

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 378**

21 Número de solicitud: 201230804

51 Int. Cl.:

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**25.05.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**30.12.2013**

Fecha de la concesión:

**01.10.2014**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**08.10.2014**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070337**

73 Titular/es:

**CENTRO DE INVESTIGACION BIOMEDICA EN  
RED DE ENFERMEDADES RARAS (30.0%)  
C/ Alvaro de Bazán, nº 10  
46010 VALENCIA (Valencia) ES;  
INSTITUTO ARAGONES DE CIENCIAS DE LA  
SALUD (10.0%);  
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (10.0%);  
UNIVERSIDAD DE MALAGA (10.0%);  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (20.0%) y  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**ALFONSO PALACIN, Pilar;  
MOYA GARCIA, Aurelio;  
PINO ANGELES, Almudena;  
SANCHEZ JIMENEZ, Francisca;  
POCOVI MIERAS, Miguel;  
GIRALDO CASTELLANO, Pilar;  
GARCIA MORENO, M<sup>a</sup> Isabel;  
ORTIZ MELLET, Carmen y  
GARCIA FERNANDEZ, José Manuel**

74 Agente/Representante:

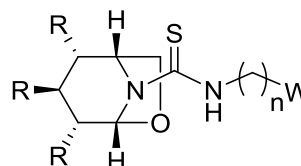
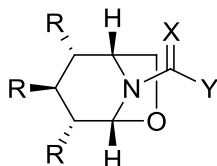
**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **USO DE UN COMPUESTO DE FÓRMULA (I) PARA LA FABRICACIÓN DE UN MEDICAMENTO DESTINADO AL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER, COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA, UN COMPUESTO DE FÓRMULA (Ib) Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN.**

57 Resumen:

Uso de un compuesto de fórmula (I)

Á  
Á  
Á  
Á  
Á  
Á  
Á



y su procedimiento de obtención.

para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), compuestos de fórmula (Ib)

ES 2 436 378 B1

## DESCRIPCIÓN

Uso de un compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad de gaucher, composición farmacéutica, un compuesto de fórmula (Ib) y procedimiento de obtención.

### CAMPO DE LA INVENCION

- 5 El campo de la invención está relacionado con preparaciones medicinales que contienen ingredientes orgánicos activos. Los principios orgánicos activos son derivados de azúcares, en concreto de la L-idosa. Estos medicamentos son útiles en el tratamiento de trastornos del metabolismo, en concreto de la enfermedad de Gaucher, un trastorno de almacenamiento lisosómico.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los desórdenes de depósito lisosómico son un grupo de enfermedades resultantes del metabolismo anómalo 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. Las estrategias terapéuticas actuales incluyen la inhibición de la producción de sustrato usando inhibidores de las  
15 enzimas implicadas en su biosíntesis. El aumento de la enzima defectiva puede conseguirse clínicamente mediante administración de una enzima recombinante. Para el trastorno de almacenamiento lisosómico con mayor prevalencia, la enfermedad de Gaucher, asociada a mutaciones en la  $\beta$ -glucosidasa ácida lisosomal ( $\beta$ -glucocerebrosidasa), 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.

- 20 Algunas de estas mutaciones perniciosas se manifiestan mediante proteínas mutantes que retienen actividad catalítica, pero que presentan defectos de plegamiento y experimentan degradación mediada por la maquinaria celular de control de calidad. Algunos inhibidores de estas enzimas 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.

- 25 La enfermedad de Gaucher es el trastorno de almacenamiento lisosómico de mayor prevalencia, con una incidencia estimada de aproximadamente 1:60.000 nacimientos en la población general y de 1:100 en la población de judíos asquenazíes. Es el resultado de mutaciones en la  $\beta$ -glucosidasa ácida ( $\beta$ -glucocerebrosidasa), una glicoproteína lisosómica asociada a membrana de 497 aminoácidos, que tienen como consecuencia la acumulación del correspondiente sustrato, la glucosilceramida. Se han identificado más de 300 mutaciones puntuales diferentes en el  
30 gen que codifica la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. 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.

- Algunos alcaloides polihidroxilados, naturales y sintéticos, que incorporan un nitrógeno endocíclico de tipo amina (hibridación  $sp^3$ ), y que están estructuralmente relacionados con los azúcares (glicomiméticos), son capaces de  
35 unirse al sitio activo de la glucosidasa, actuando como inhibidores competitivos. En algunos casos, se ha demostrado que estos compuestos usados a concentraciones subinhibidoras actúan como chaperonas de  $\beta$ -glucocerebrosidasas mutantes responsables de la enfermedad de Gaucher (US 2006/0100241; WO2004/037373). Sin embargo, estos tipos de compuestos se comportan, en general, como inhibidores de amplio espectro, inhibiendo simultáneamente varias glucosidasas, lo que representa un inconveniente serio para aplicaciones clínicas. Un problema adicional es que los iminoazúcares y sus derivados no son activos como chaperonas farmacológicas para mutaciones de la  $\beta$ -glucocerebrosidasas que no se sitúan en el dominio que contiene el sitio activo, como la mutación L444P. Aunque la selectividad de acción frente a la  $\beta$ -glucocerebrosidasa puede mejorarse transformando el nitrógeno endocíclico de tipo amina 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  $sp^2$ ), la  
45 falta de efectividad sobre mutantes como el L444P, continúa siendo un problema no resuelto (WO2011151493).

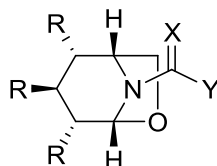
Existe, por la tanto, la necesidad de desarrollar moléculas con una alta especificidad de unión a la  $\beta$ -glucocerebrosidasa, con una elevada relación de actividad chaperona frente a actividad inhibidora y capaces de producir un aumento en la actividad de enzimas mutantes asociadas a la enfermedad de Gaucher, incluyendo mutaciones no localizadas en el dominio catalítico.

- 50 Tanto los iminoazúcares como los iminoazúcares  $sp^2$  con actividad como chaperonas farmacológicas frente a mutantes de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa asociados a la enfermedad de Gaucher contienen en su estructura un anillo de piperidina polihidroxilado 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. Si bien compuestos con estructura de iminoazúcar  $sp^2$  y un patrón de sustitución análogo a la L-idosa han sido también descritos previamente y, en algunos casos, se ha observado actividad como inhibidores frente a algunas glucosidasas de origen vegetal o animal (García Moreno, M.I. et al., *Synthesis and evaluation of calystegine B2 analogues as glycosidase inhibitors*, *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 7604-7614; *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 1803-1819) no existían datos que permitiesen predecir que la  $\beta$ -

glucocerebrosidasa humana presentase afinidad por compuestos bicíclicos derivados de la L-idosa; ni que éstos pudiesen actuar como activadores de mutantes de esta enzima asociados a la enfermedad de Gaucher, aún menos que fuesen activos frente a mutaciones no situadas en el sitio activo de la enzima.

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 La presente invención es el uso, en adelante uso de la invención, de un compuesto de fórmula (I),



donde R es un sustituyente igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

10 donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

X está seleccionado del grupo compuesto por O, NH y S,

15 Y está seleccionado del grupo compuesto por un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono, un grupo -OR<sup>1</sup>, -SR<sup>1</sup>, -NHR<sup>1</sup> y NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W,

donde R<sup>1</sup> es un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono,

n tiene un valor entre 3 y 18 y

20 W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido,

para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano.

25 En la presente invención se ha encontrado que compuestos bicíclicos que contienen: a) un anillo de piperidina con un patrón de sustitución complementario al de la L-idosa; b) una estructura bicíclica de tipo 6-oxanortropano; y c) un sustituyente de naturaleza hidrófoba unido al átomo de nitrógeno mediante un grupo funcional pseudoamida, se comportan como inhibidores específicos de la β-glucocerebrosidasa y son capaces, a determinadas concentraciones, de activar diferentes mutantes de esta enzima relacionadas con la enfermedad de Gaucher, incluyendo mutaciones no localizadas en el dominio catalítico, actuando por tanto como chaperonas farmacológicas. El efecto es particularmente significativo en ciertas enzimas mutantes, pero aparece también en células que contienen la enzima normal. En consecuencia, la invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de

30 pacientes que padecen la enfermedad de Gaucher utilizando los compuestos bicíclicos de fórmula (I).

El uso de la invención implica el uso de los compuestos de fórmula (I) como potenciadores de la actividad residual de la β-glucocerebrosidasa en un medio de cultivo de células, por ejemplo fibroblastos, para varias mutaciones que causan enfermedad de Gaucher.

35 Los compuestos de fórmula (I) tienen, además de una alta relación de actividad chaperona frente a actividad inhibidora, una muy alta selectividad hacia la enzima diana. Además, los compuestos de la invención presentan actividad frente a mutaciones de la β-glucocerebrosidasa que no están localizadas en el dominio catalítico, como la L444P. Esto representa una mejora significativa en comparación con otros compuestos de tipo iminoazúcar o iminoazúcar sp<sup>2</sup>.

40 En la presente invención, cuando W está sustituido, lo está preferentemente por uno o varios grupos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, amina, amida, urea, tiourea, hidroxilo, éster o éter, que a su vez pueden estar o no sustituidos por grupos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, amida o éteres, y éstos a su vez pueden estar igualmente sustituidos o no.

45 El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, etc. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como cicloalquilo, arilo, aralquilo, halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre alquilo, cicloalquilo, arilo,

aralquilo, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido. Cuando el grupo alquilo está sustituido, lo está preferentemente por uno o varios grupos amina, amida, urea, tiourea, hidroxilo, éster o éter, que a su vez pueden estar o no sustituidos por grupos alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, amida, o éteres y éstos a su vez, pueden estar igualmente sustituidos o no.

- 5 En la presente invención el término "cicloalquilo" se refiere a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que sólo consiste en átomos de carbono e hidrógeno, tal como ciclohexilo o adamantilo.

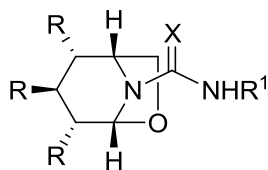
10 En la presente invención el término "arilo" se refiere a anillos aromáticos sencillos o múltiples, como por ejemplo, pero sin limitarse, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes.

En la presente invención el término "aralquilo" se refiere a una cadena alifática en la que al menos uno de los hidrógenos se ha sustituido por un grupo arilo, con las acepciones anteriores. Como por ejemplo, pero sin limitarse, un grupo bencilo o fenetilo.

- 15 Los compuestos derivados de la L-idonojirimicina de fórmula (I) incluyen biciclos de seis miembros/cinco miembros no condensados que tienen un anillo de piperidina y otro de 1,3-oxazolidina, con una estructura de 6-oxanortropano. El átomo de nitrógeno es parte de una funcionalidad amida o pseudoamida. Por "funcionalidad pseudoamida", se define un grupo de fórmula general N-C(=X)Y, en el que X e Y representan heteroátomos que, dado el caso, portan sustituyentes de naturaleza variada como se ha definido en los párrafos anteriores. Son heteroátomos preferidos el nitrógeno (N), oxígeno (O) ó azufre (S). Ejemplos preferidos, aunque no limitantes, de grupos pseudoamida según
- 20 la presente invención son urea, tiourea o guanidina.

Una realización particular es el uso de la invención, donde Y está seleccionado del grupo compuesto por metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, fenilo y bencilo.

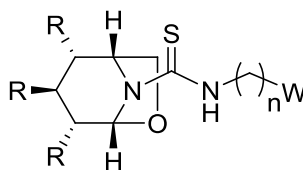
Una realización particular es el uso de la invención de un compuesto de fórmula (Ia)



- 25 **Ia**

donde R, X y R<sup>1</sup> han sido definidos anteriormente.

Una realización particular es el uso de la invención de un compuesto de fórmula (Ib)



- 30 **Ib**

- donde R, n y W han sido definidos anteriormente.

Una realización preferible es el uso de la invención donde las posiciones C-2-C-3 y C-4 están sustituidas por grupos hidroxilos (R = OH), dando lugar a un perfil de sustitución en el anillo de piperidina que coincide con el de la L-idosa tras superposición del anillo de seis miembros del biciclo con el anillo de piranosa del monosacárido, con el átomo de nitrógeno en la posición del átomo de oxígeno endocíclico del azúcar. Por tanto, una realización preferible es el

35 uso de la invención, donde R es OH.

Una realización particular es el uso de la invención, donde R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> están seleccionados del grupo compuesto por acetilo, benzoilo, propionilo, butanoilo, hexanoilo, pivaloilo, octanoilo, miristoilo, fenilo, bencilo, metilo, butilo, hexilo y octilo.

- 40 Una realización particular es el uso de la invención, donde R<sup>1</sup> está seleccionado del grupo compuesto por metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, fenilo y bencilo.

Una realización particular es el uso de la invención, donde dicho compuesto de fórmula (I) está seleccionado del grupo compuesto por:

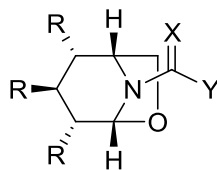
N-(N'-octil)tiocarbamoil-1,6-anhidro-L-idonojirimicina

N-[N'-(16-acetoxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina,

5 N-[N'-(16-hidroxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina y

N-[N'-(4-Adamantan-1-ilcarbonilaminobutil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina.

Una realización particular es una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto de fórmula (I)



10 donde R es un sustituyente igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

15 donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

X está seleccionado del grupo compuesto por O, NH y S,

Y está seleccionado del grupo compuesto por un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono, un grupo -OR<sup>1</sup>, -SR<sup>1</sup>, -NHR<sup>1</sup> y NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W,

20 donde R<sup>1</sup> es un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono,

n tiene un valor entre 3 y 18 y

W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano.

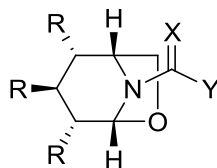
25 En la presente invención se entiende por "excipientes farmacéuticamente aceptables" a un diluyente, coadyuvante o portador con el que se administra el compuesto de fórmula (I). Se conocen diversos sistemas de administración, por ejemplo, liposomas, micropartículas o microcápsulas.

30 La composición farmacéutica de la invención puede contener compuestos que potencian la biodisponibilidad de los compuestos de fórmula (I), como ciclodextrinas comerciales, tal como α-, β- o γ-ciclodextrina (αCD, βCD o γCD), una β-ciclodextrina metilada (TRIMEB, DIMEB o RAMEB), una β-ciclodextrina hidroxipropilada (HP-βCD) o una βCD sulfobutilada (Captisol®), o una ciclodextrina modificada químicamente tal como un derivado de ciclodextrina que porta oligosacáridos biorreconocibles. Estas ciclodextrinas potencian la biodisponibilidad de los compuestos de fórmula (I).

35 Por tanto una realización particular es la composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por una α-, β- o γ-ciclodextrina, una β-ciclodextrina metilada (TRIMEB, DIMEB o RAMEB), una β-ciclodextrina hidroxipropilada (HP-βCD), una βCD sulfobutilada y una ciclodextrina modificada químicamente que porta oligosacáridos biorreconocibles.

40 Los ejemplos de la presente invención describen el uso de ciclodextrinas nativas o modificadas químicamente que permiten enmascarar el resto hidrófobo del inhibidor, mediante la formación de un complejo de inclusión, aumentando así su solubilidad en medios acuosos. Los complejos de inclusión resultantes mantienen o incluso potencian las actividades como inhibidor y chaperona del agente activo.

La realización más preferible de la invención es una composición farmacéutica, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto de fórmula (I)



donde R es un sustituyente igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

5 donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

X está seleccionado del grupo compuesto por O, NH y S,

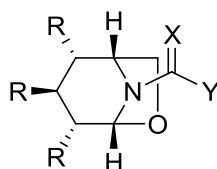
10 Y está seleccionado del grupo compuesto por un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono, un grupo -OR<sup>1</sup>, -SR<sup>1</sup>, -NHR<sup>1</sup> y NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W,

donde R<sup>1</sup> es un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono,

n tiene un valor entre 3 y 18 y

15 W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano.

Otra realización de la invención es un método de tratamiento de la enfermedad de Gaucher que comprende administrar a un sujeto humano una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I),



20 donde R es un sustituyente igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

25 donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

X está seleccionado del grupo compuesto por O, NH y S,

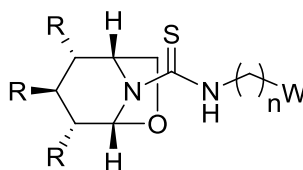
30 Y está seleccionado del grupo compuesto por un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono, un grupo -OR<sup>1</sup>, -SR<sup>1</sup>, -NHR<sup>1</sup> y NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W,

donde R<sup>1</sup> es un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono,

n tiene un valor entre 3 y 18 y

W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido.

35 Una realización preferible es un compuesto, en adelante compuesto de la invención, de fórmula (Ib)



donde R es un sustituyente, igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

- 5 donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

n tiene un valor entre 3 y 18 y

- 10 W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido.

Los derivados bicíclicos de L-idonojirimicina de fórmula (Ib) no han sido descritos en el estado de la técnica con anterioridad.

Una realización particular es el compuesto de la invención, seleccionado del grupo compuesto por:

- 15 N-[N'-(16-acetoxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina,  
 N-[N'-(16-hidroxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina y  
 N-[N'-(4-Adamantan-1-ilcarbonilaminobutil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina

Una realización particular es el uso del compuesto de la invención para la fabricación de un medicamento.

- 20 La invención proporciona un procedimiento para la síntesis química de los compuestos de fórmula (Ib) a partir de la D-glucosa, un azúcar natural fácilmente asequible, particularmente bien adaptado para generar diversidad molecular, permitiendo sintetizar compuestos con una amplia variedad de sustituyentes; lo que es de gran importancia para optimizar la actividad biológica y las propiedades farmacodinámicas.

Por tanto, una realización particular es un procedimiento de obtención del compuesto de la invención, que comprende

- 25 a) transformar D-glucosa en un derivado de 5-amino-5-desoxi-L-idofuranosa,  
 b) acoplar este derivado de amina con un isotiocianato de fórmula general SCN-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W o transformar el grupo amino en el derivado de 5-amino-5-desoxi-L-idofuranosa en grupo isotiocianato y acoplar posteriormente el derivado de 5-desoxi-5-isotiocianato-L-idofuranosa con una amina de fórmula general NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W,  
 c) transponer el anillo de furanosa a un ciclo de piperidina,  
 30 d) cerrar el anillo de cinco miembros no fusionado, dando lugar al sistema de 6-oxanortropano y  
 e) realizar manipulaciones sobre el o los grupos funcionales presentes en el sustituyente W, donde dichas manipulaciones están seleccionadas del grupo compuesto por saponificación de ésteres, la siliación, acilación o sulfonación de grupos hidroxilo o amino, la hidrólisis de carbamatos, la sustitución nucleofílica de grupos halógeno o grupos sulfonilo.

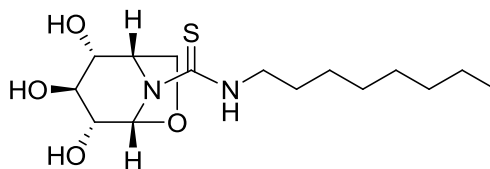
### 35 **MODOS DE REALIZACIÓN PREFERENTE**

Ejemplo 1. Síntesis de derivados bicíclicos de L-idonojirimicina.

#### 1.1. Materiales y procedimientos

- 40 En los documentos *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 7604-7614 y *Eur. J. Org. Chem.* 2004, 1803-1819 se describe la síntesis química de compuestos bicíclicos derivados de la L-idonojirimicina respondiendo a la fórmula (I) en los que X es O, S ó NH y R<sup>1</sup> se limita a un grupo alquilo lineal, arilo o aralquilo de 4 a 8 átomos de carbono que no porta ningún grupo funcional. Su síntesis puede llevarse a cabo a partir de D-glucosa o un derivado de D-glucosa comercialmente disponible mediante la secuencia de reacciones descrita en la bibliografía.

Un ejemplo de derivado bicíclico de L-idonojirimicina descrito en la bibliografía y utilizado en el contexto de esta invención es el compuesto **1**, que responde a fórmula (I) en la que X es S, Y es NHR<sup>1</sup> y R<sup>1</sup> es *n*-octilo.



5 **1**

Se ha realizado un estudio computacional utilizando como datos iniciales los datos de rayos X conocidos de la estructura cristalina de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana y los del compuesto **1**.

El estudio computacional realizado ha consistido en la generación y análisis del complejo formado por el compuesto **1** y la versión wild type (normal) de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana.

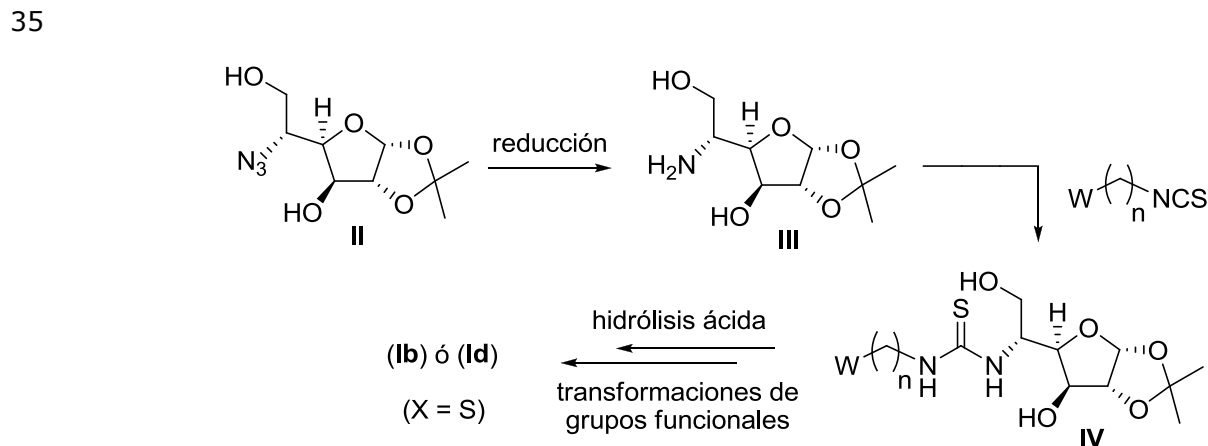
10 La preparación de la estructura del receptor ( $\beta$ -glucocerebrosidasa) para el docking consistió en la localización y caracterización físico-química del centro activo de la enzima; la preparación de la estructura de los ligandos consistió en el cálculo de la carga total de la molécula, que depende en cada caso de los distintos tipos de átomos que la componen y como están unidos entre si. En todos los casos se ha simulado la flexibilidad de los distintos ligandos mediante un proceso denominado "de anclaje y crecimiento". Este proceso se basa en la identificación y selección

15 de una sección rígida dentro de la estructura de cada ligando, y el posicionamiento y orientación óptimos de esta sección en el sitio de unión del receptor. A continuación, el resto de las secciones "flexibles" del ligando se unieron de modo consecutivo sobre la base de la sección rígida de anclaje y se orientaron según la generación de interacciones más favorables en el entorno del receptor. Como resultado se obtuvieron un número variable de conformaciones del ligando localizado en el sitio de unión del receptor y ordenadas según una función de evaluación interna, que refleja la interacción entre receptor y ligando. Los compuestos **2**, **3** y **4** (descritos más abajo) son los que presentaron las interacciones más favorables.

Por último, se llevó a cabo un proceso de equilibrado y refinamiento, en el que se estudió la estabilidad de la interacción y la estructura en el tiempo, mediante simulaciones de dinámica molecular.

25 Los compuestos de fórmula (Ib) se prepararon a partir de D-glucosa o un derivado de D-glucosa comercialmente disponible. La introducción de un grupo nitrogenado en posición C-5 puede conseguirse vía la 5-azido-5-desoxi-1,2-O-isopropiliden- $\alpha$ -L-idoofuranosa (**II**). Para la preparación de este intermedio sintético puede usarse el procedimiento reseñado por K. Dax et al. (*J. Carbohydr. Chem.* 1990, 9, 479-499), partiendo de D-glucufuranurono-6,3-lactona comercial. La reducción del grupo azido a amino proporciona el intermedio (**III**), que puede transformarse en derivados de tipo amida o pseudoamida mediante reacciones convencionales. A título de ejemplo, y sin que eso suponga una limitación, en el esquema 1 se representa la transformación en un derivado de tipo tiourea (**IV**) por

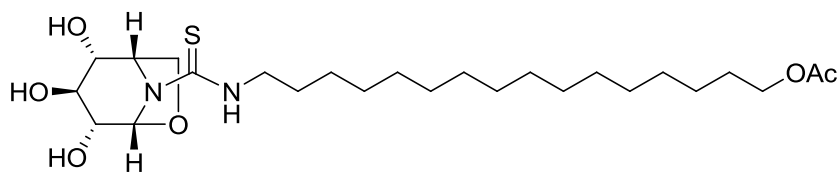
30 reacción con un isotiocianato de fórmula general SCN-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W. La hidrólisis del grupo 1,2-O-isopropilideno, por ejemplo mediante tratamiento con un ácido, conduce al sistema bicíclico de 6-oxanortropano de (Ib) en el que R y W están definidos y X es S. Esta etapa puede estar precedida o seguida de transformaciones sobre los diferentes hidroxilos del compuesto o sobre el propio grupo funcional W.



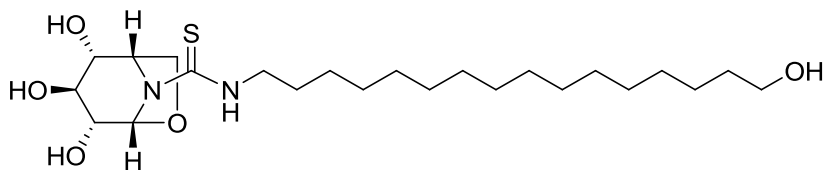
Esquema 1



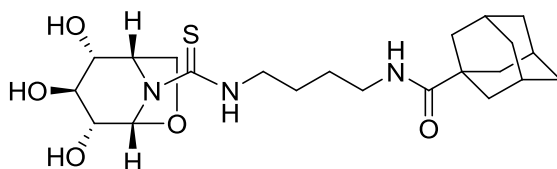
Algunos ejemplos de nuevos derivados bicíclicos de L-idoñojirimicina de fórmula (Ib) sintetizados químicamente y usados en esta invención se muestran a continuación (2-4):



2



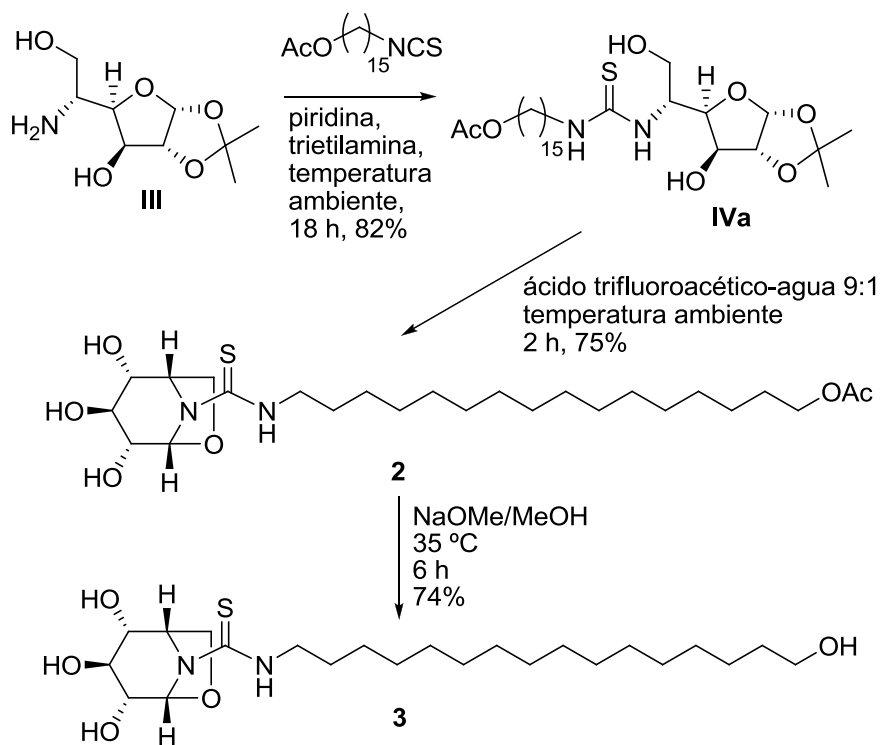
3



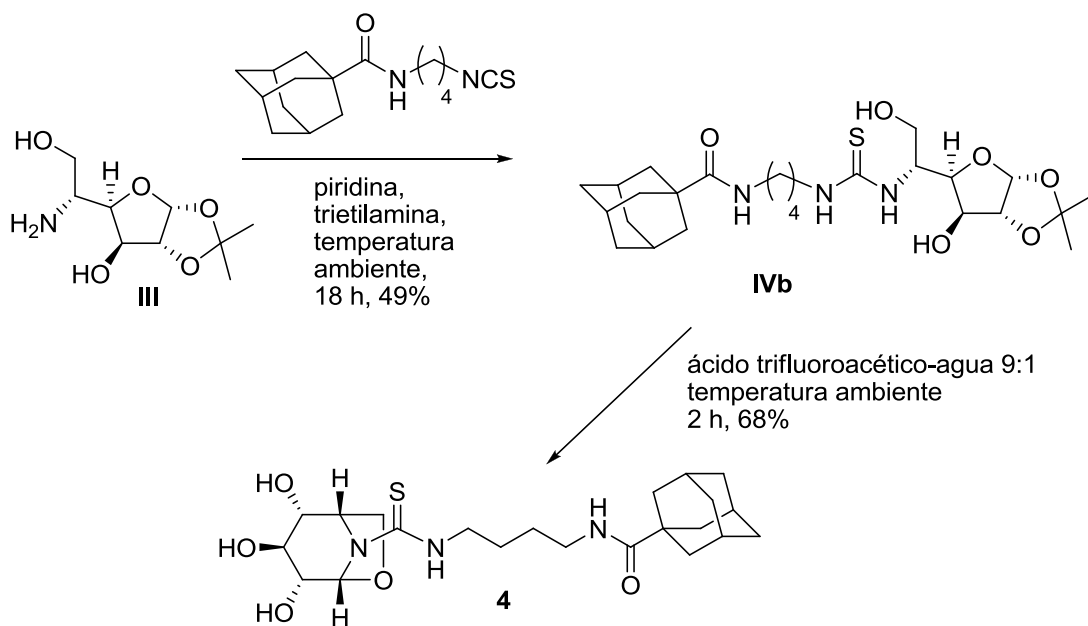
4

5

10 A título ilustrativo, en el esquema 2 se muestra una secuencia de síntesis que permite, a partir de (III), la obtención de los compuestos 2 y 3, y en el esquema 3 una secuencia de síntesis que permite la obtención del compuesto 4.



Esquema 2



### 1.2. Caracterización estructural de los compuestos 2, 3 y 4

Se realizó la caracterización estructural de los compuestos preparados y usados en esta invención mediante espectrometría de masas, rotación óptica, espectroscopía de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y análisis elemental. Se presentan a continuación algunos de los resultados.

**N-[N'-(16-acetoxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (2).**  $[\alpha]_{\text{D}} +35.1$  ( $c$  1, DCM/MeOH 1:1). RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz, 313 K,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  5:1):  $\delta$  5.64 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 1.45$  Hz, H-1), 4.75-4.72 (m, 1 H, H-5), 3.96 (d, 1 H,  $J_{6a,6b} = 8.0$  Hz, H-6a), 3.93 (t, 2 H,  $^3J = 6.7$  Hz,  $\text{CH}_3\text{COO-CH}_2$ ), 3.67-3.63 (m, 1 H, H-6b), 3.57-3.53 (m, H-4\*), 3.49-3.39 (m, 4 H, H-2, H-3, CS-NH- $\text{CH}_2$ ), 1.91 (s, 3 H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.55-1.45 (m, 4 H, 2 x NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 1.25-1.10 (m, 24 H, 12 x  $\text{CH}_2$ ); RMN- $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz, 313 K,  $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$  5:1):  $\delta$  179.2 (CS), 171.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 88.2 (C-1), 76.0 (C-3), 74.5 (C-2), 71.0 (C-4), 65.7 (C-6), 64.8 ( $\text{CH}_3\text{COO-CH}_2$ ), 58.7 (C-5), 45.8 (CS-NH- $\text{CH}_2$ ), 29.5-28.5 ( $\text{CH}_2$ ), 25.8 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ). Análisis calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ : C, 59.73; H, 9.22; N, 5.57; S, 6.38. Encontrado: C, 59.59; H, 9.98; N, 5.62; S, 6.35.

**N-[N'-(16-hidroxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (3).**  $[\alpha]_{\text{D}} +35.7$  ( $c$  0.7, DCM/MeOH 7:3). RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz, 313 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.54 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 1.5$  Hz, H-1), 4.63-4.57 (m, 1H, H-5), 3.83 (d, 1H,  $J_{6a,6b} = 8.0$  Hz, H-6a), 3.53-3.48 (m, 1H, H-6b), 3.45-3.40 (m, 1 H, H-4), 3.35-3.25 (m, 6 H, H-2, H-3, NH- $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 1.40-1.22 (m, 4 H, NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ ), 1.15-0.90 (m, 24 H, 12 x  $\text{CH}_2$ ); RMN- $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz, 313 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  88.2 (C-1), 75.7 (C-3), 74.2 (C-2), 70.8 (C-4), 65.4 (C-6), 61.9 ( $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 58.4 (C-5), 45.4 (NH- $\text{CH}_2$ ), 32.1-25.2 ( $\text{CH}_2$ ). AR-EM: calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$  483.2869. Encontrado: 483.2874.

**N-[N'-(4-Adamantan-1-ilcarbonilaminobutil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (4).**  $[\alpha]_{\text{D}} +44.2$  ( $c$  1, DCM/MeOH 1:1). RMN- $^1\text{H}$  (500 MHz, 313 K,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  10:1):  $\delta$  6.23 (b, 1 H, NH), 5.78 (s, 1 H, H-1), 4.85-4.80 (m, 1 H, H-5), 4.07 (d, 1 H,  $J_{6a,6b} = 8.0$  Hz, H-6a), 3.77-3.72 (m, 1 H, H-6b), 3.69-3.66 (m, 1H, H-4), 3.62-3.50 (m, 4 H, H-2, H-3, CS-NH- $\text{CH}_2$ ), 3.20-3.13 (m, 2 H, CO-NH- $\text{CH}_2$ ), 1.98 (s, 3 H, 3 x adamantil CH), 1.77 (s, 6 H, 3 x adamantil  $\text{CH}_2$ ), 1.72-1.43 (m, 10 H, 3 x adamantil  $\text{CH}_2$ , NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ); RMN- $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz, 313 K,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  179.6 (CS), 178.9 (CO), 88.4 (C-1), 75.9 (C-3), 74.6 (C-2), 71.0 (C-4), 66.1 (C-6), 58.6 (C-5), 45.0 (CS-NH- $\text{CH}_2$ ), 40.7 (adamantil C cuaternario), 39.2 (adamantil C), 38.9 (CO-NH- $\text{CH}_2$ ), 36.5 (adamantil C), 28.2 (adamantil C), 27.1 (CO-NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ), 25.3 (CS-NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$ ). EM-ESI:  $m/z$  452.2 ([M-H] $^-$ ). Análisis calculado para  $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : C, 58.82; H, 8.37; N, 8.95; S, 6.83. Encontrado: C, 58.53; H, 7.70; N, 8.97; S, 6.89.

**Ejemplo 2.** Preparación de complejos de inclusión entre derivados bicíclicos de L-idonojirimicina y ciclodextrinas.

La presencia de un resto hidrófobo en los derivados bicíclicos de L-nojirimicina de la invención da como resultado, en algunos casos, solubilidades limitadas en medios acuosos. Para superar dicha limitación, los solicitantes encontraron particularmente útil la preparación de complejos de inclusión con ciclodextrinas o ciclodextrinas modificadas químicamente. Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que conforman una cavidad que puede aceptar moléculas huésped complementarias de tamaño apropiado. La preparación de dichos complejos de inclusión implica la preparación de una disolución en agua tanto de la ciclodextrina como del inhibidor, en una

proporción relativa que puede variar de 1:9 a 9:1, seguido de liofilización. Como vehículo ciclodextrina pueden usarse las  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ CD nativas, los derivados metilados, hidroxipropilados o sulfobutilados comercialmente disponibles (DIMEB, TRIMEB, RAMEB, HPBCD, Captisol®) u otras CD modificadas químicamente tales como las reseñadas en las solicitudes de patente WO 9733919 y WO2004087768. El vehículo ciclodextrina preferido según esta invención es  $\beta$ CD. Tras la formación de los complejos de inclusión correspondientes, aumentó significativamente la solubilidad acuosa de los inhibidores de la invención, con potenciaciones de la solubilidad de hasta 100 veces.

### Ejemplo 3. Mutagénesis dirigida del gen *GBA1* y obtención de transfectantes estables en células COS-7.

El cDNA del gen de glucocerebrosidasa humana (*GBA1*) se obtuvo de una librería HeLa y se subclonó en el vector de expresión pCR®3.1 (Invitrogen) utilizando el kit Eukaryotic TA Cloning® kit-Unidirectional (Invitrogen). Este vector contiene una región promotora, un origen SV40 y señales de poliadenilación. Como método de purificación del plásmido, que contenía el cDNA, se empleó el High Pure Plasmid Isolation Kit<sub>(Roche)</sub> basado en la lisis alcalina y en la introducción de un agente caotrópico que permite que el DNA plasmídico se una selectivamente a las fibras de vidrio que contienen las minicolumnas del kit.

Los insertos de cDNA del gen *GBA1* comprenden un fragmento de 1.577 pb, extendiéndose desde 16 nucleótidos en dirección 5' del segundo ATG hasta 10 nucleótidos en dirección 3' del codón de parada.

Los cDNAs mutados del gen *GBA1* que se querían obtener eran los que contenían las siguientes mutaciones: V15M, M123T, P266L, L336P, S364R, N370S, L444P y S465del.

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo con la enzima Pfu Turbo DNA polimerasa (Stratagene), que replicó ambas cadenas del plásmido con alta fidelidad y sin desplazar los oligonucleótidos cebadores sintéticos que contenían la mutación deseada. Se utilizaron los oligonucleótidos descritos en Alfonso et al., Expression and functional characterization of mutated glucocerebrosidase 2 alleles causing Gaucher disease in Spanish patients, *Blood Cells Mol. Dis.*, 2004 Jan-Feb;32(1):218-25.

Los oligonucleótidos cebadores<sub>(Invitrogen)</sub>, cada uno complementario a una de las cadenas del vector, se extendieron durante el ciclo de elongación con la ayuda de la Pfu Turbo DNA polimerasa<sub>(Stratagene)</sub>. Cuando los cebadores se incorporaron, se generó un plásmido mutante y mellado. El producto de la amplificación se trató con la enzima de restricción *DpnI*<sub>(Fermentas)</sub>, endonucleasa específica para el DNA metilado y hemimetilado (cuya secuencia diana es 5' – GA/TC – 3'). Con ello, se digirió el DNA parental y se seleccionó el DNA sintetizado que contenía la mutación. El producto de DNA obtenido, que había incorporado la mutación, se transformó en la cepa JM109 de bacterias *E. coli*.

Durante el proceso de replicación de la mutagénesis dirigida se incluyeron dos muestras control:

(i) control negativo de replicación que contenía todos los reactivos indicados, excepto la enzima Pfu Turbo DNA polimerasa<sub>(Stratagene)</sub>. En este caso, no se produjo la reacción de polimerización, no obteniéndose, por tanto, producto;

(ii) control del funcionamiento de la reacción: para saber si la extensión se había producido, con una reacción de amplificación que se conocía que funciona. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa<sub>(Genotek)</sub> al 1% con 10  $\mu$ L de cada muestra (incluidos los controles) y 3  $\mu$ L de tampón de aplicación (Azul bromofenol<sub>(Roesder)</sub> 0,25%, Xilenocianol<sub>(Quantum)</sub> 0,25%, Ficoll 400 <sub>(Farmacia)</sub> 25%), empleando el marcador de pesos moleculares  $\lambda$  DNA/Hind III<sub>(Invitrogen)</sub>. La aparición de una banda de DNA con el tamaño adecuado indicaba que la replicación había funcionado, aunque no aseguraba que la mutación se hubiera producido, por lo que todas las muestras fueron secuenciadas en un equipo CEQ 8000 Genetic Analysis System sequence<sub>(Beckman Coulter Inc.)</sub> para confirmar la presencia de las mutaciones deseadas, la ausencia de mutaciones no deseadas que podrían haberse introducido en el proceso de la mutagénesis y, la orientación correcta del cDNA del gen *GBA1*.

Posteriormente, se procedió al aislamiento y purificación de DNA plasmídico utilizando el kit Qiagen Plasmid Maxi Kit<sub>(Qiagen)</sub>.

Los transfectantes a obtener eran los que contenían las siguientes mutaciones: V15M, M123T, P266L, L336P, S364R, N370S, L444P y S465del.

Se cultivaron células COS-7 en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)<sub>(Gibco)</sub>, suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino (SFB)<sub>(Gibco)</sub> y una mezcla de antibióticos de penicilina 100 U/mL/estreptomina<sub>(Gibco)</sub> 100  $\mu$ g/mL, a 37°C en presencia de aire humidificado al 5% CO<sub>2</sub>. La línea celular COS-7 procede de una línea tumoral que deriva del riñón del mono verde africano por transfección con el virus del simio "SV 40" y contiene el antígeno T de este virus. Debido a su naturaleza neoplásica, estas células presentan un elevado coeficiente de replicación celular, lo que permite conseguir gran cantidad de células en muy poco tiempo. El origen de replicación del vector pCR®3.1 está constituido por una secuencia de 150 nt que reconoce específicamente al antígeno T.

Veinticuatro horas antes de realizar las transfecciones, se dispusieron 450.000 células COS-7 en una placa de 60 mm, con el objeto de que el día de la transfección la confluencia celular se aproximara a un 70 u 80% de la superficie (considerada confluencia óptima para las células COS-7). Las células COS-7 cultivadas en medio DMEM<sub>(Gibco)</sub> con 10% SFB<sub>(Gibco)</sub> se transfectaron con 2 µg de DNA plasmídico (plásmidos pCR@3.1-*GBA1*) utilizando el kit Lipofectamine 2000<sub>(Invitrogen)</sub> o usando DEAE-dextrano<sub>(Sigma)</sub> seguido de tratamiento de choque con DMSO<sub>(Sigma)</sub> e incubación con cloroquina<sub>(Sigma)</sub>. Para que se incorporase el plásmido, se incubaron las mezclas durante 2 días a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> sin selección. Pasado este tiempo se eliminó el medio, se lavó dos veces con tampón fosfato salino (PBS)<sub>(Gibco)</sub>, y se añadió nuevo medio suplementado conteniendo 750 µg/mL de Geneticina (G418)<sub>(Sigma)</sub>. Los clones transfectados se seleccionaron por su resistencia a G418<sub>(Sigma)</sub>. Se mantuvo la selección hasta que la mayoría de las células se fueron muriendo mayoritariamente, ya que solo unas pocas habían incorporado el plásmido, y llegó un momento en que sobre la placa vacía crecían colonias de células. Cuando estos clones fueron visibles se lavó la placa dos veces con PBS<sub>(Gibco)</sub> y, una a una, las placas se tripsinizaron con 10 µL de tripsina<sub>(Gibco)</sub>, y cada uno de los clones se fue depositando en un placa de 96 pocillos con medio DMEM<sub>(Gibco)</sub> con 20% SFB<sub>(Gibco)</sub> + 750 µg/mL G418 (Sigma), sin mezclarlas en ningún momento, para mantener los clones aislados. Se dejaron crecer, y se les fue cambiando el medio, siempre con el antibiótico de selección. Cuando se observaba que algún pocillo progresaba, es decir, había aumentado significativamente el número de células, se tripsinizaban y se subcultivaban en placas de 24 pocillos. Se continuó seleccionando, y llegado el momento se subcultivó a una placa de 35 mm de diámetro; de ahí, a una placa de 60 mm de diámetro y, después a una placa de 100 mm de diámetro. Cuando la selección fue selectiva, se obtuvieron las líneas celulares transfectadas de modo estable y se bajó la concentración del antibiótico G418<sub>(Sigma)</sub> a 500 µg/mL, para aumentar, así la velocidad de crecimiento.

La presencia del gen transfectado en los clones seleccionados se analizó por Northern blot.

Para el mantenimiento de las células se empleo DMEM<sub>(Gibco)</sub> suplementado con 10% SFB<sub>(Gibco)</sub> y 1% mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina<sub>(Gibco)</sub>. Se añadió al medio 500 µg/mL del antibiótico G418<sub>(Sigma)</sub> para mantener los clones. El medio se cambió cada 2/3 días.

Parte de las células obtenidas se congelaron mientras que las otras se utilizaron para llevar a cabo los experimentos.

Para la congelación de células, se lavaron las células dos veces con PBS<sub>(Gibco)</sub>, se tripsinizaron y se contaron. Aproximadamente 1 millón de células fueron disueltas en un medio de congelación que contenía 70% DMEM<sub>(Gibco)</sub> sin suplementar, 20% SFB<sub>(Gibco)</sub> y 10% DMSO<sub>(Sigma)</sub>. Posteriormente, los criotubos conteniendo las células fueron congelados a -80°C durante 24 horas y transcurrido ese tiempo, los criotubos se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido.

#### Ejemplo 4. Ensayos de actividad de glucocerebrosidasa en células transfectadas con y sin el compuesto 1

Cuatro o cinco días antes de comenzar el experimento se dejaron de seleccionar con Geneticina<sub>(Sigma)</sub> los clones de los transfectantes que contenían las mutaciones V15M, L336P, P266L, S465del, N370S y L444P.

Se emplearon placas de cultivo de 6 pocillos, tres pocillos por cada concentración de ensayo. También se emplearon 3 pocillos para crecimiento de las células sin adición de compuesto 1. El tratamiento de las células con el compuesto 1 duró 6 días. Durante este tiempo no se añadió el antibiótico de selección.

Así, se sembraron las células transfectadas con los plásmidos que portaban los cDNAs mutados de *GBA1* a una cantidad inicial de 50.000 células COS-7 por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron 24 h en el incubador a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se les añadió al medio las diferentes moléculas de ensayo a concentraciones de 5 y 10 µM. Se incubaron las células durante 72 h a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Trascrido este tiempo, se lavó con PBS<sub>(Gibco)</sub> dos veces y se añadió nuevo medio DMEM<sub>(Gibco)</sub> suplementado y el compuesto 1 a las mismas concentraciones que inicialmente. Se dejaron las células en el incubador a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 72 h más. Posteriormente se retiró el medio, se lavó con PBS<sub>(Gibco)</sub> dos veces y se añadió PBS<sub>(Gibco)</sub> frío para proceder a levantar las células con un rascador. A continuación, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y se congeló el precipitado a -80°C hasta su procesamiento.

Los precipitados se disolvieron en 100 µL taurocolato<sub>(Sigma)</sub> al 1% y se sonicaron. Los niveles de proteína celular total se determinaron mediante espectrofotometría empleando el equipo NanoVue<sub>(GE Healthcare)</sub>. Los niveles de la actividad de la β-glucosidasa ácida de las proteínas mutadas se monitorizaron a través de un ensayo enzimático usando el sustrato sintético marcado con fluorescencia, 4-metil-umbeliferil-β-D-glucopiranosido (4MU-Glc)<sub>(Sigma)</sub>. Las mezclas finales de reacción (100 µL) contenían una disolución tampón 0,2 M citrato/fosfato<sub>(Sigma)</sub>, pH 5; 0,2% taurodeocolato sódico<sub>(Sigma)</sub>, 0,1% Tritón X-100<sub>(Sigma)</sub> y 10 mM 4MU-Glc (Sigma). Las condiciones de incubación fueron 37°C durante 75 minutos y la reacción se paró por incremento del pH adicionando 2 mL de disolución tampón de 0,25 M glicina<sub>(Serva)</sub>-NaOH<sub>(Carlo-Erba)</sub>, pH 10,8. La cantidad de 4-metil-umbeliferona liberada se analizó con un espectrofluorímetro RF-1501<sub>(Shimadzu)</sub> a una longitud de onda de excitación de 365 nm y a una longitud de onda de emisión de 450 nm.

Se realizó una recta de calibrado de 4-metil-umbeliferona a concentraciones conocidas (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5; 5,0; 6,2; 7,5 y 8,8 nmoles) para poder interpolar las medidas de fluorescencia de los transfectantes obtenidas experimentalmente.

Las actividades de los transfectantes fueron expresadas en nmoles por hora y por mg de proteína celular y se calculó la proporción de la actividad enzimática de los transfectantes con/sin fármaco. Se definió una unidad de actividad enzimática como nmoles de 4-metilumbeliferona liberados por hora. Las actividades enzimáticas se mostraron normalizadas a la actividad de las células no tratadas del mismo tipo y expresadas como razones de cambio. Los valores mostrados fueron los resultados de triplicados, por lo menos, de dos experimentos diferentes. Se produjo incremento de la actividad enzimática a la menor concentración (5  $\mu$ M) en la línea *wild type* (6,07 veces) y en la transfectada con la mutación P266L (14,0 veces) y a concentración de 10  $\mu$ M en la transfectada con S465del (2,37 veces) (Tabla 1).

La mutación P266L es considerada una mutación grave, ya que en homocigosidad la hemos encontrado en un paciente con el tipo 2 de la enfermedad de Gaucher, el cambio de prolina por leucina desestabiliza una alfa hélice en el dominio III. La mutación S465del se encuentra localizada en el dominio II cerca del sitio carboxilo terminal, este dominio junto con el I están localizados en el mismo lado del dominio *TIM barrel* en el cual se encuentra el lugar catalítico de la enzima. El residuo serina 465 que, en este caso, está delecionado, se encuentra localizado en un giro entre dos láminas beta. Se calcula que la deleción produce la desestabilización nativa de la enzima. La mutación V15M se encuentra localizada en el denominado dominio I cerca del sitio amino terminal y del sitio de glicosilación. El dominio I y el II están situados en el mismo lado del extenso dominio *TIM barrel*.

Tabla 1. Incrementos de actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa ácida en células COS -7 transfectadas con diferentes mutaciones incubadas con el compuesto 1.

	WT	V15M	L336P	P266L	S465del	N370S	L444P
<b>Concentración Compuesto 1</b>							
5 $\mu$ M	6,07	1,05	0,97	14,0	1,71	0,91	1,02
10 $\mu$ M	0,68	1,17	1,04	0,55	2,37	1,07	1,08

Ejemplo 5. Ensayos de actividad de glucocerebrosidasa en células transfectadas, con y sin, los compuestos 2, 3 y 4

Cuatro o cinco días antes de comenzar el experimento se dejaron de seleccionar con Geneticina (Sigma) los clones de los transfectantes que contenían las mutaciones N370S y L444P.

Se realizó un cultivo de las células transfectadas se realizó de acuerdo a lo descrito en el ejemplo 4.

Los experimentos se han realizado en paralelo con cultivos incubados con Ambroxol® en las mismas condiciones. Esta droga se ha demostrado capaz de incrementar la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucosidasa ácida en fibroblastos de pacientes homocigotos para las mutaciones N370S y L444P. Los resultados obtenidos (mostrados en Tabla 2) demuestran incremento en la actividad enzimática a las diferentes concentraciones entre 1,96 y 4,98 veces.

La mutación L444P en homocigosidad se asocia con fenotipos neuronopáticos graves. Se encuentra localizada en una posición enterrada en un giro que conecta la hebra de proteína a los ejes de dos láminas beta. La diferencia de tamaño entre la leucina y la prolina predice la desestabilización de la proteína.

La mutación N370S, la más frecuente entre la población que da lugar a un fenotipo leve, se encuentra situada en el dominio III, la asparagina esta situada a 8 Amstrongs del aspártico 340 situado en el sitio catalítico y en la parte interior de la alfa hélice que se sitúa entre los aminoácidos 358-372. El modo en que la mutación N370S desestabiliza a la proteína es dudoso.

Tabla 2. Incrementos de actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa ácida en células COS-7 transfectadas incubadas con los diferentes compuestos.

Transfectantes (concentración del compuesto)	Ambroxol®	Comp 2	Comp 3	Comp 4
N370S (2 $\mu$ M)	2,35	2,94	2,93	3,06
N370S (5 $\mu$ M)	2,01	2,77	2,67	2,48
N370S (10 $\mu$ M)	2,06	2,73	2,67	2,52

## ES 2 436 378 B1

L444P (2 $\mu$ M)	2,40	2,10	3,62	3,19
L444P (5 $\mu$ M)	2,41	2,23	3,71	3,86
L444P (10 $\mu$ M)	2,98	1,96	3,23	4,98

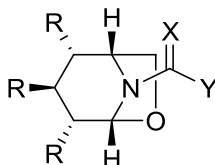
### Ejemplo 6. Ensayo de actividad inhibitoria (CI50)

5 Se evaluaron los CI50 de las moléculas 2, 3, 4. Se realizó un cultivo de las células transfectadas se realizó de acuerdo a lo descrito en el ejemplo 4. Se añadió al medio las diferentes moléculas de ensayo a concentraciones variadas de las moléculas de 0; 1,25; 2, 3,75; 7,5; 15; 30 y 60  $\mu$ M.

10 Las actividades de la proteína silvestre fueron expresadas en nmoles por hora y por mg de proteína celular para cada una de las moléculas y de las concentraciones empleadas. Se efectuó una representación de las actividades obtenidas experimentales frente a la concentración de fármaco. De esta gráfica se obtuvieron los CI50 de los compuestos analizados. Los resultados que obtuvimos para los CI50 fueron: para el compuesto **2**, 11  $\mu$ M; para el compuesto **3**, 6  $\mu$ M; y para el compuesto **4**, 24  $\mu$ M.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I)



5 donde R es un sustituyente igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

10 donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

X está seleccionado del grupo compuesto por O, NH y S,

Y está seleccionado del grupo compuesto por un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono, un grupo -OR<sup>1</sup>, -SR<sup>1</sup>, -NHR<sup>1</sup> y NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W,

donde R<sup>1</sup> es un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono,

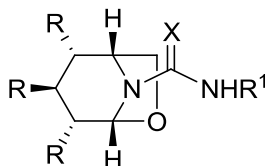
15 n tiene un valor entre 3 y 18,

W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido,

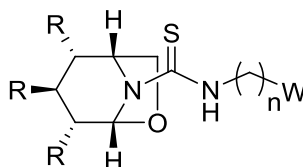
para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano.

20 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que Y está seleccionado del grupo compuesto por metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, fenilo y bencilo.

3. Uso según la reivindicación 1 de un compuesto de fórmula (Ia)



4. Uso según la reivindicación 1 de un compuesto de fórmula (Ib)



25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que R es OH.

6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> están seleccionados del grupo compuesto por acetilo, benzoilo, propionilo, butanoilo, hexanoilo, pivaloilo, octanoilo, miristoilo, fenilo, bencilo, metilo, butilo, hexilo y octilo.

30 7. Uso según una de las reivindicaciones 1 ó 3, caracterizado por que R<sup>1</sup> está seleccionado del grupo compuesto por metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, fenilo y bencilo.

8. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que dicho compuesto de fórmula (I) está seleccionado del grupo compuesto por:

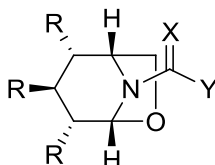
N-(N'-octil)tiocarbamoil-1,6-anhidro-L-idonojirimicina

N-[N'-(16-acetoxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina,

- 5 N-[N'-(16-hidroxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina y

N-[N'-(4-Adamantan-1-ilcarbonilaminobutil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina

9. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I)



- 10 donde R es un sustituyente igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

- 15 donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

X está seleccionado del grupo compuesto por O, NH y S,

Y está seleccionado del grupo compuesto por un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono, un grupo -OR<sup>1</sup>, -SR<sup>1</sup>, -NHR<sup>1</sup> y NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-W

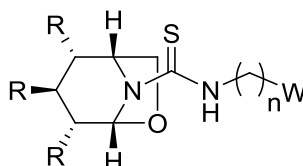
donde R<sup>1</sup> es un grupo alquilo o arilo, lineal o ramificado, de 1 a 18 átomos de carbono,

- 20 n tiene un valor entre 3 y 18 y

W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tior, acilamino y carboxamido, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano.

- 25 10. La composición farmacéutica según la reivindicación 9, caracterizada por que comprende un compuesto seleccionado entre el grupo compuesto por una α-, β- o γ-ciclodextrina, una β-ciclodextrina metilada (TRIMEB, DIMEB o RAMEB), una β-ciclodextrina hidroxipropilada (HP-βCD), una βCD sulfobutilada y una ciclodextrina modificada químicamente que porta oligosacáridos biorreconocibles.

11. Un compuesto de fórmula (Ib)



- 30 donde R es un sustituyente, igual o diferente en cada uno de los casos, y que está seleccionado del grupo compuesto por H, un grupo hidroxilo (-OH) y un grupo OR<sup>2</sup>,

donde R<sup>2</sup> está seleccionado del grupo compuesto por un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo o arilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono, un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un grupo acetamido (NHAc) y un grupo NHR<sup>3</sup>,

- 35 donde R<sup>3</sup> es un grupo acilo alifático o aromático, lineal o ramificado de 2 a 18 átomos de carbono, un grupo alquilo lineal o ramificado de 1 a 14 átomos de carbono,

n tiene un valor entre 3 y 18 y



W es un grupo sustituido o no sustituido seleccionado del grupo compuesto por hidroxilo, halógeno, amino, amido, urea, tiourea, guanidina, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino y carboxamido.

12. El compuesto según la reivindicación 11, seleccionado del grupo compuesto por:
- 5 N-[N'-(16-acetoxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonójirimicina,  
(N-[N'-(16-hidroxihexadecil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonójirimicina y  
N-[N'-(4-Adamantan-1-ilcarbonilaminobutil)tiocarbamoil]-1,6-anhidro-L-idonójirimicina
13. Uso de un compuesto según una de las reivindicaciones 11 ó 12 para la fabricación de un medicamento.
14. Un procedimiento de obtención de un compuesto según una de las reivindicaciones 11 ó 12, que comprende
- 10 a) transformar D-glucosa en un derivado de 5-amino-5-desoxi-L-idofuranosa,  
b) acoplar este derivado de amina con un isotiocianato de fórmula general  $\text{SCN}-(\text{CH}_2)_n\text{-W}$  o transformar el grupo amino en el derivado de 5-amino-5-desoxi-L-idofuranosa en grupo isotiocianato y acoplar posteriormente el derivado de 5-desoxi-5-isotiocianato-L-idofuranosa con una amina de fórmula general  $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_n\text{-W}$ ,  
c) transponer el anillo de furanosa a un ciclo de piperidina,  
d) cerrar el anillo de cinco miembros no fusionado, dando lugar al sistema de 6-oxanortropano y
- 15 e) realizar manipulaciones sobre el o los grupos funcionales presentes en el sustituyente W, donde dichas manipulaciones están seleccionadas del grupo compuesto por saponificación de ésteres, la sililación, acilación o sulfonación de grupos hidroxilo o amino, la hidrólisis de carbamatos, la sustitución nucleofílica de grupos halógeno o grupos sulfonilo.