH-CO-O-), y sistemas cíclicos o heterocíclicos, siendo dichos sistemas cíclicos o heterocíclicos saturados o no, y sustituidos o no sustituidos, con la condición de que dicha cadena separe los restos A e Y en de 4 a 15 átomos consecutivos.

7. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho enlazador L se selecciona del grupo que comprende:





y

5

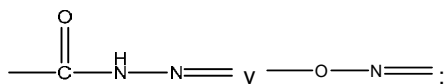
en el que

"-----Y" representa:

10

(a) -Y, o

(b) -T-Y, en el que T es una parte del enlazador y representa un resto químico seleccionado del grupo que consiste en



15

y

"A-" representa el resto del compuesto de acuerdo con la invención tal como se define en la fórmula (1).

20

8. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que Y es una enzima lisosomal.

9. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.

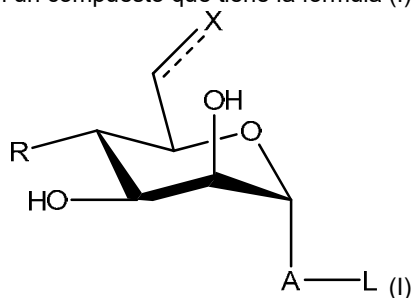
25

10. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un método para tratar un trastorno de almacenamiento lisosomal en el cuerpo humano o animal.

11. El conjugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.

30

12. Un método de producción de un conjugado, comprendiendo dicho método la etapa de hacer reaccionar un producto de interés Y seleccionado entre el grupo que consiste en glucoproteínas, nanopartículas y marcadores para la formación de imágenes médicas, con un compuesto que tiene la fórmula (I)



35

en la que

- la línea punteada representa un enlace que está presente o no,

- X representa un análogo de un grupo fosfato,

- R se selecciona del grupo que consiste en H y OH,

40

- A se selecciona del grupo que consiste en O, S y CH₂,

- L representa un enlazador que comprende un grupo reactivo químico terminal Z capaz de reaccionar con el producto de interés Y para formar dicho conjugado, en el que los restos A e Y están separados por de 4 a 15 átomos consecutivos,

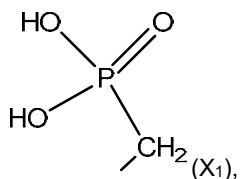
45

y en la que:

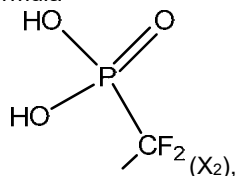
- cuando dicho enlace representado por la línea punteada está ausente, X se selecciona del grupo que consiste

en:

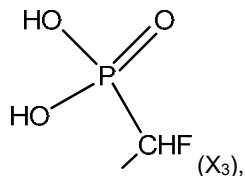
o un grupo fosfonato saturado que tiene la fórmula



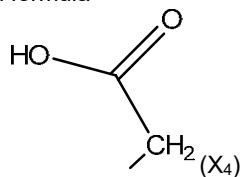
o un grupo bisfluorofosfonato que tiene la fórmula



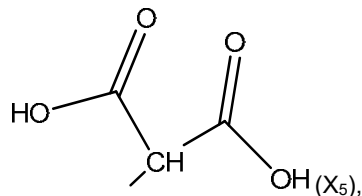
o un grupo fluorofosfonato que tiene la fórmula



o un grupo carboxilato saturado que tiene la fórmula

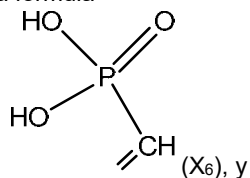


y
o un grupo malonato que tiene la fórmula

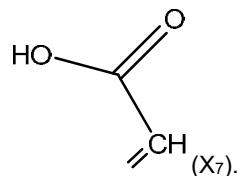


- cuando dicho enlace representado por la línea punteada está presente, X se selecciona del grupo que consiste en:

o un grupo fosfonato insaturado que tiene la fórmula



o un grupo carboxilato insaturado que tiene la fórmula



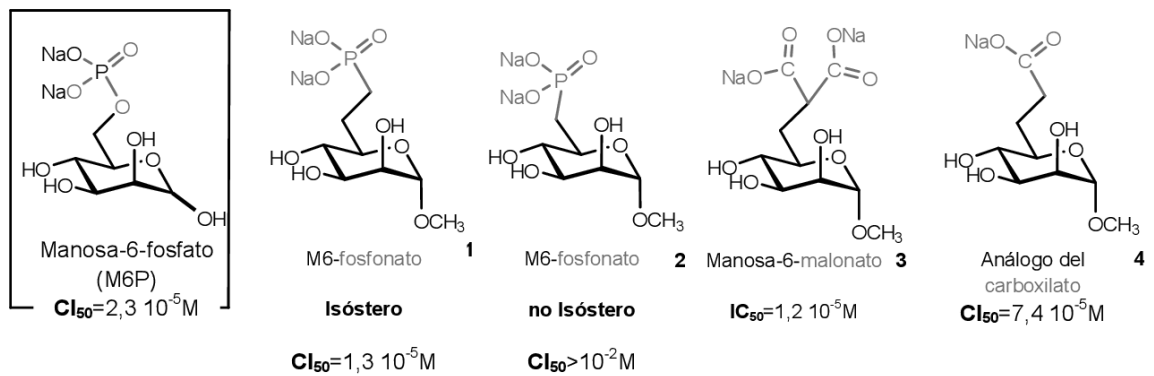


FIG.1

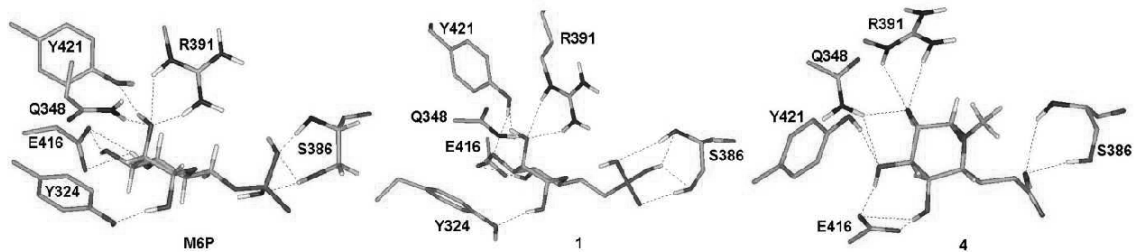


FIG.2

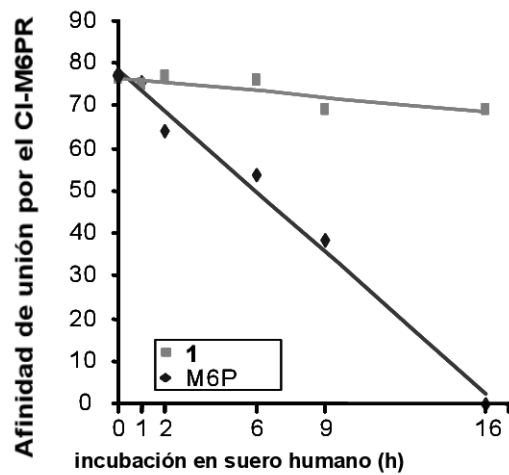


FIG.3

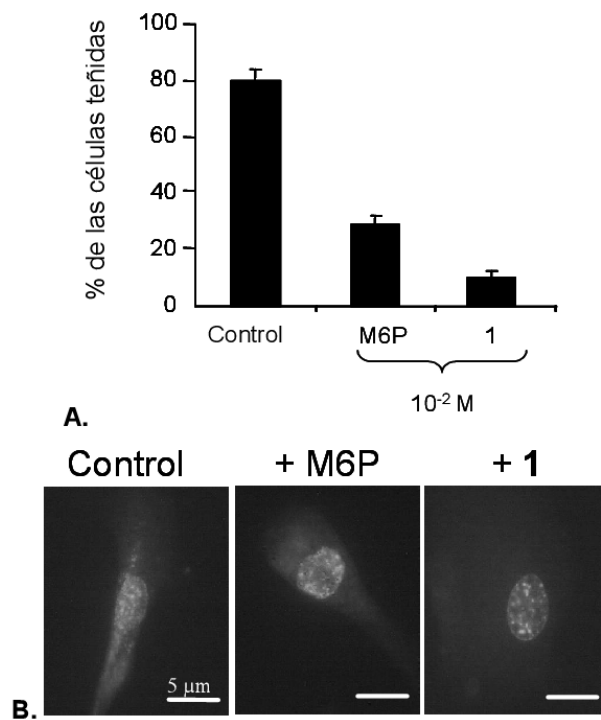


FIG.4

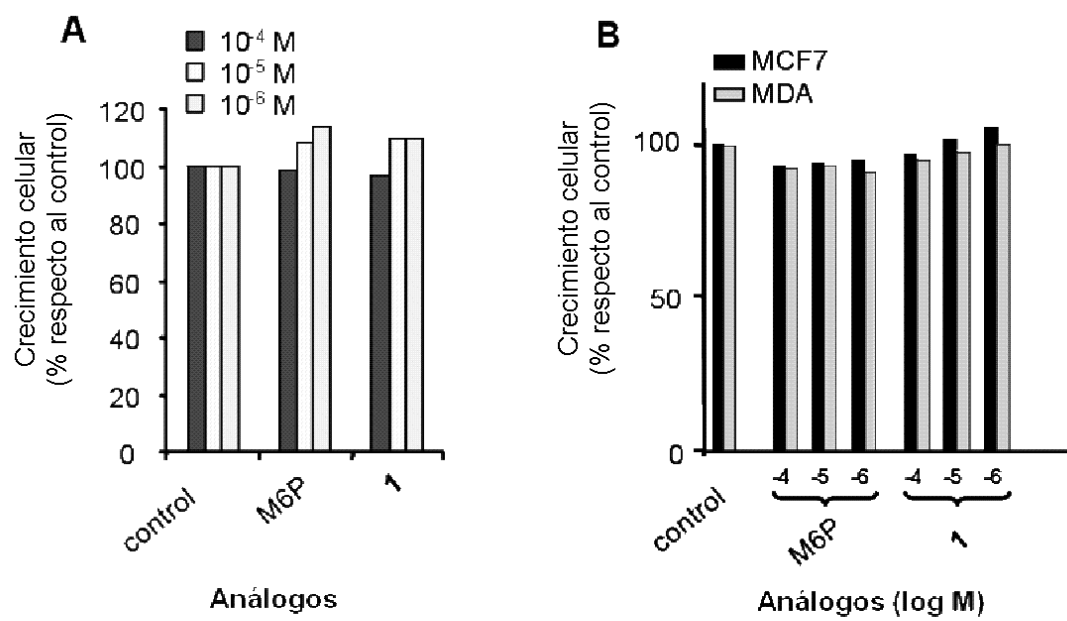


FIG.5

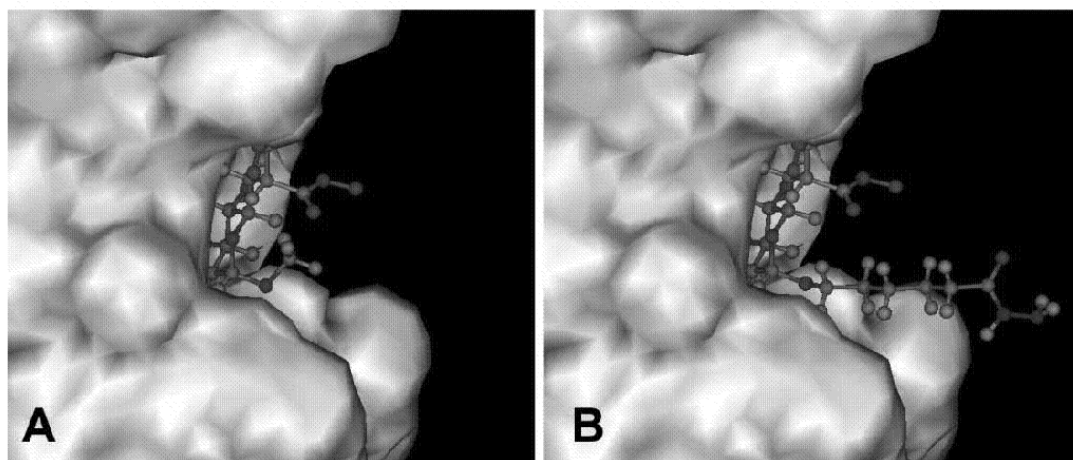


FIG.6

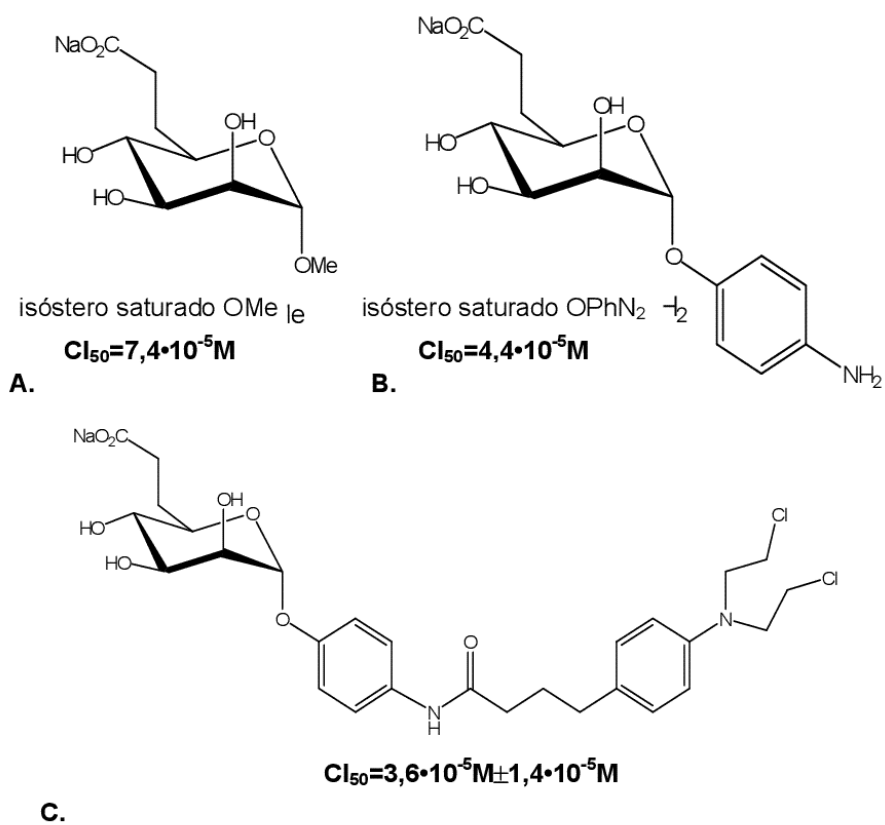
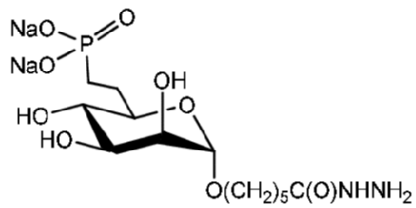
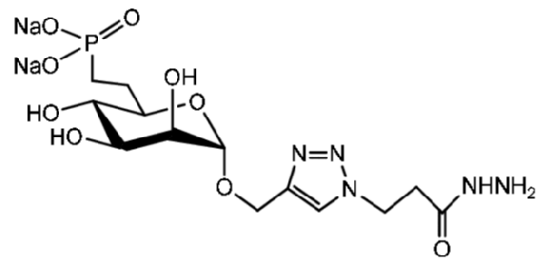


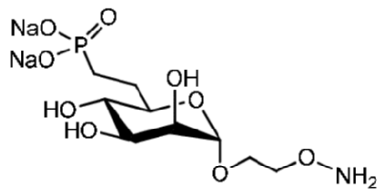
FIG.7



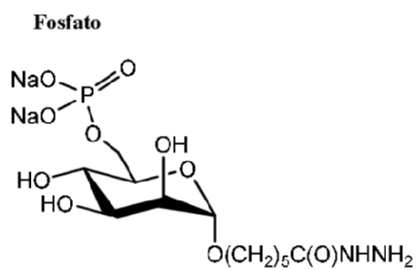
AMFA-1 brazo espaciador hexanohidrazida



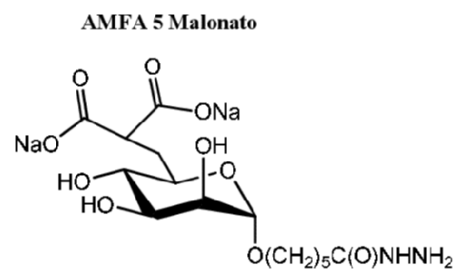
AMFA-2 brazo espaciador que contiene el triazol



AMFA-3 brazo espaciador 2-(aminoxi)etilo



M6P-hexanohidrazida
brazo espaciador hexanohidrazida



AMFA-5 brazo espaciador hexanohidrazida

FIG. 8

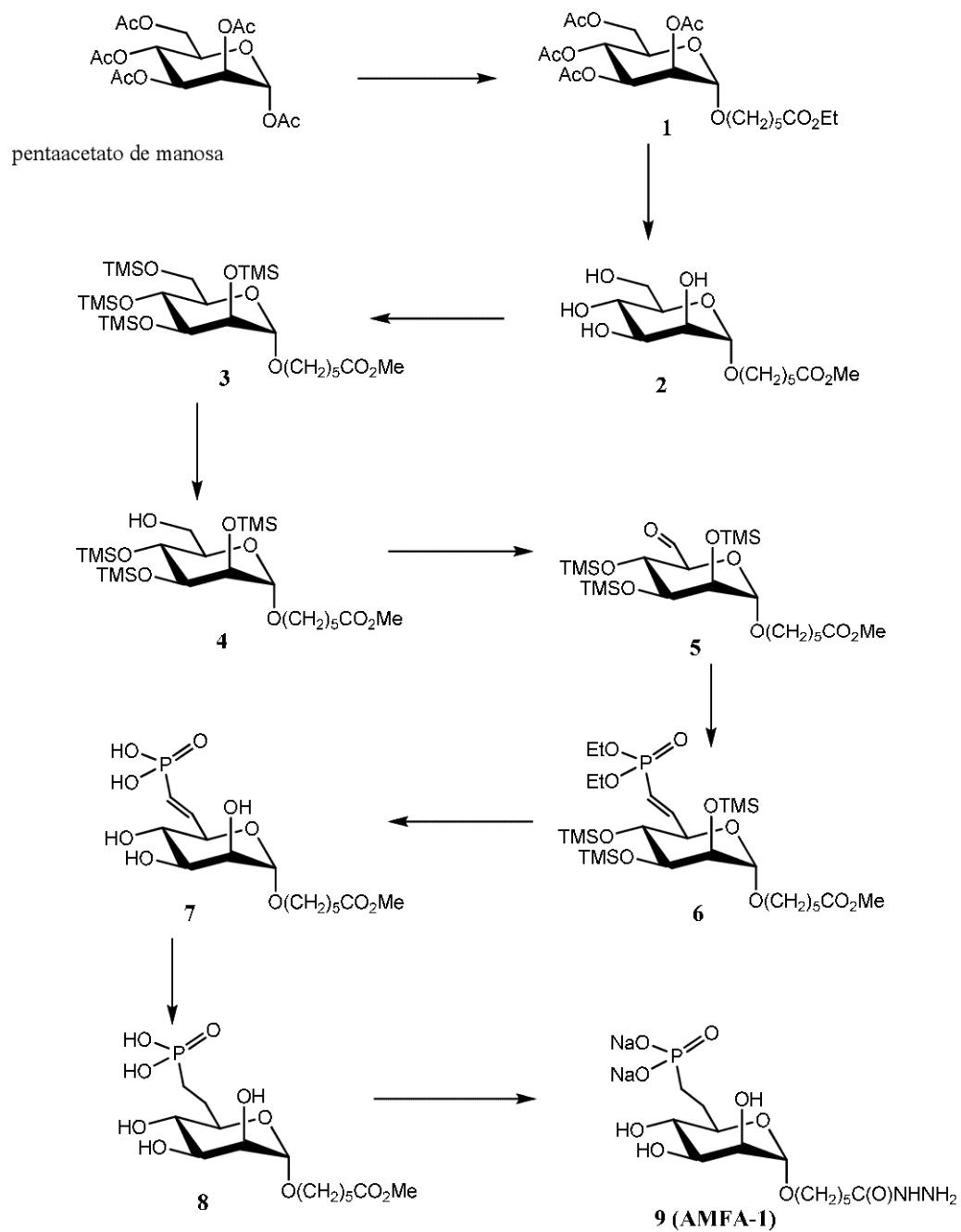


FIG.9

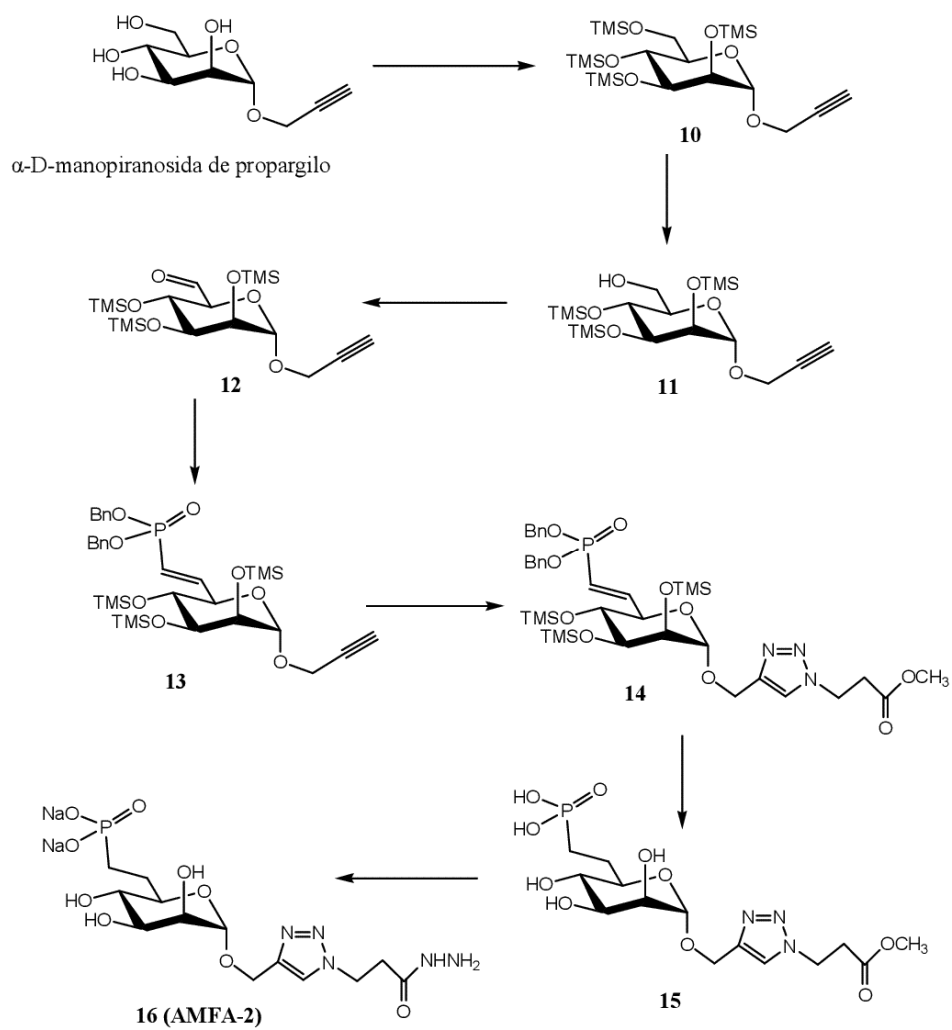


FIG.10

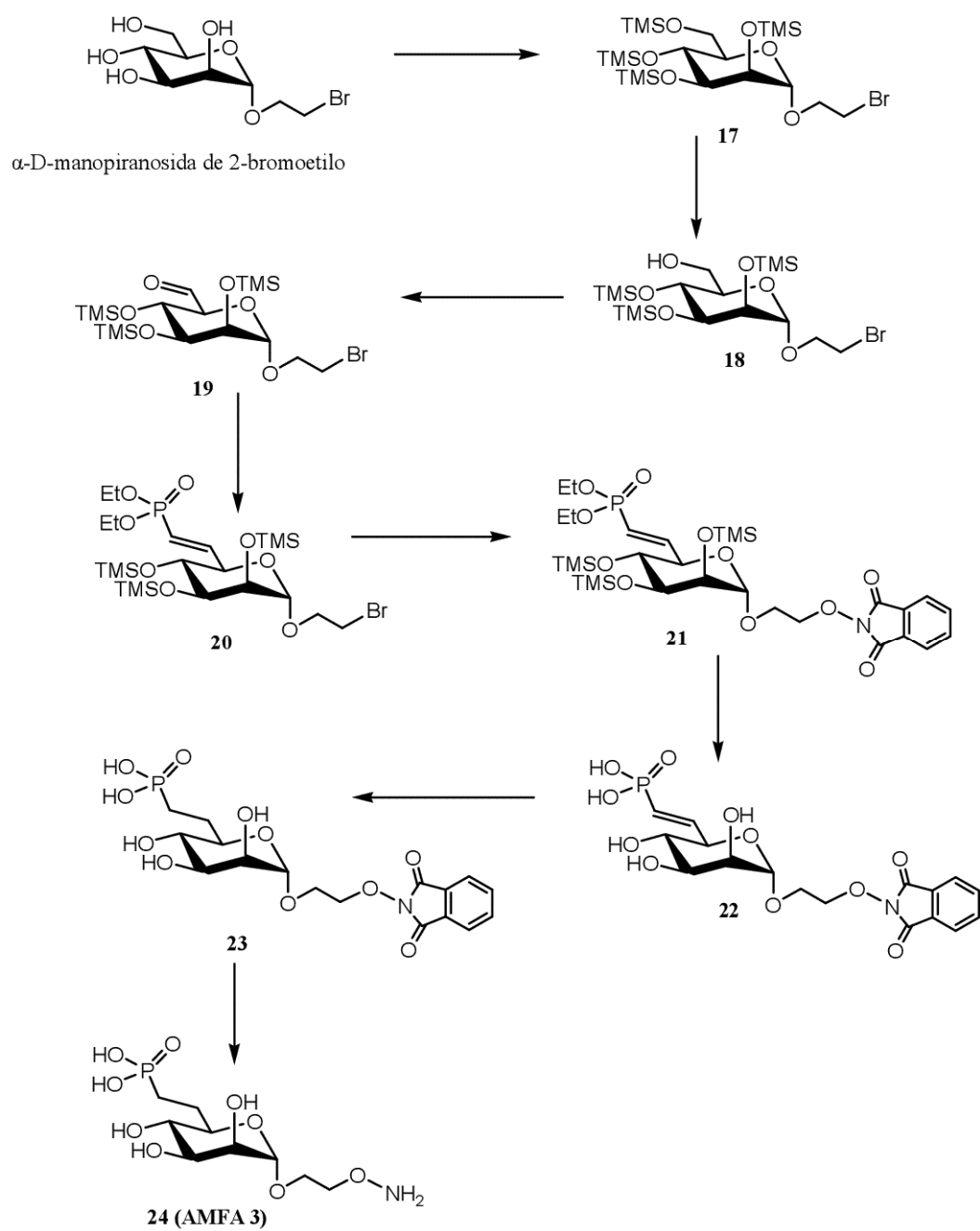


FIG.11

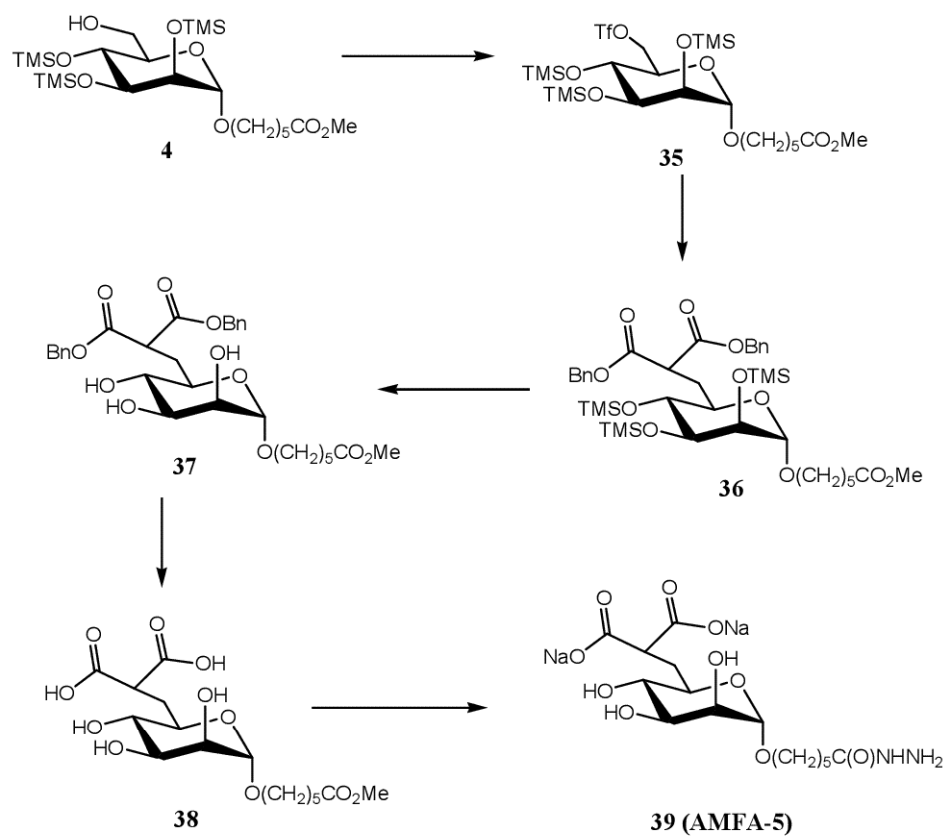


FIG.12

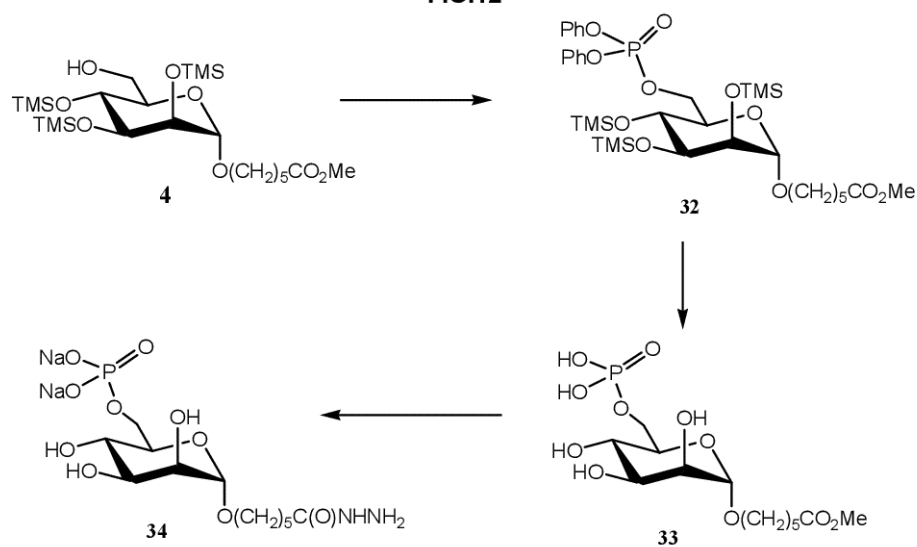


FIG.13

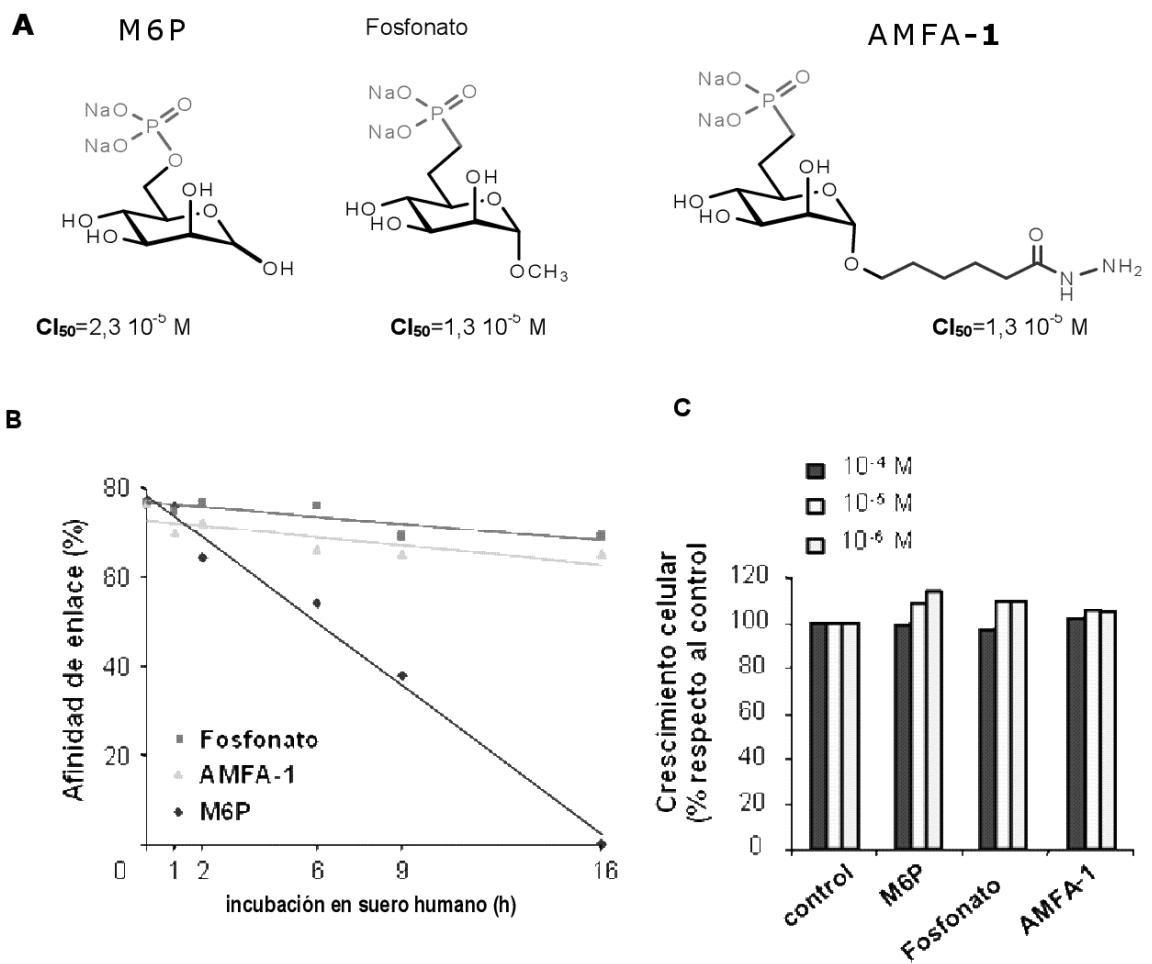


FIG.14

	CI50	Estabilidad (%)
AMFA-1	$1,3 \cdot 10^{-5} \text{ M} \pm 0,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	85
AMFA-2	$3,8 \cdot 10^{-5} \text{ M} \pm 1,6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	90
AMFA-3	$4,9 \cdot 10^{-5} \text{ M} \pm 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	91
AMFA-5	$1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M} \pm 0,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	90
M6P	$2,3 \cdot 10^{-5} \text{ M} \pm 1,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	0
M6P-hexanohidrazida	$1 \cdot 10^{-4} \text{ M} \pm 1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	16

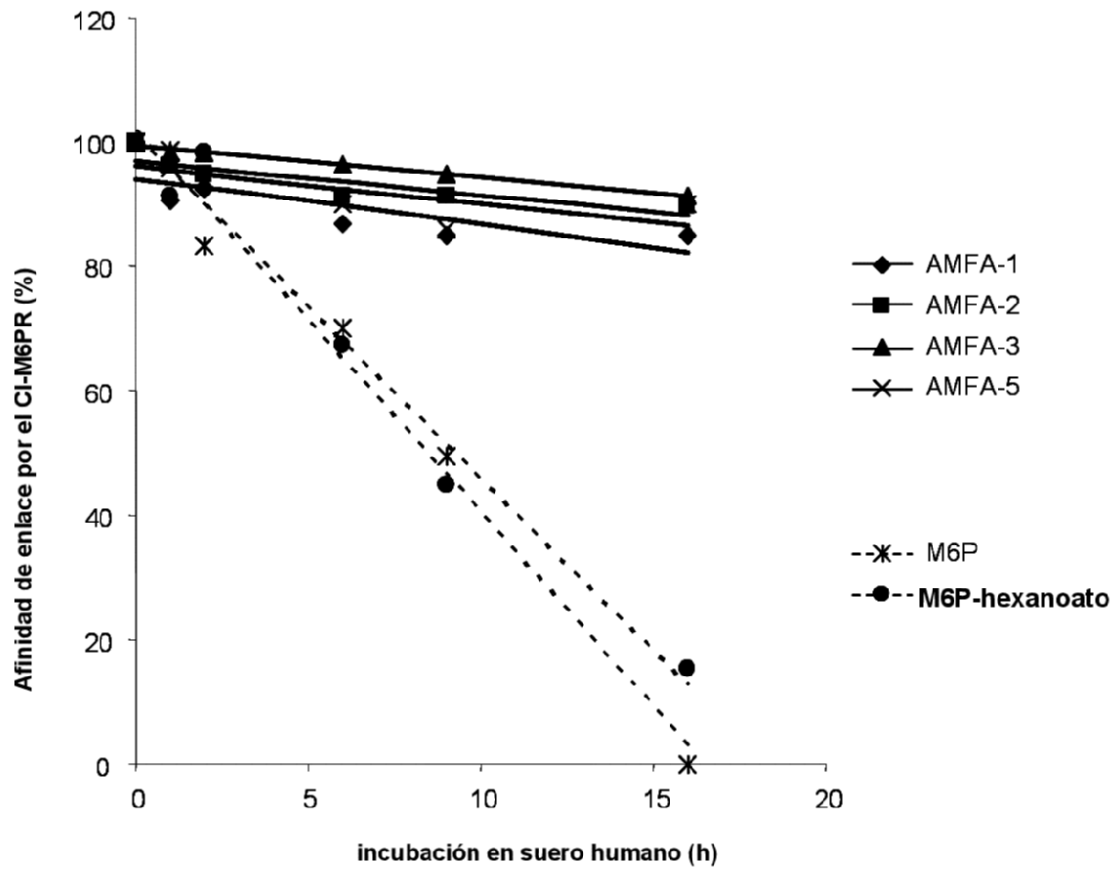


FIG.15

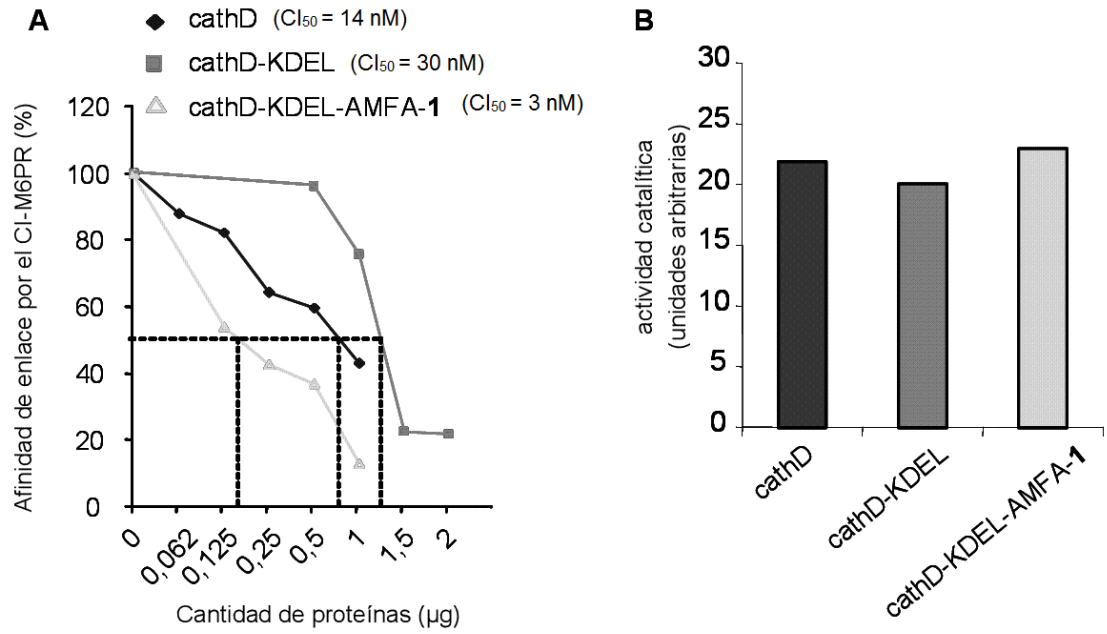


FIG.16

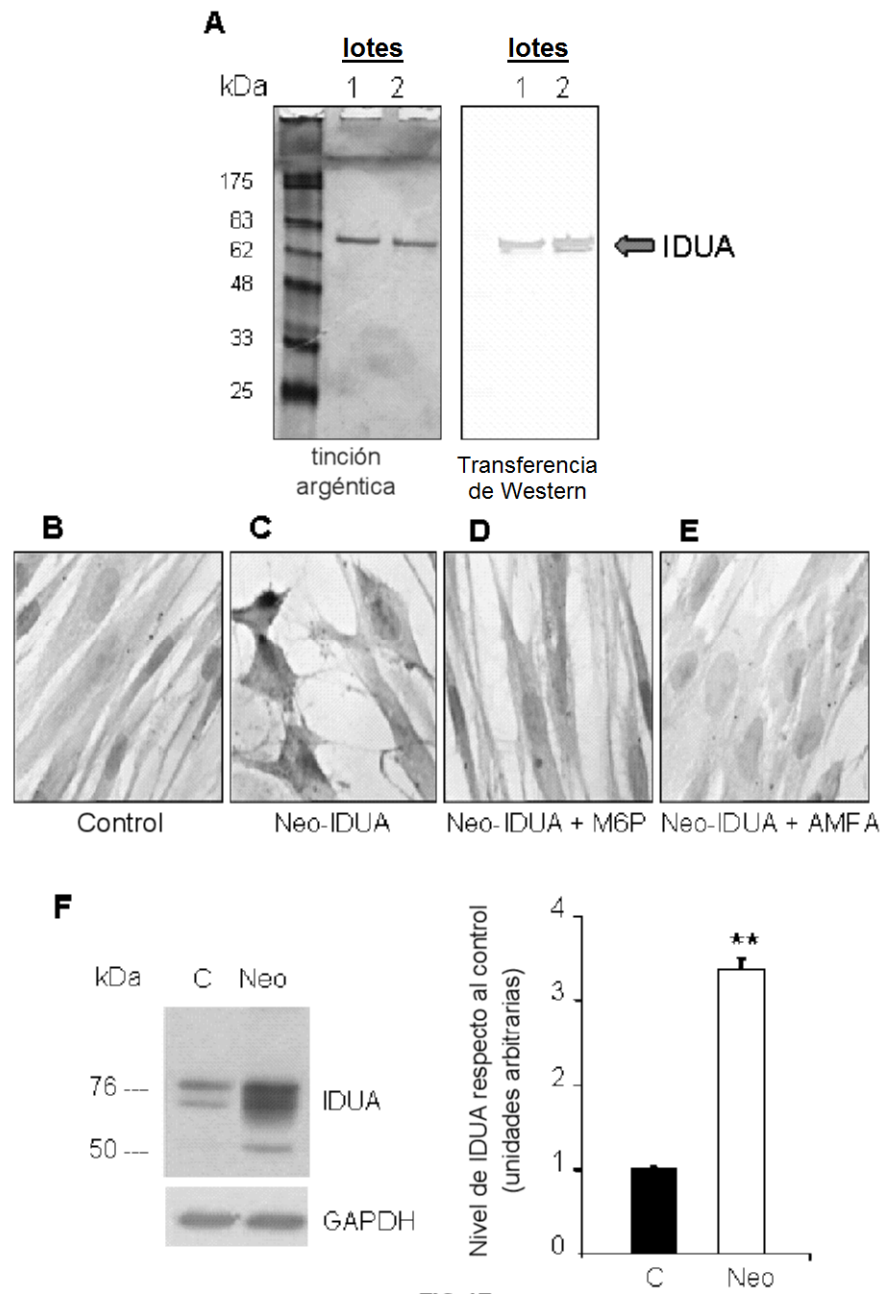


FIG.17

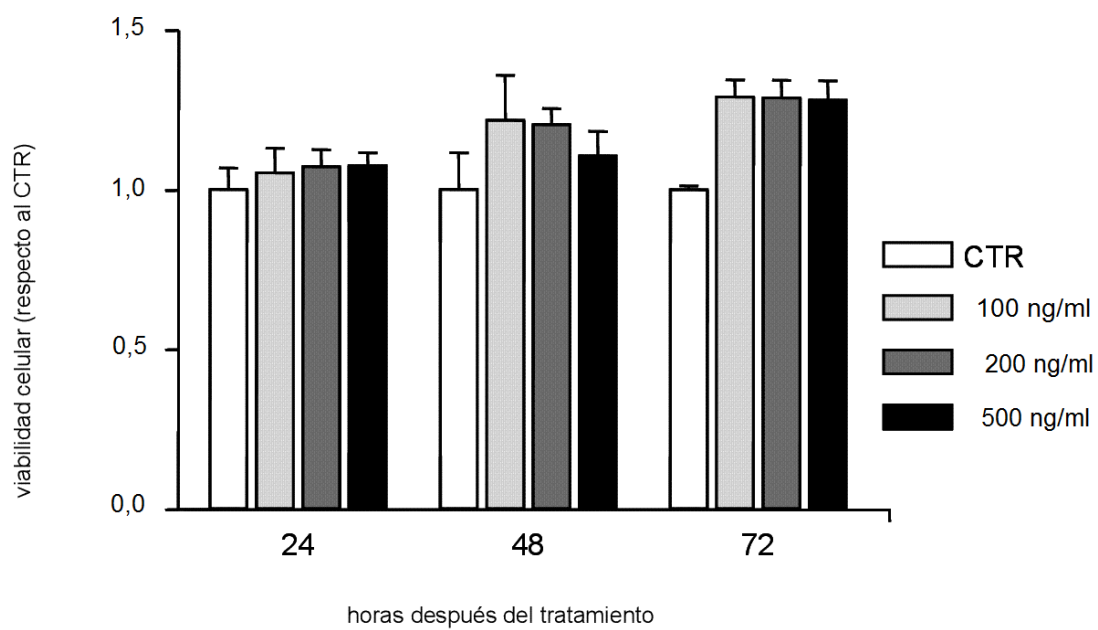


FIG.18