

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de julio de 2014 (03.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/102417 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/4365 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
C07D 513/04 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2013/070883

(22) Fecha de presentación internacional:
17 de diciembre de 2013 (17.12.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201232024
26 de diciembre de 2012 (26.12.2012) ES

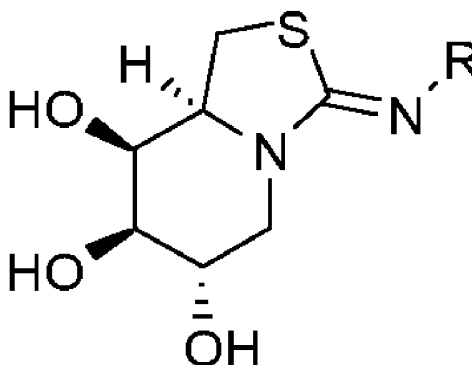
(71) Solicitantes: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación, Pabellón Brasil - Paseo de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **INTERNATIONAL UNIVERSITY OF HEALTH AND WELFARE (IUHW)** [JP/JP]; 2600-1 Kitakanemaru, Otawara City, Tochigi 324-8501 (JP). **NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOTTORI UNIVERSITY** [JP/JP]; 101, Koyamacho-minami 4-cromo, Tottori-shi, Tottori 6808550 (JP).

(72) Inventores: **GARCÍA FERNÁNDEZ, José Manuel**; Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ), Américo Vespucio, s/n, Isla de la Cartuja, E-41092 Sevilla (ES). **ORTIZ MELLET, Carmen**; Unversidad de Sevilla, Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación, Pabellón Brasil - Paseo de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **EIJI, Nanba**; National University Corporation Tottori University, 101, Koyamacho-minami 4-cromo, Tottori-shi, Tottori 6808550 (JP). **KATSUMI, Higaki**; National University Corporation Tottori University, 101, Koyamacho-minami 4-cromo, Tottori-shi, Tottori 6808550 (JP). **YOSHIYUKI, Suzuki**; International University of Health and Welfare (IUHW), 2600-1 Kitakanemaru, Otawara City, Tochigi 324-8501 (JP).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF BICYCLIC DERIVATIVES OF 1-DEOXYGALACTONOJIRIMYCIN IN THE PRODUCTION OF A MEDICAMENT FOR THE TREATMENT OF DISEASES ASSOCIATED WITH MUTANT HUMAN LYSOSOMAL GALACTOSIDASE β -ENZYMES

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



(57) Abstract: The invention relates to a use of a compound of formula (I), or one of the salts thereof, wherein: R represents a linear or branched aliphatic chain selected from the group consisting of a C₁-C₁₆ saturated hydrocarbonated chain and a C₂-C₁₆ unsaturated hydrocarbonated chain, in the production of a medicament for the treatment of diseases associated with mutant lysosomal β -galactosidase enzymes in humans.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un uso de un compuesto

[Continúa en la página siguiente]

WO 2014/102417 A1



- (74) **Mandatario:** UNGRIA LÓPEZ, Javier; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

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 C₁-C₁₆, y cadena hidrocarbonada insaturada C₂-C₁₆, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con enzimas β-galactosidasas lisosómicas mutantes en humanos.

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

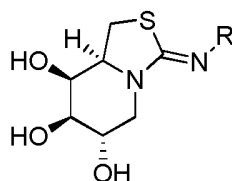
5

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 β -glucosidasa ácida lisosómica.

El objeto de la invención es el 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_1 - C_{16} , y cadena hidrocarbonada insaturada
20 C_2 - C_{16} , para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades relacionadas con β - enzimas galactosidasas lisosómicas mutantes humanas.

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
30 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.

Dentro de este tipo de patologías de almacenamiento lisosómico, la deficiencia hereditaria de β -galactosidasa ácida lisosómica (β -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 β -galactosa terminales en los tejidos y orina. El gangliósido GM1 y su derivado asiático 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 β -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 β -galactosidasa ácida 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.

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 inhibidora significativa frente a glicosidasas. En algunos casos, se ha demostrado que estos compuestos usados a concentraciones subinhibidoras actúan como chaperonas de β -galactosidasa mutantes responsables de la enfermedad de gangliosidosis GM1 y de Morquio B (US 2006/0100241; WO2004/037373). 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 β -glucocerebrosidasa, α -galactosidasa o β -galactosidasa (WO2010046517A1; 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- β -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 β -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.

5

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

10

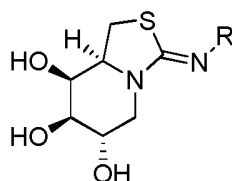
Si bien se han descrito tanto iminoazúcares como iminoazúcares sp^2 con actividad como chaperonas farmacológicas frente a mutantes de la β -galactosidasa asociados a las enfermedades de gangliosidosis GM1 y de Morquio B conteniendo en su estructura un anillo de piperidina polihidroxilado con un patrón 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), 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.

20

Descripción detallada de la invención

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

25



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} ,

30

para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento de la deficiencia de la forma activa de la enzima β -galactosidasa en el ser humano, que se relaciona con enfermedades tales como la gangliosidosis GM1 y la enfermedad de Morquio B.

5 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 β -galactosidasa lisosomal capaces de actuar como chaperonas farmacológicas a
10 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,
15 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 β -galactosidasa, tales como NOEV, no mostraron sin embargo ninguna actividad.

20

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.

25 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
30 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
35 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 β -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 β -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 β -galactosidasa lisosomal humana por 5N,6S-(N'-butiliminometilideno)-6-tio-1-desoxigalactonojirimicina (6S-NBI-DGJ).

En primer lugar, se determinaron las actividades de varias glicosidasas lisosomales humanas, en concreto de β -glucosidasa (β -glucocerebrosidasa), α -glucosidasa, β -galactosidasa, α -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). Brevemente, se incubaron 4 μ L de lisados celulares a 37 °C con 8 μ 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.

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 H₂O enfriada con hielo (10⁶/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 β -galactosidasa, con un valor de concentración necesaria para alcanzar un

50% de inhibición (IC_{50}) de 32 μ M. A esta concentración, la actividad del resto de enzimas lisosomales humanas determinadas se afectó en menos de un 2%.

Ejemplo 2

- 5 Estabilización in vitro de β -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 β -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 β -galactosidasa como en el ejemplo anterior. 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-DG entre 20 μ M y 160 μ M.

20

Ejemplo 3

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

25 Se cultivaron fibroblastos cutáneos derivados de personas sanas y de pacientes con deficiencia de la β -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 (estreptomomicina 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 ejemplo1. 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,

35

G190D/G190D, R201C/R201C, G438E/G438E y R457Q/R457Q a concentraciones 20 μ M (incremento entre 1.3 y 3 veces) y 80 μ M (incremento entre 2 y 5 veces). La única excepción en esta serie fue la enzima con la mutación R59H/R59H.

5 Ejemplo 4

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

10 Células COS7 se transfectaron con plásmidos conteniendo ADN complementario (cADN) de la β -galactosidasa silvestre (WT) y de mutantes asociados a enfermedades de deficiencia de la β -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
15 ausencia o en presencia de 6S-NBI-DGJ a concentraciones 20 μ M y 80 μ M, tras lo cual se determinó la actividad de la β -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,
20 K346N, S434L, G438E, R482H, D491Y, E632G, D640E. Los datos correspondientes a estas 24 mutaciones, en comparación con la β -galactosidasa silvestre (WT) y con una enzima de referencia irrelevante (mock) se recogen en la Figura 1.

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

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,
30 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.

Es importante destacar que no existe hasta el momento ningún otro compuesto que haya
35 demostrado comportarse como activador de β -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
5 ampliamente estudiado como activador de β -galactosidasa mutante, no mostró ninguna actividad en un ensayo realizado en paralelo.

Ejemplo 5

Ausencia de toxicidad del compuesto 6S-NBI-DGJ

10

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 μ M de este compuesto.

15

Ejemplo 6

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

20

La deficiencia de la β -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 μ M) 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.

30

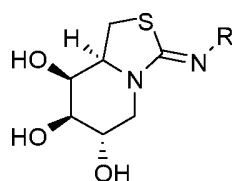
Ejemplo 7

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

Para obtener una prueba de concepto de la capacidad del compuesto 6S-NBI-DGJ para atravesar la membrana hematoencefálica, así como para activar la β -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 β -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 β -galactosidasa mutante y produce una mejora significativa en la patología cerebral asociada a la deficiencia de la β -galactosidasa.

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 C₁-C₁₆, y cadena hidrocarbonada insaturada

10 C₂-C₁₆,

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 de fórmula general (I) según la reivindicación 1, caracterizado porque R es una cadena hidrocarbonada saturada C₁-C₁₆.

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 fórmula general (I) según la reivindicación 3, caracterizado porque dicho compuesto es 5*N*,6*S*-(*N*¹-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.

30

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.

5

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.

10

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)

15

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

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

20

FIGURAS

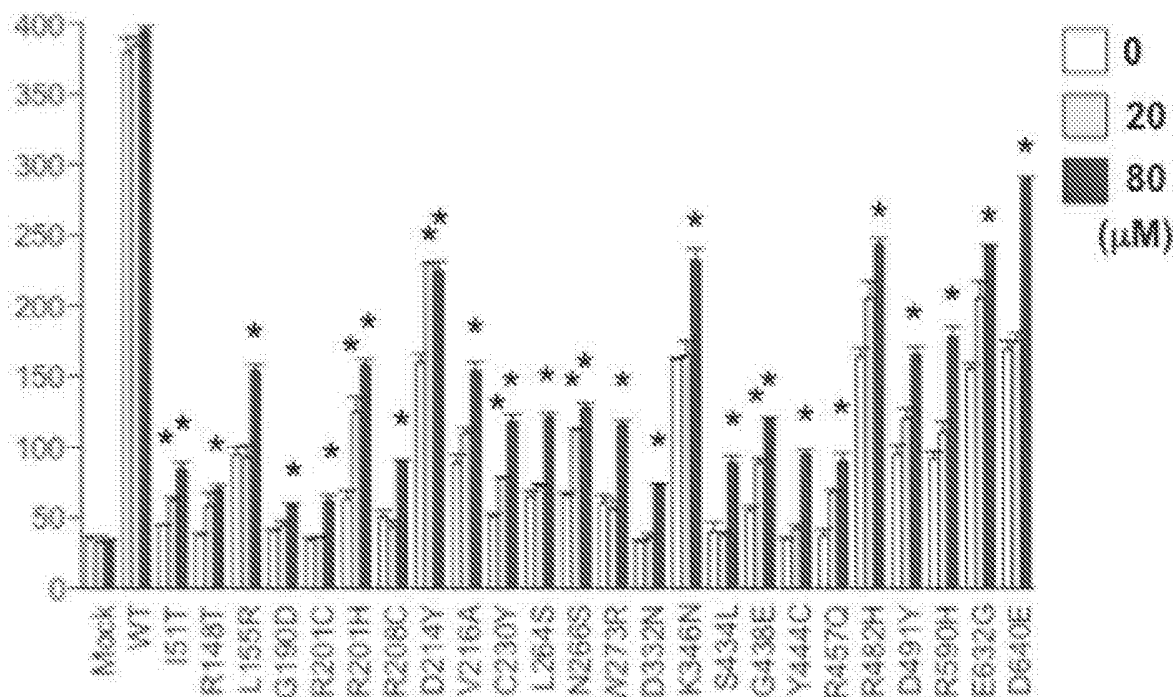


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070883

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, C07D, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, CAS, REGISTRY, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/046517 A1 (CSIC,UNIV DE SEVILLA,INT UNIV OF HEALTH,TOTTORI UNIV) 29-04-2010, the whole the document and in especial claims 13-20	1-11
X	M Aguilar-Moncayo et al, CHEMICAL COMMUNICATIONS 2012, vol 48, págs 6514-6516, 04-07-2012. "Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological chaperones for Fabry disease and GM1 gangliosidosis", the whole the document	1-11
A	WO 2004/037373 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 06-05-2004,	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
06/02/2014

Date of mailing of the international search report
(14/02/2014)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
M. Fernández Fernández

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495489

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070883

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2010046517 A1	29.04.2010	ES2337435 A1 ES2337435 B2	23.04.2010 25.01.2011
-----	-----	-----	-----
WO2004037373 A2	06.05.2004	AU2003284886 A1 AU2003284886 A8	13.05.2004 13.05.2004
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070883

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/4365 (2006.01)

C07D513/04 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070883

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07D, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, CAS, REGISTRY, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2012/046517 A1 (CSIC,UNIV DE SEVILLA,INT UNIV OF HEALTH,TOTTORI UNIV) 29-04-2010, todo el documento y en especial reivindicaciones 13-20	1-11
X	M Aguilar-Moncayo et al, CHEMICAL COMMUNICATIONS 2012, vol 48, págs 6514-6516, 04-07-2012. "Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: pharmacological chaperones for Fabry disease and GM1 gangliosidosis", todo el documento	1-11
A	WO 2004/037373 A2 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 06-05-2004,	1-11

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
06/02/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
14 de febrero de 2014 (14/02/2014)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Fernández Fernández

Nº de teléfono 91 3495489

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070883

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2010046517 A1	29.04.2010	ES2337435 A1 ES2337435 B2	23.04.2010 25.01.2011
----- WO2004037373 A2	----- 06.05.2004	----- AU2003284886 A1 AU2003284886 A8	----- 13.05.2004 13.05.2004
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K31/4365 (2006.01)

C07D513/04 (2006.01)

A61P25/28 (2006.01)