

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 472 115**

21 Número de solicitud: 201232024

51 Int. Cl.:

**C07D 513/04** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**26.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**27.06.2014**

Fecha de la concesión:

**23.04.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**30.04.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070883**

Fecha de publicación de la mención al informe de  
búsqueda internacional:

**21.07.2014**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (25.0%)**

**Serrano, 117**

**28006 Madrid (Madrid) ES;**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (25.0%);**

**INTERNATIONAL UNIVERSITY OF HEALTH AND  
WELLFARE (IUHW) REGISTRY NUMBER**

**598133665 (25.0%) y**

**NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**

**TOTTORI UNIVERSITY (25.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA FERNÁNDEZ, José Manuel;**

**ORTIZ MELLET, Carmen;**

**EIJI, Nanba;**

**KATSUMI, Higaki y**

**YOSHIYUKI, Suzuki**

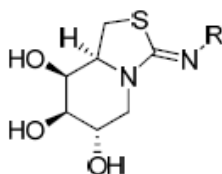
74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE DERIVADOS BICÍCLICOS DE 1-DESOXIGALACTONOJIRIMICINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON BETA-ENZIMAS GALACTOSIDASAS LISOSÓMICAS MUTANTES HUMANAS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un uso de un compuesto de fórmula (I)



o una de sus sales, donde

R representa una cadena alifática, lineal o ramificada, que se selecciona del grupo que consiste en cadena hidrocarbonada saturada C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, y cadena hidrocarbonada insaturada C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>,

en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con enzimas β galactosidasas lisosómicas mutantes en humanos.

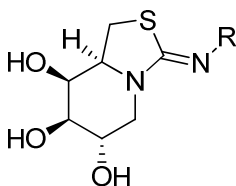
ES 2 472 115 B1

**UTILIZACIÓN DE DERIVADOS BICÍCLICOS DE 1-DESOXIGALACTONOJIRIMICINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON  $\beta$ - ENZIMAS GALACTOSIDASAS LISOSÓMICAS MUTANTES HUMANAS**

5 **DESCRIPCIÓN**

**Sector y objeto de la invención**

10 La presente invención va dirigida al sector farmacéutico, con aplicaciones destinadas al tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal relacionadas con mutaciones de la  $\beta$ -glucosidasa ácida lisosómica. El objeto de la invención es el uso de un compuesto de fórmula (I)



15 o una de sus sales, donde:

R representa una cadena alifática, lineal o ramificada, que se selecciona del grupo que consiste en cadena hidrocarbonada saturada  $C_1$ - $C_{16}$ , y cadena hidrocarbonada insaturada  $C_2$ - $C_{16}$ , para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades relacionadas con  $\beta$ -enzimas galactosidasas lisosómicas mutantes humanas.

20 **Estado de la técnica**

25 Los trastornos de almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades resultantes del metabolismo anormal de varios sustratos que no se degradan y se acumulan en los lisosomas, conduciendo a una serie de fenotipos que incluyen megalovisceralia, patologías neurológicas, lesiones esqueléticas y muerte prematura. Estas enfermedades son el resultado de mutaciones en los genes que codifican enzimas implicadas en el proceso de degradación. Actualmente sólo hay disponibles terapias sintomáticas para estos enfermos, diferenciándose dos estrategias terapéuticas: la terapia de reducción de sustrato, basada la inhibición de la producción de sustrato usando inhibidores de las enzimas implicadas en su biosíntesis, y la terapia de reemplazamiento enzimático, basada en la administración exógena de enzimas activas recombinantes. Para el trastorno de almacenamiento lisosómico más predominante, la enfermedad de Gaucher, esta terapia cuesta entre 100.000 y 750.000 dólares al año, y no es muy eficaz para los casos que muestran implicación del sistema nervioso central.

35 Dentro de este tipo de patologías de almacenamiento lisosómico, la deficiencia hereditaria de  $\beta$ -galactosidasa ácida lisosómica ( $\beta$ -galactosidosis), causa dos enfermedades clínicamente distintas en seres humanos, la gangliosidosis GM1 y la enfermedad de Morquio B. Ambas son el resultado de mutaciones en el gen GLB1 que conducen a un plegamiento proteico erróneo. El modo de herencia es recesivo autosómico. La gangliosidosis GM1 es una enfermedad neurosomática generalizada que aparece principalmente en la primera infancia, y raramente en la niñez o en adultos jóvenes. La enfermedad de Morquio B es una rara enfermedad ósea sin implicación del sistema nervioso central. En pacientes con estos fenotipos clínicos se acumulan glicoconjugados con restos de  $\beta$ -galactosa terminales en los tejidos y orina. El gangliósido GM1 y su derivado asiálico GA1 se acumulan en el cerebro en el caso de la gangliosidosis GM1. Tanto en pacientes con gangliosidosis GM1 como en pacientes que padecen la enfermedad de Morquio B se detectan altas cantidades de oligosacáridos derivados de sulfato de queratano o glicoproteínas en órganos viscerales y orina. Se han identificado más de 160 mutaciones puntuales diferentes en el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. Las mutaciones conducen a defectos significativos en el plegamiento de la proteína durante la traducción en el retículo endoplasmático, dando como resultado una reducción del transporte de la enzima al lisosoma (degradación mediada por la maquinaria celular de control de calidad). La forma clínica de la enfermedad depende de la mutación en la  $\beta$ -galactosidasa ácida

50 que presenta el enfermo, y su gravedad se relaciona con la actividad enzimática residual.

La terapia de reemplazamiento enzimático para los casos en los que el sistema nervioso central se ve afectado presenta una eficacia baja o nula, ya que las enzimas recombinantes no atraviesan la barrera hematoencefálica. De este modo, existe un gran número de pacientes para los cuales no existe tratamiento o la efectividad del mismo es muy baja.

55

En los últimos años se ha descrito que algunos inhibidores de estas enzimas glicosidasas son capaces de unirse al sitio activo y estabilizar el plegamiento apropiado, pudiendo actuar como "chaperonas farmacológicas" que

facilitan el transporte de la forma catalíticamente activa a los lisosomas. De este modo, el desarrollo de compuestos con actividad de chaperonas farmacológica se ha postulado como una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal, y de particular interés para aquellas manifestaciones clínicas de la enfermedad que involucran al sistema nervioso central.

Algunos alcaloides polihidroxiados naturales y sintéticos estructuralmente relacionados con los azúcares (glicomiméticos) que incorporan un nitrógeno endocíclico de tipo amina (hibridación  $sp^3$ ) exhiben una actividad inhibitoria significativa frente a glicosidasas. En algunos casos, se ha demostrado que estos compuestos usados a concentraciones subinhibidoras actúan como chaperonas de  $\beta$ -galactosidasa mutantes responsables de la enfermedad de gangliosidosis GM1 y de Morquio B (US 2006/0100241; W02004/037373). Sin embargo, estos tipos de compuestos se comportan en general como inhibidores de glicosidasas de amplio espectro, inhibiendo simultáneamente varias glicosidasas, lo que representa un inconveniente serio para aplicaciones clínicas. Esta falta de selectividad de acción frente a glicosidasas ha sido corregida con el desarrollo de compuestos donde el nitrógeno endocíclico de tipo amina se ha transformado en un nitrógeno de tipo pseudoamida (como por ejemplo, un grupo carbamato, tiocarbamato, isourea, isotiourea, urea, tiourea o guanidina), con hibridación  $sp^2$  (en adelante, iminoazúcares  $sp^2$ ). De este modo, se han desarrollado iminoazúcares  $sp^2$  de notable actividad chaperona y que muestran gran selectividad frente a  $\beta$ -glucocerebrosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa o  $\beta$ -galactosidasa (W02010046517A1; C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, et al., *Chem. Commun.*, 2012, 48, 6514–6516)

Compuestos derivados de valienamina como N-octil-4-epi- $\beta$ -valienamina (NOEV), que no presenta estructura química de iminoazúcar, también han demostrado actuar como chaperonas farmacológicas para enzimas mutantes responsables de estas enfermedades de almacenamiento lisosómico.

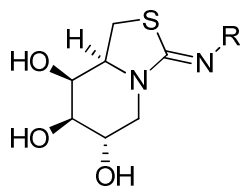
Un problema con el que se encuentra esta estrategia terapéutica basada en el uso de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Morquio B y de la Gangliosidosis GM1 es que los compuestos conocidos hasta la fecha son efectivos para un número reducido de mutaciones en el gen que codifica la  $\beta$ -galactosidasa. Por tanto, y dada la gran variabilidad de las mismas que presentan los enfermos, es necesario el desarrollo de compuestos que tengan un amplio espectro de acción respecto a estas mutaciones para posibilitar el desarrollo de medicamentos de uso generalizado.

Existe, por la tanto, la necesidad de desarrollar moléculas con una alta especificidad de unión a la  $\beta$ -galactosidasa, con una elevada relación de actividad chaperona frente a actividad inhibitoria y que sean efectivas para un amplio espectro de enzimas  $\beta$ -galactosidasas mutantes.

Si bien se han descrito tanto iminoazúcares como iminoazúcares  $sp^2$  con actividad como chaperonas farmacológicas frente a mutantes de la  $\beta$ -galactosidasa asociados a las enfermedades de gangliosidosis GM1 y de Morquio B conteniendo en su estructura un anillo de piperidina polihidroxiado con un patrón de sustitución que corresponde con el de la D-glucosa o la D-galactosa (es decir, son derivados de la nojirimicina o de la galactonojirimicina), no existían datos que permitiesen predecir que derivados bicíclicos de 1-desoxigalactonojirimicina pudieran actuar como chaperonas efectivas de amplio rango de mutantes, incluyendo mutaciones para las que no se conocían compuestos con actividad chaperona.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula general (I) o una de sus sales



dónde

R representa una cadena alifática, lineal o ramificada, que se selecciona del grupo que consiste en cadena hidrocarbonada saturada  $C_1$ - $C_{16}$ , y cadena hidrocarbonada insaturada  $C_2$ - $C_{16}$ , para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de la deficiencia de la forma activa de la enzima  $\beta$ -galactosidasa en el ser humano, que se relaciona con enfermedades tales como la gangliosidosis GM1 y la enfermedad de Morquio B.

En la presente invención se ha encontrado que compuestos bicíclicos condensados (seis miembros/cinco miembros) derivados de 1-desoxigalactonojirimicina en los que el átomo de nitrógeno cabeza de puente forma

parte de un grupo funcional isotiourea que, a su vez, porta un sustituyente de naturaleza hidrófoba, se comportan como inhibidores específicos de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal capaces de actuar como chaperonas farmacológicas a concentraciones inferiores a las de inhibición, con la ventaja significativa respecto a otros glicomiméticos, incluidos otros iminoazúcares  $sp^2$ , de que no presentan toxicidad y que su actividad chaperona es efectiva para un rango amplio de mutaciones diferentes, entre las que se incluyen las G190D, R201C, R201H, V216A, D332N, Y444C, R457Q, R590H, I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R, K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G y D640E, que son relativamente frecuentes en varios fenotipos clínicos. Para algunas de estas mutaciones (I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R, K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G y D640E), algunos compuestos bien conocidos como activadores de la  $\beta$ -galactosidasa, tales como NOEV, no mostraron sin embargo ninguna actividad.

La estructura química de los compuestos de la invención les permite atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que su uso en la fabricación de medicamentos destinados al tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal con implicaciones en el sistema nervioso central, como la gangliosidosis GM1, es de especial interés.

El término "cadena hidrocarbonada saturada" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 16 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente la cadena hidrocarbonada saturada tiene entre 1 y 8 átomos de carbono. Más preferiblemente es *n*-butilo. La cadena hidrocarbonada saturada puede estar opcionalmente sustituida por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no seleccionado de entre amino, amida, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxiamida.

El término "cadena hidrocarbonada insaturada" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 16 átomos de carbono, y que poseen entre 1 o más insaturaciones elegidas de forma independiente entre dobles y triples enlaces, por ejemplo, vinilo, alilo, 2-propinilo, 1,3-pentadiinilo, but-1-en-3-inilo, etc. Las cadenas hidrocarbonadas insaturadas pueden estar opcionalmente sustituidas por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amida, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxiamida.

Los compuestos derivados de la 1-desoxigalactonojirimicina de la invención, según se representa en la fórmula general (I), incluyen bicíclos condensados de seis miembros/cinco miembros que tienen un átomo de nitrógeno cabeza de puente que es parte de una funcionalidad isotiourea cíclica. Por "funcionalidad isotiourea cíclica", se define un grupo de fórmula general N-C(=NR)S, en el que el átomo de nitrógeno que no porta el doble enlace y el átomo de azufre forman parte de un ciclo y en el que el átomo de nitrógeno exocíclico porta como sustituyente una cadena hidrocarbonada tal y como se ha definido en los párrafos anteriores.

Una realización preferida de la presente invención, comprende el uso de un compuesto de fórmula general (I) donde R es una cadena hidrocarbonada saturada.

En una realización preferida de la invención R es una cadena lineal.

En una realización preferida de la invención R es una cadena hidrocarbonada de 1 a 8 átomos de carbono. En otra realización más preferida R es butilo, y por tanto el compuesto de fórmula general (I) es 5*N*,6*S*-(*N*'-butiliminometiliden)-6-tio-1-desoxigalactonojirimicina (6*S*-NBI-DGJ).

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, destinada al tratamiento de enfermedades relacionadas con el mal funcionamiento de la enzima  $\beta$ -galactosidasa lisosómica en un sujeto humano, que comprende en su formulación al menos un compuesto como el descrito anteriormente, en cualquiera de sus variantes. Opcionalmente dicha composición puede comprender otro principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

### **Breve descripción de la figura**

**Figura 1:** Datos correspondientes a 24 mutaciones, en comparación con la  $\beta$ -galactosidasa silvestre (WT) y con una enzima de referencia (mock).

### **Modo de realización de la invención**

Los compuestos de la invención pueden ser preparados siguiendo el procedimiento sintético desarrollado por García Fernández *et al.* (J. M. García Fernández, *et al.*, *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 6514–6516).

**Ejemplo 1**

Inhibición selectiva in vitro de  $\beta$ -galactosidasa lisosomal humana por 5N,6S-(N'-butiliminometilideno)-6-tio-1-desoxigalactonojirimicina (6S-NBI-DGJ).

5 En primer lugar, se determinaron las actividades de varias glicosidasas lisosomales humanas, en concreto de  $\beta$ -glucosidasa ( $\beta$ -glucocerebrosidasa),  $\alpha$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -galactosidasa, y hexosaminidasa en lisados celulares usando el correspondiente D-glicopiranosido conjugado con 4-metilumbeliferona como sustrato (A.M. Vaccaro, M. Muschilli, M. Tatti, R. Salvioli, E. Gallozzi, K. Suzuki. *Clin. Biochem.* 20: 429-43, 1987).  
10 Brevemente, se incubaron 4  $\mu$ L de lisados celulares a 37 °C con 8  $\mu$ L de disolución sustrato en tampón citrato 0,1 M, pH 5,2, suplementada con taurocolato de sodio (0,8% p/v). Se terminó la reacción añadiendo 1,0 mL de tampón de glicina-hidróxido de sodio 0,2 M (pH 10,7). Se definió una unidad de actividad enzimática como nmoles de 4-metilumbeliferona liberados por hora.

15 Seguidamente, para explorar el efecto del compuesto 6S-NBI-DGJ sobre las diferentes glicosidasas lisosomales, se cultivaron células de controles sanos durante 4 días en ausencia o presencia de concentraciones crecientes del compuesto. Después de la exposición, se rascaron en H<sub>2</sub>O enfriada con hielo (10<sup>6</sup>/mL) y se lisaron mediante sonicación. Se retiraron los materiales insolubles mediante centrifugación a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y se midieron las actividades de las enzimas en lisados celulares. Los resultados indicaron que el compuesto 6S-NBI-DGJ inhibe selectivamente y de manera competitiva la  $\beta$ -galactosidasa, con un valor de concentración necesaria para alcanzar un 50% de inhibición (IC<sub>50</sub>) de 32  $\mu$ M. A esta concentración, la actividad del resto de enzimas lisosomales humanas determinadas se afectó en menos de un 2%.

**Ejemplo 2**

25 Estabilización in vitro de  $\beta$ -galactosidasa lisosomal humana frente a la desnaturalización inducida por calentamiento en presencia de 6S-NBI-DGJ.

Para evaluar el potencial del compuesto 6S-NBI-DGJ como chaperona farmacológica se determinó su capacidad para proteger la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal humana frente a la degradación inducida por calor a pH neutro. Para ello, los lisados celulares se incubaron en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de 6S-NBI-DGJ en tampón citrato 0.1 M (pH 7) a 48 °C. La incubación se terminó mediante adición de dos volúmenes de tampón citrato 0.1 M (pH 4.5) y se midió entonces la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa como en el ejemplo anterior.  
30 En ausencia de 6S-NBI-DGJ, la actividad de la enzima cayó a menos del 20% del valor inicial tras 20 minutos de incubación. En presencia de 6S-NBI-DGJ se observó la supresión de la degradación de la enzima de manera dependiente de la dosis, con valores residuales de actividad de la enzima tras 20 minutos de incubación que permanecieron entre el 80% y el 100% para concentraciones de 6S-NBI-DGJ entre 20  $\mu$ M y 160  $\mu$ M.

**Ejemplo 3**

40 Potenciación in vitro de la actividad de mutantes de la  $\beta$ -galactosidasa asociados a enfermedades de deficiencia de esta enzima por 6S-NBI-DGJ en fibroblastos humanos.

Se cultivaron fibroblastos cutáneos derivados de personas sanas y de pacientes con deficiencia de la  $\beta$ -galactosidasa presentando las mutaciones I51T/I51T, I51T/Y316C, I51T/R457Q, G190D/G190D, R201C/R201C, G438E/G438E, R457Q/R457Q y R59H/R59H, siguiendo el procedimiento descrito (Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K *et al. Brain Dev* 28:482-486, 2006). Los fibroblastos humanos de cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con antibióticos (estreptomina y penicilina) y suero bovino fetal al 10% en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de 6S-NBI-DGJ durante 96 h. Tras este tiempo se midió la actividad de la enzima en lisados como se describe en el ejemplo 1. Los resultados indicaron que 6S-NBI-DGJ incrementó de manera estadísticamente significativa la actividad de la enzima para las mutaciones I51T/I51T, I51T/Y316C, I51T/R457Q, G190D/G190D, R201C/R201C, G438E/G438E y R457Q/R457Q a concentraciones 20  $\mu$ M (incremento entre 1.3 y 3 veces) y 80  $\mu$ M (incremento entre 2 y 5 veces). La única excepción en esta serie fue la enzima con la mutación R59H/R59H.

**Ejemplo 4**

55 Potenciación in vitro de la actividad de mutantes de la  $\beta$ -galactosidasa recombinante humana asociados a enfermedades de deficiencia de esta enzima por 6S-NBI-DGJ en células COS7.

Células COS7 se transfectaron con plásmidos conteniendo ADN complementario (cADN) de la  $\beta$ -galactosidasa silvestre (WT) y de mutantes asociados a enfermedades de deficiencia de la  $\beta$ -galactosidasa usando como vector Lipofectamine 2000 (Higaki K, Linjing L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamura A, Yamamoto K *et al. Hum Mutat* 32:843-852, 2011). Tras 5 horas de incubación, las células se expusieron a medio de cultivo fresco en ausencia o en presencia de 6S-NBI-DGJ a concentraciones 20  $\mu$ M y 80  $\mu$ M, tras lo cual se determinó la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en lisados como se describe en los ejemplos anteriores. Se ensayaron 88 mutantes diferentes. Los resultados indicaron un incremento significativo en 24 de estos mutantes: G190D, R201C, R201H, V216A, D332N, Y444C, R457Q, R590H, I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R,

K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G, D640E. Los datos correspondientes a estas 24 mutaciones, en comparación con la  $\beta$ -galactosidasa silvestre (WT) y con una enzima de referencia irrelevante (mock) se recogen en la Figura 1.

5 En las siguientes mutaciones no se observó incremento de actividad significativo a las concentraciones estudiadas:

10 S54N, Y83C, Y83H, E131K, L173P, Y199C, R201Y, Q255H, N318H, Y324C, D332E, N484K, G494S, R590C, R49C, S54I, R59C, R59H, R68W, T82M, F107L, R121S, G123R, G134V, P136S, R148C, R148S, D151V, W161G, L162S, G178R, I181K, V240M, R263S, Y270D, G272D, W273L, H281Y, Y316C, T329A, Y333H, Y347C, R351X, Q408P, T420K, T420P, L422R, V439G, D441N, R442Q, D448V, R457X, M480V, R482C, D491N, G494C, T500A, W509C, P549L, G554E, K578R, G579D, Y591N, Y591C.

15 Es importante destacar que no existe hasta el momento ningún otro compuesto que haya demostrado comportarse como activador de  $\beta$ -galactosidasa mutante en un rango tan amplio de mutaciones asociadas a enfermedades de deficiencia de esta enzima. Por ejemplo, en 16 de las 24 mutaciones para las que el compuesto incrementa significativamente la actividad (I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R, K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G, D640E), el NOEV, un compuesto ampliamente estudiado como activador de  $\beta$ -galactosidasa mutante, no mostró ninguna actividad en un ensayo realizado en paralelo.

#### **Ejemplo 5**

##### Ausencia de toxicidad del compuesto 6S-NBI-DGJ

25 La posible toxicidad de 6S-NBI-DGJ en fibroblastos humanos se determinó mediante el ensayo de la lactato deshidrogenasa (LHD; Wako) en el sobrenadante de los correspondientes cultivos celulares. No se encontró efecto tóxico a concentraciones de hasta 600  $\mu$ M de este compuesto.

#### **Ejemplo 6**

30 Supresión de la acumulación de gangliósido GM1 en fibroblastos de pacientes de enfermedades asociadas a la deficiencia de la  $\beta$ -galactosidasa por el compuesto 6S-NBI-DGJ

35 La deficiencia de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal humana conduce a la acumulación del gangliósido GM1 en las células del paciente. Esta es, de hecho, la causa primera de la patogénesis en la gangliosidosis GM1. Cuando se cultivaron fibroblastos de enfermos homocigóticos para las mutaciones I51T y R201C en medio suplementado con gangliósido GM1, se observó su acumulación de manera importante. El tratamiento con 6S-NBI-DGJ (80 mM) suprimió esta acumulación, reduciendo sus niveles a menos del 50% del valor inicial en ausencia del compuesto. En un ensayo comparativo, el compuesto de referencia NOEV presentó una eficacia similar en fibroblastos con la mutación R201C, pero fue ineficaz en el caso de la mutación I51T.

40

#### **Ejemplo 7**

##### Efecto del compuesto 6S-NBI-DGJ en el tejido cerebral y en otros órganos de ratones que expresan la mutación R201C en la $\beta$ -galactosidasa

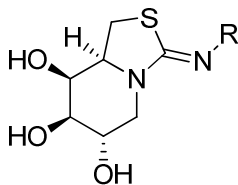
45 Para obtener una prueba de concepto de la capacidad del compuesto 6S-NBI-DGJ para atravesar la membrana hematoencefálica, así como para activar la  $\beta$ -galactosidasa mutante en diferentes órganos, se aplicaron dosis del mismo (1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM en agua) a ratones que expresan la  $\beta$ -galactosidasa humana con la mutación R201C por vía oral durante una semana. Cuando se usaron concentraciones de 1 mM y 2 mM, se observó un aumento de más de dos veces de la actividad de la enzima en lisados del corazón, riñón y pulmones, y de 1,2 veces en lisados del cerebro. A concentraciones de 5 mM y 10 mM la actividad en lisados del cortex cerebral y del tallo cerebral aumentó en más de cuatro veces. Además, se observó una reducción muy notable de la acumulación de gangliósido GM1 en los lisosomas. Los datos demuestran de manera inequívoca que el compuesto 6S-NBI-DGJ atraviesa la barrera hematoencefálica, aumenta la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa mutante y produce una mejora significativa en la patología cerebral asociada a la deficiencia de la  $\beta$ -galactosidasa.

50

55

## REIVINDICACIONES

1.- Uso de un compuesto de fórmula (I)



5

o una de sus sales, donde:

R representa una cadena alifática, lineal o ramificada, que se selecciona del grupo que consiste en cadena hidrocarbonada saturada C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>, y cadena hidrocarbonada insaturada C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub>,

10 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con enzimas β-galactosidasas lisosómicas mutantes en humanos.

2.- Uso de un compuesto se fórmula general (I) según la reivindicación 1, caracterizado porque R es una cadena hidrocarbonada saturada C<sub>1</sub>-C<sub>16</sub>.

15

3.- Uso de un compuesto de fórmula general (I) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque R es una cadena hidrocarbonada lineal.

4.- Uso de un compuesto de según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho compuesto es 5*N*,6*S*-(*N*'-butiliminometiliden)-6-tio-1-desoxigalactonojirimicina.

20

5.- Uso de un compuesto de fórmula general (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad Morquio B en humanos.

25

6.- Uso de un compuesto de fórmula general (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad Gangliosidosis GM1 en humanos.

7.- Uso de un compuesto de fórmula general (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con enzimas β-galactosidasas lisosómicas mutantes humanas seleccionadas entre algunos de los siguientes mutantes: G190D, R201C, R201H, V216A, D332N, Y444C, R457Q, R590H, I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R, K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G y D640E.

30

8.- Uso de un compuesto de fórmula general (I) según la reivindicación 7, caracterizado porque las enzimas β-galactosidasas lisosómicas mutantes humanas se seleccionan entre algunos de los siguientes mutantes: I51T, R148T, L155R, R208C, D214Y, C230Y, L264S, N266S, W273R, K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G y D640E.

35

9.- Composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con enzimas β-galactosidasas lisosómicas mutantes en humanos que comprende un compuesto de fórmula general (I)

40

10.- Composición farmacéutica según la reivindicación 9, caracterizada porque que adicionalmente comprende otro principio activo.

45

11.- Composición farmacéutica según las reivindicaciones 9 y 10 caracterizada porque comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

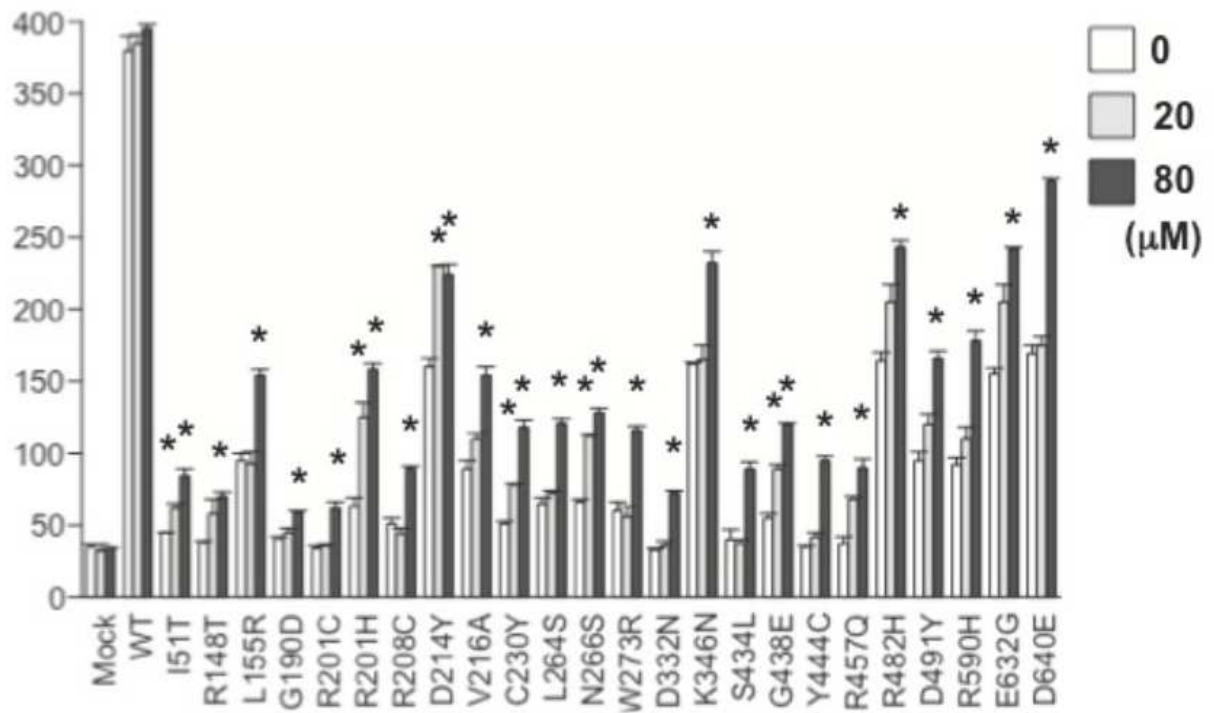


Fig. 1