



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 337 435**

② Número de solicitud: 200802988

⑤ Int. Cl.:

C07D 498/04 (2006.01)

C07D 513/04 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4355 (2006.01)

A61K 31/4365 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **22.10.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.04.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.04.2010

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 25 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Sevilla (Titular al 25 %),
International University of Health and Welfare
(Titular al 25 %) y
Tottori University (Titular al 25 %)

⑧ Inventor/es: **García Fernández, José Manuel;**
Ortiz Mellet, Carmen;
García Moreno, María Isabel;
Aguilar Moncayo, Matilde;
Suzuki, Yoshiyuki y
Ohno, Kousaku

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes.**

⑦ Resumen:

Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes, con actividad inhibitoras de enzimas glicosidasas y también se refiere a un procedimiento para la activación de β -glucosidasa mutante (β -glucocerebrosidasa) y β -galactosidasa mutante en pacientes que padecen trastornos de almacenamiento lisosómico mediante la administración de dichos compuestos inhibidores competitivos de las enzimas, caracterizados por una especificidad de unión muy alta y una relación favorable entre su concentración para actividad de chaperona farmacológica y su concentración para actividad inhibitora.

ES 2 337 435 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos potenciadores de la actividad de glicosidasas mutantes.

5 La presente invención se refiere a unos compuestos con actividad inhibitoras de enzimas glicosidasas y a un procedimiento para la activación de β -glucosidasa muñante (β -glucocerebrosidasa) y β -galactosidasa mutante en pacientes que padecen trastornos de almacenamiento lisosómico mediante la administración de dichos compuestos inhibidores competitivos de las enzimas, caracterizados por una especificidad de unión muy alta y una relación favorable entre su concentración para actividad de chaperona farmacológica y su concentración para actividad inhibitora. La invención
10 también se refiere a estos compuestos, a su procedimiento de obtención y a composiciones terapéuticas que contienen dichos compuestos.

Estado de la técnica anterior

15 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 (A. H. Futerman, G. van Meer, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, 554-565). 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 enzimas implicadas en su biosíntesis (US2005/0075305). El aumento de la enzima defectiva podría conseguirse clínicamente mediante reemplazamiento enzimático (R. J. Desnick, E. H. Schuchman, *Nature Rev. Genet.* 2002, 954-966). 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
20 los casos que muestran implicación del sistema nervioso central. El trasplante de médula ósea puede revertir también la enfermedad, pero hasta ahora las estrategias de terapia génica no han tenido éxito.

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. El uso de compuestos funcionales que pueden servir de molde para un plegado apropiado de proteínas con tendencia a un plegado erróneo está bien documentado. Así, se sabe que algunos inhibidores enzimáticos son capaces de unirse al sitio activo y estabilizar el plegamiento apropiado de la forma catalítica de la enzima. Dichos compuestos pueden actuar como "chaperonas farmacológicas" para estabilizar la proteína mutante en una conformación apropiada para su transporte a los lisosomas, donde permanece estable debido a la alta concentración de sustrato
30 y al entorno de bajo pH.

La enfermedad de Gaucher es el trastorno de almacenamiento lisosómico más predominante, con una incidencia estimada de aproximadamente 1:60.000 en la población general y de 1:100 en la población de judíos asquenazíes (T. D. Butters, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007, 11, 412-418). Es el resultado de mutaciones en la β -glucosidasa ácida (β -glucocerebrosidasa), una glucoproteína lisosómica asociada a membrana de 497 restos que tienen como consecuencia la acumulación del correspondiente sustrato (glucosilceramida). Se han identificado más de 200 mutaciones puntuales diferentes en el gen que codifica la β -glucocerebrosidasa (E. Sidransky, *Mol. Genet. Metab.* 2004, 83, 6-15). 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.
45

Otra patología, la deficiencia hereditaria de β -galactosidasa ácida lisosómica (β -galactosidosis), causa dos enfermedades clínicamente distintas en seres humanos, la gangliosidosis G_{M1} y la enfermedad de Morquio B (Y. Suzuki, *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006, 29, 471-476). Ambas son el resultado de mutaciones en el gen *GLB1* que conducen a un plegamiento proteico erróneo (S. Zhang, R. Bagshow, W. Hilson, Y. Oho, A. Hinek, J. T. R. Clarke, A. Hinek, J. W. Callahan, *Biochem. J.* 2000, 348, 621-632). El modo de herencia es recesivo autosómico. La gangliosidosis G_{M1} 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 glucoconjugados con restos de β -galactosa terminales en los tejidos y orina. El gangliósido G_{M1} y su derivado asiálico G_{A1} se acumulan en el cerebro en el caso de la gangliosidosis G_{M1} . Tanto en pacientes con gangliosidosis G_{M1} como en pacientes que padecen la enfermedad de Morquio B se detectan altas cantidades de oligosacáridos derivados de sulfato de queratano o glucoproteínas en órganos viscerales y orina. Actualmente, sólo está disponible la terapia sintomática para pacientes con β -galactosidosis.
55

Por otro lado, algunos alcaloides polihidroxilados naturales y sintéticos estructuralmente relacionados con los azúcares (glicomiméticos) que incorporan un nitrógeno endocíclico de tipo amina (hibridación sp^3) exhiben una actividad inhibitora significativa frente a glicosidasas. Análogamente, se ha demostrado que los carbociclos estructuralmente relacionados con los azúcares que portan sustituyentes de tipo amina se comportan como inhibidores de glicosidasas (S. Ogawa, M. Kanto, Y. Suzuki, *Mini-Rev. Med. Chem.* 2007, 7, 679-691). En algunos casos, se ha demostrado que estos compuestos usados a concentraciones subinhibidoras actúan como chaperonas de β -glucocerebrosidasa mutante y β -galactosidasa muñante (US 2006/0100241; W02004/037373). Sin embargo, estos tipos de compuestos se comportan en general como inhibidores de glucosidasa de amplio espectro, inhibiendo simultáneamente varias glicosidasas, lo que representa un inconveniente serio para aplicaciones clínicas. La inhibición simultánea de β y α -glucosidasas es particularmente problemática. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar moléculas estructuralmente relacionadas
65

con los azúcares con una alta relación de actividad chaperona a inhibidora que, al mismo tiempo, exhiban una alta selectividad anomérica por las correspondientes enzimas β -glicosidasas.

Descripción de la invención

5

La presente invención proporciona compuestos bicíclicos estructuralmente relacionados con los azúcares que incorporan al menos un átomo de nitrógeno endocíclico con un carácter sustancialmente sp^2 (a partir de ahora, azazúcar sp^2) y se comportan como inhibidores competitivos muy selectivos de las β -glucocerebrosidasa y β -galactosidasa ácida lisosómicas asociadas a la enfermedad de Gaucher y la β -galactosidosis, respectivamente. Estos compuestos potencian la actividad de dichas enzimas cuando se administran a concentraciones menores de las necesarias para inhibir la actividad enzimática intracelular, actuando por lo tanto como chaperonas farmacológicas. El efecto es particularmente significativo en ciertas enzimas mutantes, pero aparece también en células que contienen la enzima normal.

10

En consecuencia, la presente invención también proporciona un procedimiento para activar β -glucosidasa o β -galactosidasa y un procedimiento para tratar pacientes que padecen enfermedad de Gaucher o β -galactosidosis, mediante la utilización de los compuestos de la invención.

15

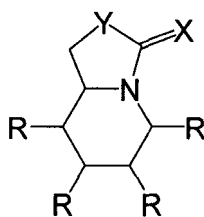
Este procedimiento de la invención además de ser útil en células de mamífero, es también útil en células de otra procedencia, tales como, por ejemplo, células de insecto y células CHO cultivadas, usadas en la producción de enzimas recombinantes para terapia de reemplazamiento enzimático.

20

De acuerdo con lo anterior, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus sales:

25

30



35

(I)

40

donde: R es un sustituyente, igual o diferente en cada uno de los casos, y que se selecciona de entre un átomo de H, un grupo hidroxilo (-OH) ó un grupo OR^2 ; donde

45

R^2 se selecciona de entre un grupo acilo, sustituido o no sustituido, un grupo alquilo (C_1-C_{18}), sustituido o no sustituido, un grupo arilo, sustituido o no sustituido, un grupo aralquilo, sustituido o no sustituido, un grupo amino (NH_2), un grupo acetamido (NHAc), o un grupo NHR^3 , donde

50

Preferiblemente R es igual en todos los casos y es OH;

Y se selecciona de entre un átomo de O, un grupo NH ó un átomo de S; y

55

X es el grupo $-NR^1$; donde R^1 se selecciona de entre un átomo de H, un grupo alquilo (C_1-C_{18}), sustituido o no sustituido, un grupo arilo, sustituido o no sustituido o un grupo aralquilo, sustituido o no sustituido.

60

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 18 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 3 y 9 átomos de carbono. Más preferiblemente *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo o *n*-octilo. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o carboxamido. Cuando el grupo alquilo está sustituido, lo está preferentemente por un o varios grupos amina, amida o éter, que a su vez pueden estar o no sustituidos por grupos alquilo, amida, cicloalquilo o éteres y estos a su vez, pueden estar igualmente sustituidos o no.

65

"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.

ES 2 337 435 A1

El término “arilo” se refiere, en la presente invención, a anillos aromáticos sencillos o múltiples, que tienen de entre 5 a 18 eslabones en los que se ha eliminado un protón del anillo. Preferentemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono. Los grupos arilo son por ejemplo, pero sin limitarse a fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes.

5

El término “aralquilo” se refiere, en la presente invención, a una cadena alifática en el 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.

10

El término “acilo” se refiere, en la presente invención, a un derivado de ácido carboxílico por eliminación de un grupo hidroxilo. Los derivados de ácido carboxílico tienen como fórmula general R^1-CO- , donde R^1 es un grupo alquilo con las acepciones anteriores y preferiblemente se refiere a grupos alquilo (C_3-C_{14}), lineal o ramificado. Como por ejemplo, pero sin limitarse a propionilo, butanoilo, hexanoilo, pivaloilo, octanoilo o miristoilo.

15

Los compuestos miméticos de azúcar de la invención, según se representa en la fórmula general (I), incluyen bicíclicos condensados de seis miembros/cinco miembros que tienen un átomo de nitrógeno cabeza de puente que es parte de una funcionalidad amida cíclica o pseudoamida. Por “funcionalidad pseudoamida”, se define un grupo de fórmula general $N-C(=X)Y$, en la que X representa un heteroátomo que porta, dado el caso, sustituyentes de naturaleza variada, Y es un heteroátomo, que porta dado el caso sustituyentes de naturaleza variada. Son heteroátomos preferidos el nitrógeno (N), oxígeno (O) ó azufre (S). Ejemplos no limitantes de grupos pseudoamida, según la presente invención son urea, tiourea, isourea, isotiourea, guanidina o amidina. En adelante, se utilizará el término azaazúcares sp^2 para referirse a los compuestos de la invención.

20

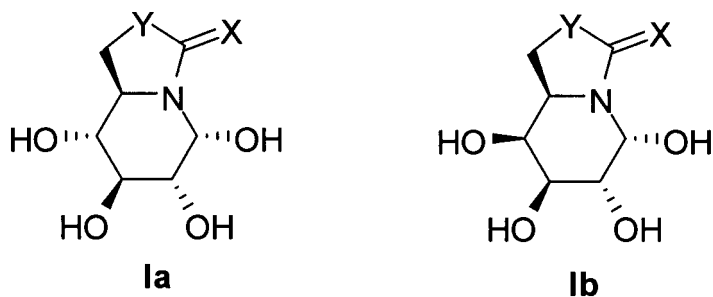
25

Los átomos de carbono del núcleo bicíclico del azaazúcar sp^2 pueden estar sustituidos con hidroxilos para imitar estrechamente una estructura de azúcar o pueden estar desprovistos de hidroxilos. Son perfiles de hidroxilación preferidos aquellos que coinciden con los de D-glucosa y D-galactosa en las posiciones equivalentes a C-2, C-3 y C-4 en el monosacárido tras superposición del anillo de seis miembros del biciclo con el anillo de piranosa del monosacárido, con el átomo de nitrógeno cabeza de puente en la posición del átomo de oxígeno del azúcar (de aquí en adelante, glucomiméticos y galactomiméticos, respectivamente).

30

De forma interesante, los compuestos de la invención pueden portar un grupo hidroxilo en la posición equivalente a la posición anomérica. La presencia del átomo de nitrógeno vecino de tipo pseudoamida con carácter sustancialmente sp^2 favorece la orientación axial de este hidroxilo y proporciona una alta estabilidad al mimético de azúcar reductor. En consecuencia, las chaperonas farmacológicas preferidas según esta invención responden a las fórmulas Ia y Ib.

35



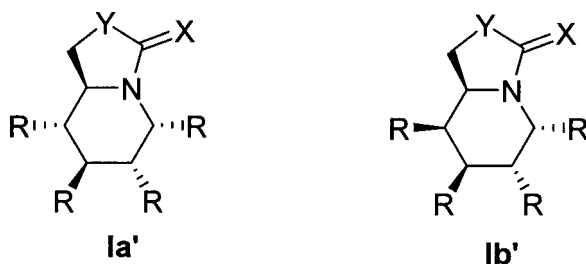
50

Donde Y y X están definidos anteriormente.

55

Otros compuestos adicionales a las fórmulas (Ia) y (Ib) incluyen aquellos en los que uno o más de los grupos hidroxilo están adiados, alquilados o reemplazados por un átomo de H o por otros grupos funcionales, preferiblemente por funcionalidades de nitrógeno, tal y como se recoge en la descripción de la fórmula general (I). Por tanto, otra realización preferida comprende los compuestos de fórmula general (Ia') y (Ib'):

60

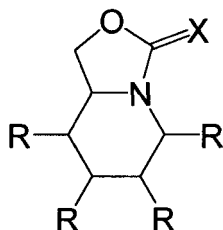


65

Donde: R, X e Y están definidos anteriormente.

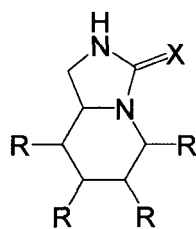
ES 2 337 435 A1

Cuando Y es oxígeno el compuesto de la invención es de fórmula general (Ic):



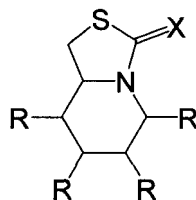
(Ic)

Cuando Y es un átomo de nitrógeno, el compuesto de la invención es de fórmula general (Id):



(Id)

Cuando Y es un átomo de azufre, el compuesto de la invención es de fórmula general (Ie):



(Ie)

Adicionalmente la invención proporciona un procedimiento para la síntesis química del núcleo bicíclico de los compuestos anteriormente mencionados a partir de carbohidratos comerciales fácilmente disponibles y está particularmente bien adaptada para generar diversidad molecular, permitiendo sintetizar compuestos con patrones de sustitución de complementariedad estructural con D-glucosa y D-galactosa. Además, puede introducirse una batería de sustituyentes en diferentes posiciones a lo largo de la ruta sintética, que es de gran importancia para optimizar la actividad biológica y las propiedades farmacodinámicas.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula general (I) que comprende:

- (i) la introducción de un grupo amino en posición C-5 del azúcar correspondiente en forma de furanosa;
- (ii) el cierre de un anillo de 5 miembros entre las posiciones C-5 y C-6 mediante un segmento de tipo pseudoamida; y
- (iii) la transposición del anillo de furanosa a un ciclo de piperidina fusionado con el anillo de pseudoamida cíclico de cinco miembros anteriormente construido.

ES 2 337 435 A1

Las características del procedimiento de preparación de la invención quedarán más claramente reflejadas en los ejemplos que se proporcionan más adelante.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica.

10 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad relacionada con β -glucosidasa y/o β -galactosidasa mutadas humanas. Preferiblemente las enfermedades son la enfermedad de Gaucher, la gangliosidosis G_{MI} o la enfermedad de Morquio B.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de potenciación de la biodisponibilidad de chaperonas químicas usando composiciones terapéuticas que contienen un vehículo farmacológicamente aceptable, preferiblemente una ciclodextrina comercial tal como α -, β - o γ -ciclodextrina (α CD, β CD o γ CD), una β -ciclodextrina metilada (TRIMEB, DIMEB o RAMEB), una β -ciclodextrina hidroxipropilada (HP- β CD) o una β CD sulfobutilada (Captisol[®]), o una ciclodextrina modificada químicamente tal como un derivado de ciclodextrina que porta oligosacáridos biorreconocibles.

20 La presente invención implica el uso de los compuestos bicíclicos que imitan D-glucosa (glucomiméticos) de tipo azazúcar sp^2 , que portan sustituyentes hidrófobos, como chaperonas químicas para potenciar la actividad residual en un medio de cultivo de fibroblastos para varias mutaciones que causan enfermedad de Gaucher. Esta estrategia terapéutica pudo aplicarse a la gangliosidosis G_{MI} usando compuestos que imitan D-galactosa (galactomiméticos) de tipo azazúcar sp^2 que portan sustituyentes hidrófobos.

25 Por tanto, puede usarse un procedimiento de esta invención para tratar un paciente que tiene enfermedad de Gaucher o un paciente que padece β -galactosidosis. Según los procedimientos de la invención, se administra al paciente una cantidad activante eficaz de β -glucocerebrosidasa o β -galactosidasa de un azazúcar sp^2 adecuado o de una composición terapéutica de un azazúcar sp^2 adecuada.

30 En particular, la presente invención implica que el compuesto que imita el azúcar de tipo azazúcar sp^2 mencionado tiene, además de una alta relación de actividad chaperona frente a actividad inhibidora, una muy alta selectividad hacia la enzima diana. Esto representa una mejora significativa en comparación, por ejemplo, con el uso de azazúcares de tipo convencional en los que un átomo de nitrógeno con hibridación sp^3 reemplaza al oxígeno endocíclico de un azúcar, como por ejemplo la 1-desoxinojirimicina, que se comportan en general como inhibidores de glicosidasas de amplio espectro. Significativamente, los compuestos glicomiméticos de tipo azazúcar sp^2 de la invención exhiben una selectividad β -anomérica muy alta cuando se comparan con la actividad inhibidora hacia α - y β -glucosidasas o α - y β -galactosidasas lisosómicas humanas.

40 La presente invención proporciona también composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto glicomimético de tipo azazúcar sp^2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo" designa un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se administra el agente terapéutico. Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar un compuesto de la invención, por ejemplo, liposomas, micropartículas o microcápsulas. En una realización específica, el sistema de administración es un ciclomaltooligosacárido (ciclodextrina, CD).

45 Los inventores descubrieron que el uso de CD nativas o CD modificadas químicamente permite enmascarar el resto hidrófobo del inhibidor, aumentando así su solubilidad en medios acuosos. Los complejos de inclusión resultantes mantienen o incluso potencian las actividades inhibidoras y chaperona del agente activo.

50 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula general (I) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal y como se ha definido anteriormente.

55 Además, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para potenciar la actividad de una enzima glicosidasa, que comprende poner en contacto la proteína con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula general (I).

60 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

65 Ejemplos

Los inventores ensayaron una serie de inhibidores de tipo azazúcar sp^2 novedosos sintetizados químicamente frente a un panel de glicosidasas comercialmente disponibles de origen vegetal, de microorganismos y animal. Se evaluaron

ES 2 337 435 A1

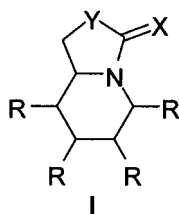
algunos compuestos de la invención en la inhibición *in vitro* de β -glucocerebrosidasa y β -galactosidasa humanas y la potenciación intracelular *ex vivo* de enzimas mutantes con fibroblastos de Gaucher y de gangliosidosis G_{M1} .

5 Ejemplo 1

1.1. Materiales y procedimientos

Los compuestos glicomiméticos de tipo azazúcar sp^2 de la invención, de fórmula general (I), incluyen bicícl

10 condensados de seis miembros/cinco miembros que tienen un átomo de nitrógeno cabeza de puente que es parte de una funcionalidad amida cíclica o pseudoamida.

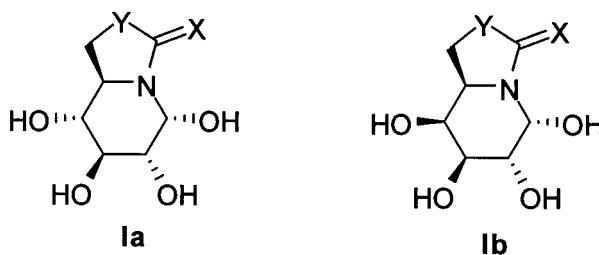


25

Las chaperonas farmacológicas preferidas en el contexto de esta invención responden a las fórmulas Ia (glucomiméticos) e Ib (galactomiméticos).

30

35



50

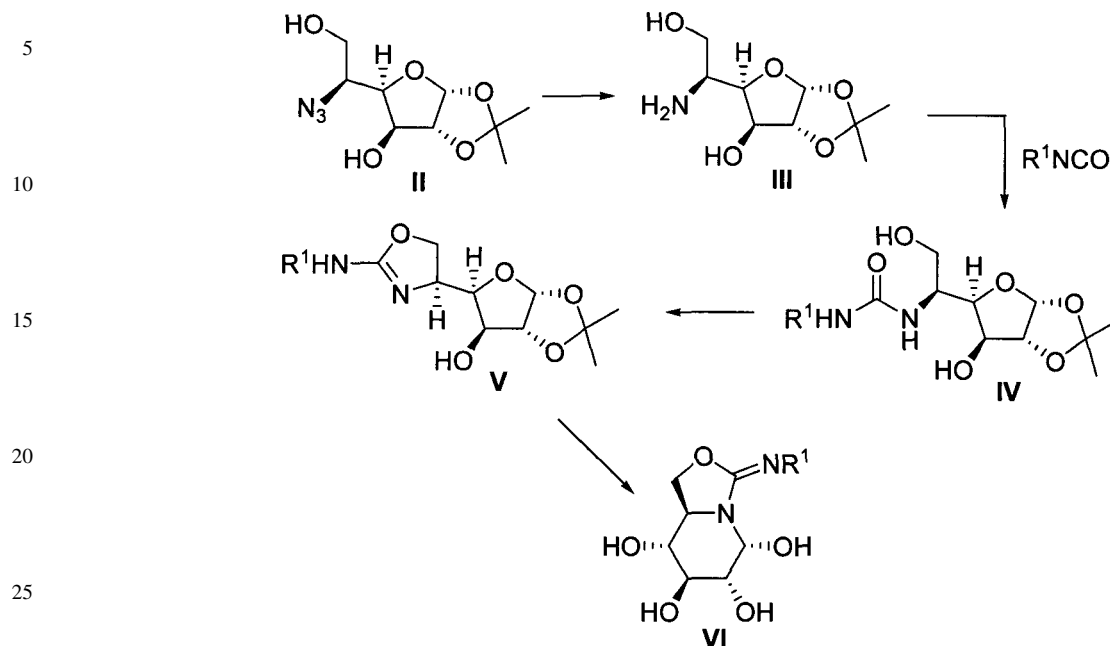
Para la obtención de los compuestos que tienen la fórmula Ia, cuando Y es oxígeno y X es NR^1 (véase la fórmula VI) se siguió la siguiente síntesis: el monosacárido de partida es D-glucosa o un derivado de D-glucosa comercialmente disponible. La introducción de un grupo nitrogenado en posición C-5 puede conseguirse entonces vía la correspondiente 5-azida-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (II). Para la preparación de este intermedio sintético puede usarse el procedimiento reseñado por K. Dax y col. (*J. Carbohydr. Chem.* 1990, 9, 479-499), partiendo de D-glucofuranuro-6,3-lactona comercial. Se encontró ventajosa una estrategia sintética que implica intermedios de tipo urea de fórmula general (IV). Las ureas pueden prepararse, por ejemplo, mediante reacción de 5-amino-5-desoxi-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranosa (III), que puede obtenerse mediante la reducción de II como se ha reseñado (V. M. Díaz Pérez y col., *J. Org. Chem.* 2000, 65, 136-143), por reacción de acoplamiento con el isocianato apropiado de fórmula general R^1NCO . Las ureas IV pueden transformarse en las isoureas cíclicas V correspondientes mediante tratamiento con un anhídrido de ácido sulfónico o un cloruro de sulfonilo tales como anhídrido trifluorometanosulfónico, anhídrido metanosulfónico o cloruro de p-toluenosulfonilo. La hidrólisis catalizada por ácido del grupo protector acetal en los compuestos V proporciona los compuestos VI (esquema 1).

55

60

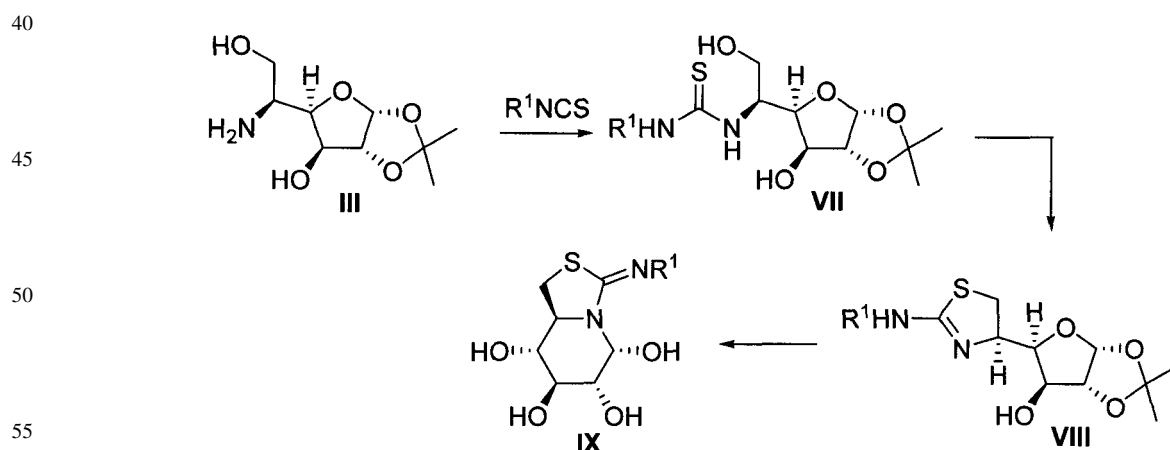
65

Esquema 1



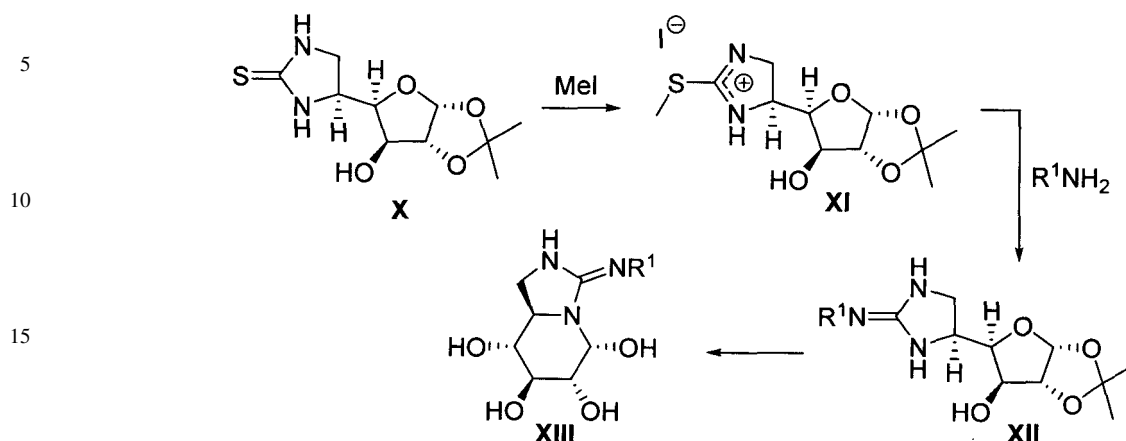
30 Para la preparación de compuestos que tienen la fórmula Ia en la que Y es un átomo de S y X representa NR¹ (véase la fórmula IX), puede seguirse la secuencia de reacción representada en el Esquema 2. La reacción de la amina III con isotiocianatos R¹NCS proporciona aductos de tiourea VII. El tratamiento de VII con un derivado reactivo sulfonante, como se describe anteriormente para la preparación de isoureas cíclicas V, proporciona los precursores de isotiourea cíclicas VIII correspondientes, que después de desacetilación catalizada por ácido proporcionan los glucomiméticos bicyclicos IX.

Esquema 2



60 Para la preparación de los compuestos que tienen la fórmula Ia, en la que Y representa NH y X representa NR¹ (véase la fórmula XIII), puede seguirse la secuencia de reacción representada en el esquema 3. El precursor de tiourea cíclica X puede obtenerse a partir del derivado de azida II siguiendo la metodología reseñada anteriormente (V. M. Díaz Pérez y col., *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 136-143). La reacción de X con un reactivo alquilante, tal como yoduro de metilo, proporciona la correspondiente sal de S-alquilisotiuronio XI. El desplazamiento nucleófilo del grupo alquilio por una amina de fórmula general R¹NH₂ proporciona guanidinas cíclicas de fórmula general XII. El glucomimético de azúcar sp² bicyclico XIII puede obtenerse mediante hidrólisis catalizada por ácido del grupo protector acetal seguido de tratamiento con una base tal como, por ejemplo, hidróxido de sodio. Los compuestos de fórmula general XIII pueden almacenarse y usarse en el contexto de la presente invención como base libre o en forma de una sal de guanidinio tal como, por ejemplo, el cloruro de guanidinio correspondiente.

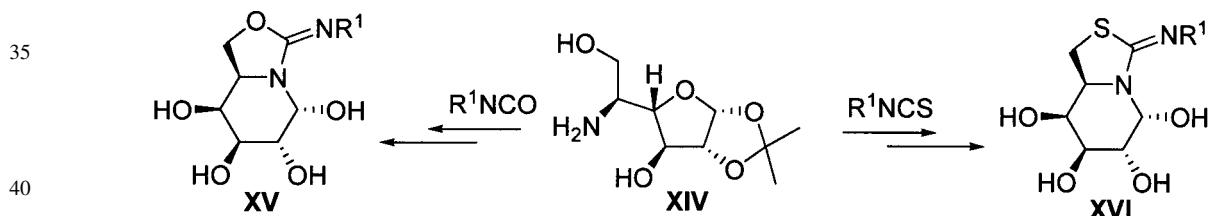
Esquema 3



En otra realización preferida adicional, el monosacárido de partida es D-galactosa o un derivado de D-galactosa comercialmente disponible. En este caso, el compuesto final responde a la fórmula general Ib.

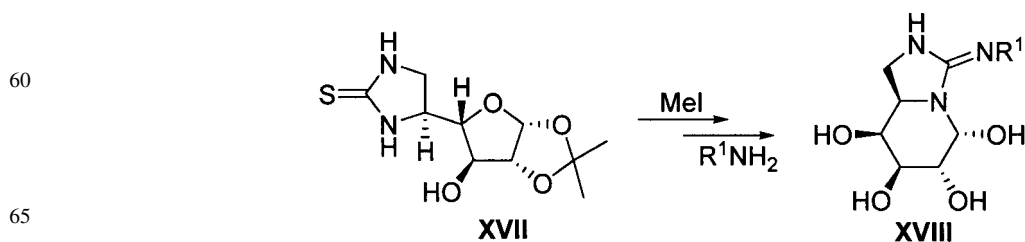
25 Para la preparación de galactomiméticos Ib en los que Y representa O ó S y X representa NR¹ (véanse las fórmulas XV y XVI, respectivamente), puede seguirse una estrategia sintética idéntica a la descrita anteriormente para la preparación de los glucomiméticos VI y IX análogos, usando 5-amino-5-desoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-galactofuranosa XIV como aminoazúcar precursor (esquema 4). El compuesto XIV puede obtenerse a partir de D-galactosa comercial mediante metodologías conocidas tales como, por ejemplo, las reseñadas por P. Díaz Pérez y col. en *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2903-2913.

Esquema 4



45 Para la preparación del galactomimético Ib en el que Y representa NH y X representa NR¹ (véase la fórmula XVIII), puede seguirse una estrategia sintética idéntica a la descrita anteriormente para la preparación del glucomimético XII análogo, partiendo de la tiourea cíclica XVII (esquema 5). El compuesto XVII puede obtenerse a partir de d-galactosa comercial vía el derivado conocido 3-O-benzoyl-1,2-O-isopropiliden- α -D-galactofuranosa (H. Wang y J. Ning, *J. Org. Chem.*, 2003, 68, 2521-2524) mediante una secuencia de reacción que implica: (i) trifenilmetilación en el grupo hidroxilo primario, (ii) introducción de un grupo azida en C-5 mediante doble inversión de la configuración en este centro, (iii) retirada catalizada por ácido del grupo trifenilmetilo, (iv) introducción de un segundo grupo azida en C-6, (v) retirada catalizada por base del grupo benzoylo seguido de reducción simultánea de los dos grupos azida, dando 5,6-diamino-5,6-didesoxi-1,2-O-isopropiliden- α -D-galactofuranosa, y (vi) tiocarbonilación de la diamina a la tiourea cíclica diana XVII. Todas las transformaciones mencionadas son estándar. Como ejemplo, pueden aplicarse los procedimientos reseñados en P. Díaz Pérez y col. en *Eur. J. Org. Chem.* 2005, 2903-2913 y V. M. Díaz Pérez y col., *J. Org. Chem.* 2000, 65, 136-143.

Esquema 5

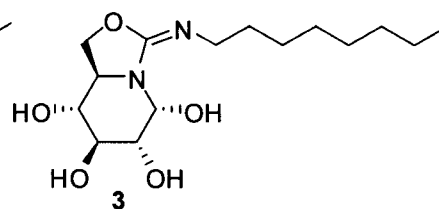
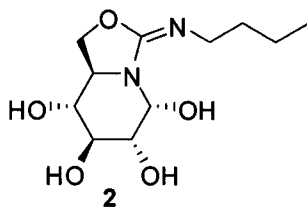
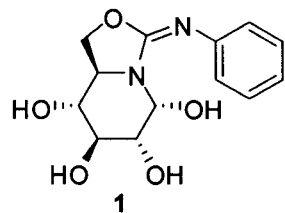


En los esquemas 1-5, el sustituyente R¹ en las fórmulas tiene el significado indicado anteriormente para Ia e Ib.

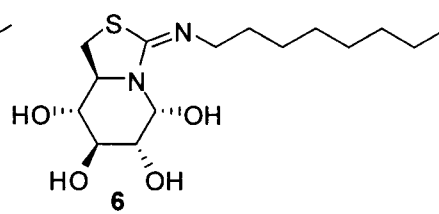
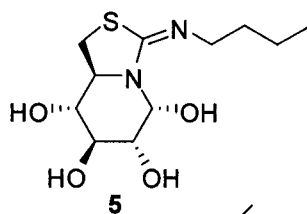
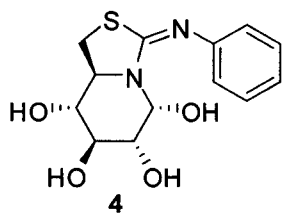
ES 2 337 435 A1

Algunos ejemplos de inhibidores de las familias glucomimética (Ia) (compuestos 1-14) y galactomimética (Ib) (compuestos 15-23) sintetizados químicamente y usados en esta invención se muestran a continuación:

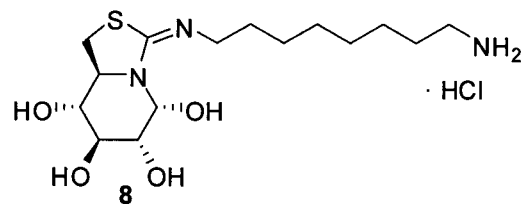
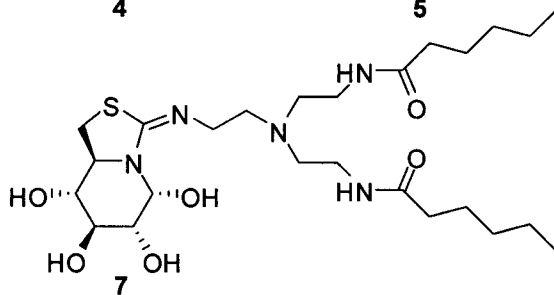
5



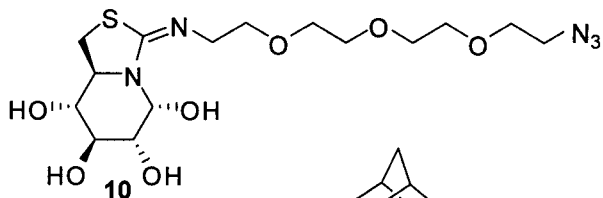
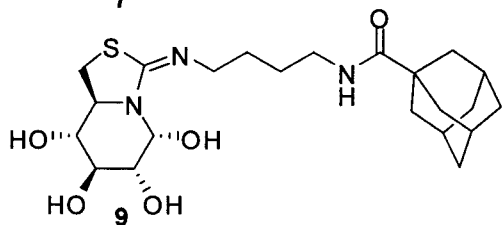
15



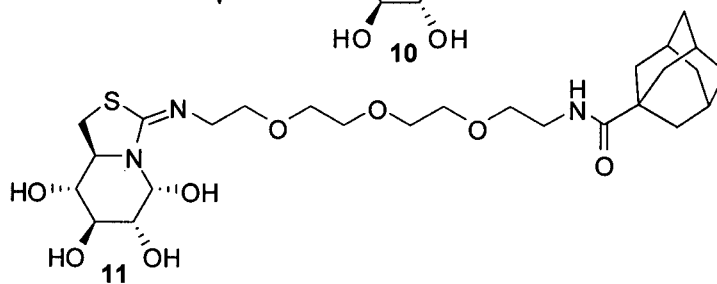
25



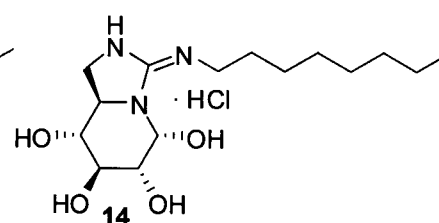
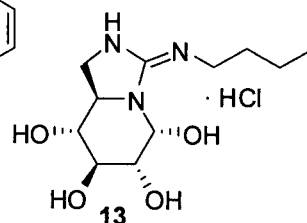
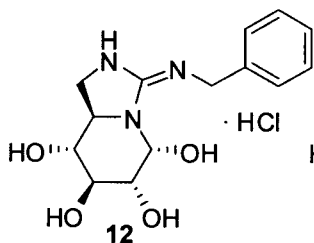
35



45

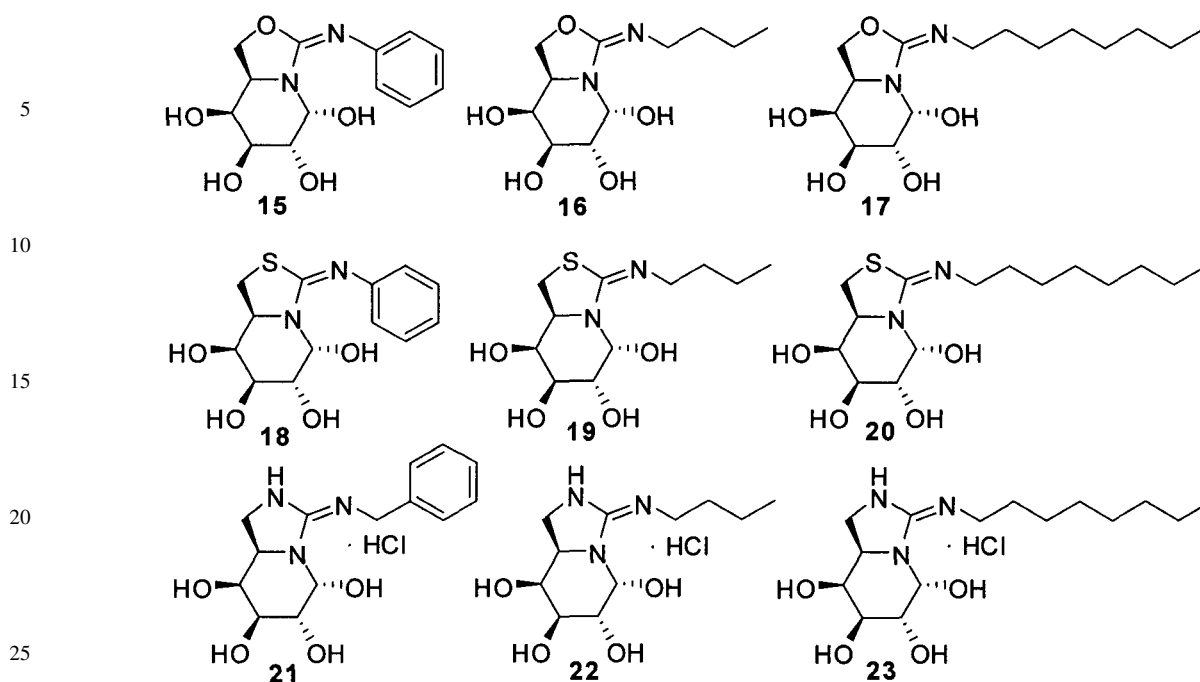


55



60

65



1.2. Caracterización estructural de algunos de los compuestos

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

(5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-oxaindolizidina (1). $[\alpha]_{\text{D}} -26,7$ (*c* 0,75, piridina). RMN- ^1H (500 MHz, D_2O) δ 7,44-7,27 (m, 5H, Ph), 5,73 (s a, 1H, H-5), 4,96 (t, 1H, $J_{1a,1b} = J_{8a,1a} = 8,8$ Hz, H-1a), 4,69 (t, 1H, $J_{8a,1b} = 8,8$ Hz, H-1b), 4,28 (t d, 1H, $J_{8,8a} = 9,4$ Hz, H-8a), 3,81 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,4$ Hz, H-7), 3,73 (dd, 1H, $J_{5,6} = 3,7$ Hz, H-6), 3,66 (t, 1H, H-8); RMN- ^{13}C (75,5 MHz, D_2O) δ 157,4 (CN), 129,7-123,9 (Ph), 75,3 (C-5), 74,1 (C-6), 73,0 (C-8), 71,9 (C-7), 70,9 (C-1), 56,1 (C-8a). Anal. calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 55,71; H, 5,75; N, 9,99. Encontrado: C, 55,70; H, 5,81; N, 9,97.

(5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-butilimino-2-oxaindolizidina (2). $[\alpha]_{\text{D}} +5,9$ (*c* 1,0, H_2O). RMN- ^1H (300 MHz, D_2O) δ 5,53 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,9$ Hz, H-5), 5,01 (t, 1H, $J_{1a,1b} = J_{8a,1a} = 8,8$ Hz, H-1a), 4,67 (t, 1H, $J_{8a,1b} = 8,8$ Hz, H-1b), 4,24 (t d, 1H, $J_{8,8a} = 9,4$ Hz, H-8a), 3,74 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,4$ Hz, H-7), 3,62 (dd, 1H, H-6), 3,61 (t, 1H, H-8), 3,36 (d t, 2H, $^2J_{\text{H,H}} = 7,1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 2,1$ Hz, CH_2N), 1,55 (c, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,30 (m, 2H, CH_2CH_3), 0,87 (t, 3H, CH_3); RMN- ^{13}C (75,5 MHz, D_2O) δ 158,7 (CN), 74,9 (C-5), 73,9 (C-6), 73,0 (C-8), 71,9 (C-7), 70,9 (C-1), 56,2 (C-8a), 42,9 (CH_2N), 30,4 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 19,2 (CH_2CH_3), 12,9 (CH_3). Anal. calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}$: C, 42,62; H, 6,05; N, 7,65. Encontrado: C, 42,75; H, 6,13; N, 7,69.

(5*R*,6*S*,7*R*,8*R*,8*aR*)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-2-oxa-3-octylimino-indolizidina (3). $[\alpha]_{\text{D}} +5,9$ (*c* 1,0, H_2O). RMN- ^1H (500 MHz, D_2O) δ 5,74 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,8$ Hz, H-5), 5,22 (t, 1H, $J_{1a,1b} = J_{8a,1a} = 8,9$ Hz, H-1a), 4,90 (t, 1H, $J_{8a,1b} = 8,9$ Hz, H-1b), 4,45 (t d, 1H, $J_{8,8a} = 9,5$ Hz, H-8a), 3,95 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5$ Hz, H-7), 3,83 (dd, 1H, H-6), 3,80 (t, 1H, H-8), 3,57 (d t, 2H, $^2J_{\text{H,H}} = 7,1$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 4,2$ Hz, CH_2N), 1,53 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1,24 (m, 10H, 5 CH_2), 0,87 (t, 3H, CH_3); RMN- ^{13}C (75,5 MHz, D_2O) δ 158,7 (CN), 74,9 (C-5), 73,9 (C-6), 73,0 (C-8), 71,9 (C-7), 70,9 (C-1), 56,2 (C-8a), 43,2 (CH_2N), 31,2, 28,4, 28,2, 25,8, (5 CH_2), 28,3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 22,1 (CH_2CH_3), 13,5 (CH_3). Anal. calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}$: C, 42,62; H, 6,05; N, 7,65. Encontrado: C, 42,75; H, 6,13; N, 7,69.

(5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-tiaindolizidina (4). $[\alpha]_{\text{D}} -38,0$ (*c* 0,5, H_2O). RMN- ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ 7,22 (t, 2H, Ph), 7,00 (t, 1H, Ph), 6,88 (d, 2H, Ph), 5,72 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,7$ Hz, H-5), 3,82 (td, 1H, $J_{8,8a} = J_{8a,1b} = 9,5$ Hz, $J_{8a,1a} = 6,5$ Hz, H-8a), 3,71 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5$ Hz, H-7), 3,45 (dd, 1H, H-6), 3,35 (dd, 1H, $J_{1a,1b} = 10,9$ Hz, H-1a), 3,29 (t, 1H, H-8), 3,00 (dd, 1H, H-1b). RMN- ^{13}C (125,7 MHz, CD_3OD) δ 162,3 (CN), 152,6-123,0 (Ph), 77,8 (C-5), 76,3 (C-8), 74,8 (C-7), 73,4 (C-6), 61,1 (C-8a), 31,8 (C-1). FABMS: m/z 319 (75, $[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. calc. para $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C, 52,69; H, 5,44; N, 9,45. Encontrado: C, 52,50; H, 5,13; N, 9,29.

(5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-3-Butylimino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (5). $[\alpha]_{\text{D}} -22,9$ (*c* 0,7, H_2O). RMN- ^1H (500 MHz, D_2O) δ 5,52 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,7$ Hz, H-5), 3,75 (d t, 1H, $J_{8,8a} = J_{8a,1b} = 9,5$ Hz, $J_{8a,1a} = 6,4$ Hz, H-8a), 3,71 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5$ Hz, H-7), 3,55 (dd, 1H, H-6), 3,45 (dd, 1H, $J_{1a,1b} = 10,5$ Hz, H-1a), 3,40 (t, 1H, H-8), 3,18 (m, 2H, CH_2N),

ES 2 337 435 A1

- 3,07 (dd, 1H, H-1b), 1,52 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,30 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,87 (t, 3H, ³J_{H,H} = 7,4 Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 162,9 (CN), 76,0 (C-5), 74,3 (C-8), 72,8 (C-7), 71,4 (C-6), 59,8 (C-8a), 53,9 (CH₂N), 32,0 (C-1), 30,4 (CH₂CH₂N), 19,8 (CH₂CH₃), 13,2 (CH₃). FABMS: *m/z* 299 (40, [M + Na]⁺), 277 (100, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₁H₂₀N₂O₄S: C, 47,81; H, 7,29; N, 10,14. Encontrado: C, 47,65; H, 7,14; N, 9,99.
- 5
 (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-octilimino-2-tiaindolizidina (6). [α]_D -24,5 (c 0,5, MeOH). RMN-¹H (300 MHz, D₂O) δ 5,50 (d, 1H, J_{5,6} = 3,7 Hz, H-5), 4,20 (m, 1H, H-8a), 3,66 (m, 2H, H-7, H-1a), 3,52 (dd, 1H, J_{6,7} = 10,0, H-6), 3,45 (t, 1H, J_{7,8} = J_{8,8a} = 9,5 Hz, H-8), 3,32 (m, 3H, H-1b, CH₂N), 1,56 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,18 (m, 10H, CH₂), 0,74 (t, 3H, ³J_{H,H} = 6,9 Hz, CH₃). RMN-¹³C (75,5 MHz, D₂O) δ 162,5 (CN), 76,6 (C-5), 73,5 (C-8), 72,0 (C-7), 70,9 (C-6), 63,6 (C-8a), 49,4 (CH₂N), 31,5 (C-1), 31,3, 28,6, 28,5, 28,3, 26,0 (CH₂), 22,3 (CH₂CH₃), 13,7 (CH₃). FABMS: *m/z* 355 (30, [M + Na]⁺), 333 (100, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₅H₂₈N₂O₄S: C, 54,19; H, 8,49; N, 8,43. Encontrado: C, 53,94; H, 8,42; N, 8,29.
- 10
 (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-3-[2'-(*N,N*-Bis-(2-hexanamidoetil)aminoetil)-imino]-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (7). [α]_D -5,0 (c 1,0, H₂O). F_R 0,41 (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 40:10:1). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,62 (d, 1H, J_{5,6} = 3,8 Hz, H-5), 3,85 (m, 1H, H-8a), 3,74 (t, 1H, J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5 Hz, H-7), 3,57 (dd, 1H, H-6), 3,56 (dd, 1H, J_{1a,1b} = 10,5 Hz, J_{8a,1a} = 6,5 Hz, H-1a), 3,45 (m, 6H, CH₂NCS, CH₂NHCO), 3,44 (t, 1H, J_{8,8a} = 9,5 Hz, H-8), 3,25 (m, 2H, CH₂NCS), 3,18 (m, 4H, CH₂CH₂NHCO), 3,17 (t, 1H, J_{8a,1b} = 10,5 Hz, H-1b), 2,16 (t, 4H, ³J_{H,H} = 7,5 Hz, CH₂CONH), 1,47 (m, 4H, CH₂CH₂CONH), 1,18 (m, 8H, CH₂), 0,76 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7,0 Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 178,3 (CO), 162,9 (CN), 75,9 (C-5), 74,3 (C-8), 72,6 (C-7), 71,3 (C-6), 60,5 (C-8a), 54,4 (CH₂CH₂NCS), 54,0 (CH₂CH₂NHCO), 48,0 (CH₂NCS), 35,7 (CH₂NHCO), 35,6 (CH₂CONH), 31,1 (C-1), 30,6 (CH₂), 25,0 (CH₂CH₂CONH), 21,7 (CH₂CH₃), 13,2 (CH₃). FABMS: *m/z* 568 (30, [M + Na]⁺), 546 (40, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₂₅H₄₇N₅O₆S: C, 55,02; H, 8,68; N, 12,83. Encontrado: C, 55,09; H, 8,66; N, 12,86.
- 15
 20
 25
 30
 Clorhidrato de (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-3-(8-aminoetil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (8). [α]_D -7,0 (c 1,0, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O, 313 K) δ 5,76 (d, 1H, J_{5,6} = 4,0 Hz, H-5), 4,46 (m, 1H, H-8a), 3,92 (m, 2H, H-7, H-1a), 3,78 (dd, 1H, J_{6,7} = 9,5 Hz, H-6), 3,71 (t, 1H, J_{7,8} = J_{8,8a} = 9,5 Hz, H-8), 3,61 (t, 1H, J_{1a,1b} = J_{8a,1b} = 10,0 Hz, H-1b), 3,57 (t, 2H, ³J_{H,H} = 7,0 Hz, CH₂N), 3,12 (t, 2H, ³J_{H,H} = 7,5 Hz, CH₂NH₂), 1,79 (m, 4H, CH₂), 1,48 (m, 8H, CH₂). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O, 313 K) δ 173,0 (CN), 76,6 (C-5), 73,3 (C-8), 71,9 (C-7), 70,8 (C-6), 63,6 (C-8a), 49,2 (CH₂N), 39,8 (CH₂NH₂), 31,4 (C-1), 28,2, 28,1, 28,0, 26,9, 27,8, 25,7 (CH₂). FABMS: *m/z* 348 (30, [M + H]⁺). HRFABMS: *m/z* 348,194640; calc. para C₁₅H₃₀N₃O₄S: 348,195704. Anal. calc. para C₁₅H₃₀ClN₃O₄S: C, 46,92; H, 7,88; N, 10,94; S, 8,35. Encontrado: C, 46,57; H, 7,69; N, 10,61; S, 8,04.
- 35
 40
 (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-3-(4-Adamantano-1-ilcarboxamidobutil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (9). [α]_D -7,1 (c 1,0, H₂O). F_R 0,28 (CH₂Cl₂-H₂O-MeOH 40:10:1). RMN-¹H (500 MHz, D₂O, 313 K) δ 5,73 (d, 1H, J_{5,6} = 3,7 Hz, H-5), 4,38 (m, 1H, H-8a), 3,91 (t, 1H, J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5 Hz, H-7), 3,87 (dd, 1H, J_{1a,1b} = 11,3 Hz, J_{8a,1a} = 7,5 Hz, H-1a), 3,74 (dd, 1H, J_{6,7} = 9,5 Hz, H-6), 3,67 (t, 1H, J_{8,8a} = 9,5 Hz, H-8), 3,53 (m, 3H, H-1b, CH₂N), 3,33 (t, 2H, ³J_{H,H} = 6,7 Hz, CH₂NHCO), 2,14 (s a, 3H, CH), 1,92 (m, 6H, CCH₂), 1,83 (m, 6H, CHCH₂), 1,67 (m, 2H, CH₂). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O, 313 K) δ 182,0 (CO), 173,0 (CN), 76,6 (C-5), 73,5 (C-8), 72,0 (C-7), 70,9 (C-6), 63,1 (C-8a), 49,3 (CH₂N), 40,8 (CCONH), 38,8 (CH), 38,6 (CH₂NHCO), 36,1 (CCH₂), 31,4 (C-1), 28,0 (CHCH₂), 25,9, 25,6 (CH₂). FABMS: *m/z* 476 (20, [M + Na]⁺), 454 (10, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₂₂H₃₅ClN₃O₅S: C, 58,25; H, 7,78; N, 9,26; S, 7,07.
- 45
 50
 (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-3-(11-Azida-3,6,9-trioxaundecil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (10). [α]_D -13,0 (c 1,0, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,55 (d, 1H, J_{5,6} = 3,7 Hz, H-5), 3,73 (m, 14H, H-7, H-8a, OCH₂), 3,54 (dd, 1H, J_{6,7} = 9,8 Hz, H-6), 3,45 (m, 2H, CH₂N), 3,45 (dd, 1H, J_{1a,1b} = 10,7 Hz, J_{8a,1a} = 6,3 Hz, H-1a), 3,39 (t, 1H, J_{8,8a} = 9,7 Hz, H-8), 3,35 (m, 2H, CH₂N₃), 3,05 (t, 1H, J_{8a,1b} = 10,7 Hz, H-1b). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 166,1 (CN), 78,3 (C-5), 77,0 (C-8), 75,3 (C-7), 73,9 (C-6), 73,4, 73,1, 72,1, 72,0, 71,8 (OCH₂), 62,1 (C-8a), 56,0 (CH₂N₃), 52,7 (CH₂N), 45,7 (CH₂CH₂N₃), 33,1 (C-1). FABMS: *m/z* 444 (15, [M + Na]⁺). HRFABMS: *m/z* 444,154344; calc. para C₁₅H₂₇N₅O₇NaS: 444,152890. Anal. calc. para C₁₅H₂₇N₅O₇S: C, 42,75; H, 6,46; N, 16,62; S, 7,61. Encontrado: C, 42,51; H, 6,55; N, 16,46; S, 7,39.
- 55
 60
 (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-3-(11-Adamantano-1-ilcarboxamido-3,6,9-trioxaundecil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (11). [α]_D -6,2 (c 1,0, H₂O). F_R 0,51 (CH₂Cl₂-H₂O-MeOH 40:10:1). RMN-¹H (500 MHz, D₂O, 313 K) δ 5,76 (d, 1H, J_{5,6} = 3,7 Hz, H-5), 4,21 (m, 1H, H-8a), 3,90 (t, 1H, J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5 Hz, H-7), 3,84 (m, 12H, OCH₂), 3,79 (dd, 1H, J_{1a,1b} = 11,2 Hz, J_{8a,1a} = 7,1 Hz, H-1a), 3,73 (dd, 1H, H-6), 3,67 (m, 2H, CH₂N), 3,63 (t, 1H, J_{8,8a} = 9,5 Hz, H-8), 3,52 (t, 2H, ³J_{H,H} = 5,5 Hz, CH₂NHCO), 3,42 (t, 1H, J_{8a,1b} = 11,2 Hz, H-1b), 2,15 (s a, 3H, CH), 1,94 (m, 6H, CCH₂) 1,85 (m, 6H, CH₂). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O, 313 K) δ 182,0 (CO), 163,0 (CN), 76,4 (C-5), 74,0 (C-8), 72,5 (C-7), 71,2 (C-6), 69,9, 69,8, 69,7, 69,3, 69,2 (OCH₂), 61,9 (C-8a), 51,1 (CH₂N), 40,8 (CCONH), 39,1 (CH₂NHCO), 38,7 (CH), 36,1 (CCH₂), 31,2 (C-1), 27,9 (CH₂). FABMS: *m/z* 580 (100, [M + Na]⁺), 558 (5, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₂₆H₄₃N₃O₈S: C, 55,99; H, 7,77; N, 7,53; S, 5,75. Encontrado: C, 55,68; H, 7,58; N, 7,32; S, 5,39.
- 65
 Clorhidrato de (5*R*,6*R*,7*S*,8*R*,8*aR*)-2-aza-3-bencilimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina (12). [α]_D +4,0 (c 1,0, H₂O). RMN-¹H (400 MHz, D₂O) δ 7,34 (m, 5H, Ph), 5,40 (d, 1H, J_{5,6} = 3,8 Hz, H-5), 4,40 (s, 2H, CH₂Ph), 3,93 (m, 1H, H-8a), 3,76 (t, 1H, J_{1a,1b} = J_{8a,1a} = 9,5 Hz, H-1a), 3,66 (t, 1H, J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5 Hz, H-7), 3,57 (dd, 1H, H-6), 3,46 (t, 1H, J_{8,8a} = 9,5 Hz, H-8), 3,42 (dd, 1H, J_{8a,1b} = 9,5 Hz, H-1b). RMN-¹³C (75,5 MHz, D₂O) δ 156,5 (CN), 136,3-127,0 (Ph), 74,4 (C-5), 73,3 (C-8), 72,4 (C-7), 71,4 (C-6), 56,2 (C-8a), 46,1 (C-1, CH₂Ph). FABMS: *m/z* 294 (60, [M - Cl]⁺). Anal. calc. para C₁₄H₂₂ClN₃O₅: C, 48,35; H, 6,38; N, 12,08. Encontrado: C, 48,19; H, 6,20; N, 11,92.

ES 2 337 435 A1

- 5 *Clorhidrato de (5R,6R,7S,8R,8aR)-2-aza-3-butylimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina (13)*. $[\alpha]_D^{25} +7,7$ (c 0,8, H₂O). F_R 0,53 (CH₃CN-H₂O-AcOH:6:3:1). RMN-¹H (300 MHz, D₂O) δ 5,42 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,7$ Hz, H-5), 3,95 (m, 1H, H-8a), 3,86 (t, 1H, $J_{1a,1b} = J_{8a,1a} = 9,5$ Hz, H-1a), 3,72 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,5$ Hz, H-7), 3,60 (dd, 1H, H-6), 3,52 (t, 1H, $J_{8,8a} = 9,5$ Hz, H-8), 3,50 (t, 1H, $J_{8a,1b} = 9,5$ Hz, H-1b), 3,23 (t, 2H, $^3J_{H,H} = 7,1$ Hz, CH₂N), 1,57 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,35 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,92 (t, 3H, $^3J_{H,H} = 7,3$ Hz, CH₃). RMN-¹³C (75,5 MHz, D₂O) δ 156,6 (CN), 74,6 (C-5), 73,5 (C-8), 72,6 (C-7), 71,7 (C-6), 56,3 (C-8a), 46,3 (C-1), 42,8 (CH₂N), 30,3 (CH₂CH₂N), 19,3 (CH₂CH₃), 12,9 (CH₃). FABMS: m/z 260 (100, [M - Cl]⁺). Anal. calc. para C₁₁H₂₄ClN₃O₅: C, 42,11; H, 7,71; N, 13,39. Encontrado: C, 42,21; H, 7,81; N, 13,31.
- 10 *Clorhidrato de (5R,6R,7S,8R,8aR)-2-aza-5,6,7,8-tetrahidroxi-3-octiliminoindolizidina (14)*. $[\alpha]_D^{25} +6,6$ (c 0,97, H₂O). RMN-¹H (300 MHz, D₂O) δ 5,31 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,8$ Hz, H-5), 3,85 (m, 1H, H-8a), 3,75 (t, 1H, $J_{1a,1b} = J_{8a,1a} = 9,7$ Hz, H-1a), 3,64 (t, 1H, $J_{6,7} = J_{7,8} = 9,7$ Hz, H-7), 3,49 (dd, 1H, H-6), 3,42 (t, 1H, $J_{8,8a} = 9,7$ Hz, H-8), 3,39 (t, 1H, $J_{8a,1b} = 9,7$ Hz, H-1b), 3,21 (t, 2H, $^3J_{H,H} = 7,1$ Hz, CH₂N), 1,50 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,23 (m, 10H, CH₂), 0,79 (t, 3H, $^3J_{H,H} = 6,9$ Hz, CH₃). RMN-¹³C (75,5 MHz, D₂O) δ 156,6 (CN), 74,7 (C-5), 73,5 (C-8), 72,6 (C-7), 71,8 (C-6), 56,3 (C-8a), 46,3 (C-1), 43,0 (CH₂N), 31,0, 28,3, 28,2, 25,8 (CH₂), 22,0 (CH₂CH₃), 13,4 (CH₃). FABMS: m/z 316 (100, [M - Cl]⁺). Anal. calc. para C₁₅H₃₂ClN₃O₅: C, 48,71; H, 8,72; N, 11,36. Encontrado: C, 48,58; H, 8,61; N, 11,23.
- 20 *(5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-oxaindolizidina (15)*. $[\alpha]_D^{25} -5,2$ (c 0,58, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 7,23-6,91 (m, 5H, Ph), 5,44 (d, 1H, $J_{5,6} = 4,0$ Hz, H-5), 4,36 (t, 1H, $J_{8a,1a} = J_{1a,1b} = 8,3$ Hz, H-1a), 4,20 (t, 1H, $J_{8a,1b} = 7,8$ Hz, H-1b), 4,11 (m, 1H, H-8a), 3,93 (m, 1H, H-8), 3,82 (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,2$ Hz, $J_{7,8} = 2,6$ Hz, H-7), 3,77 (dd, 1H, H-6). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 153,5 (CN), 146,1-123,4 (Ph), 78,3 (C-5), 69,5 (C-7), 68,2 (C-8), 67,7 (C-6), 66,4 (C-1), 53,6 (C-8a). FABMS: m/z 303 (60, [M + Na]⁺), 281 (30, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₃H₁₆N₂O₅: C, 55,71; H, 5,75; N, 9,99. Encontrado: C, 55,74; H, 5,64; N, 9,87.
- 25 *(5R,6R,7S,8S,8aR)-3-Butylimino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-oxaindolizidina (16)*. $[\alpha]_D^{25} -4,1$ (c 1,0, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,52 (d, 1H, $J_{5,6} = 4,0$ Hz, H-5), 4,82 (t, 1H, $J_{8a,1a} = J_{1a,1b} = 9,0$ Hz, H-1a), 4,69 (dd, 1H, $J_{8a,1b} = 7,0$ Hz, H-1b), 4,49 (ddd, 1H, $J_{8,8a} = 2,5$ Hz, H-8a), 4,02 (t, 1H, $J_{7,8} = 2,5$ Hz, H-8), 3,87 (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,5$ Hz, H-7), 3,77 (dd, 1H, H-6), 3,30 (t, 2H, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, CH₂N), 1,48 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,25 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,81 (t, 3H, $^3J_{H,H} = 7,0$ Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 158,5 (CN), 74,9 (C-5), 70,6 (C-1), 68,8 (C-7), 68,0 (C-8), 67,3 (C-6), 56,2 (C-8a), 42,3 (CH₂N), 30,3 (CH₂CH₂N), 19,1 (CH₂CH₃), 12,8 (CH₃). FABMS: m/z 283 (20, [M + Na]⁺), 261 (100, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₁H₂₀N₂O₅: C, 50,78; H, 7,75; N, 10,77. Encontrado: C, 50,66; H, 8,04; N, 10,71.
- 30 *(5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-octilimino-2-oxaindolizidina (17)*. $[\alpha]_D^{25} -9,8$ (c 0,5, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,52 (d, 1H, $J_{5,6} = 4,0$ Hz, H-5), 4,83 (t, 1H, $J_{8a,1a} = J_{1a,1b} = 8,5$ Hz, H-1a), 4,71 (dd, 1H, $J_{8a,1b} = 8,5$ Hz, H-1b), 4,50 (t, 1H, H-8a), 4,02 (m, 1H, H-8), 3,87 (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,0$ Hz, $J_{7,8} = 2,5$ Hz, H-7), 3,78 (dd, 1H, H-6), 3,30 (t, 2H, $^3J_{H,H} = 6,5$ Hz, CH₂N), 1,52 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,21 (m, 10H, CH₂), 0,78 (t, 3H, $^3J_{H,H} = 6,5$ Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 158,5 (CN), 74,9 (C-5), 70,6 (C-1), 68,8 (C-7), 68,1 (C-8), 67,4 (C-6), 56,2 (C-8a), 43,0 (CH₂N), 31,1, 28,5, 28,3, 28,2, 25,7 (CH₂), 22,0 (CH₂CH₃), 13,4 (CH₃). FABMS: m/z 317 (100, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₅H₂₈N₂O₅: C, 56,94; H, 8,92; N, 8,85. Encontrado: C, 56,78; H, 8,56; N, 8,76.
- 40 *(5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-tiaindolizidina (18)*. $[\alpha]_D^{25} -25,5$ (c 0,5, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 7,38-7,01 (m, 5H, Ph), 5,74 (s a, 1H, H-5), 4,23 (t a, 1H, $J_{8a,1a} = J_{8a,1b} = 9,0$ Hz, 6,5 Hz, H-8a), 4,04 (s a, 1H, H-8), 3,95 (d a, 1H, $J_{6,7} = 9,3$ Hz, H-7), 3,88 (d a, 1H, H-6), 3,30 (t a, 1H, $J_{1a,1b} = 9,0$ Hz, H-1a), 3,20 (t a, 1H, H-1b). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 173,9 (CN), 149,0-122,5 (Ph), 75,8 (C-5), 69,7 (C-7), 68,8 (C-8), 67,9 (C-6), 59,2 (C-8a), 26,7 (C-1). FABMS: m/z 322 (100, [M + Na + 3H]⁺), 297 (10, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₃H₁₆N₂O₄S: C, 52,69; H, 5,44; N, 9,45. Encontrado: C, 52,69; H, 5,38; N, 9,38.
- 45 *(5R,6R,7S,8S,8aR)-S-Butylimino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina (19)*. $[\alpha]_D^{25} -5,5$ (c 0,6, H₂O). $[\alpha]_{546}^{25} -7,3$ (c 0,6, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,61 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,2$ Hz, H-5), 4,51 (t, 1H, $J_{8a,1} = 9,0$ Hz, H-8a), 4,05 (s a, 1H, H-8), 3,93 (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,2$ Hz, $J_{7,8} = 1,8$ Hz, H-7), 3,83 (dd, 1H, H-6), 3,49 (d, 2H, H-1a, H-1b), 3,34 (t, 2H, $^3J_{H,H} = 6,8$ Hz, CH₂N), 1,61 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,33 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,89 (t, 3H, $^3J_{H,H} = 7,3$ Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 170,4 (CN), 76,0 (C-5), 69,1 (C-7), 68,9 (C-8), 67,4 (C-6), 61,8 (C-8a), 50,0 (CH₂N), 30,6 (CH₂CH₂N), 27,4 (C-1), 19,3 (CH₂CH₃), 12,9 (CH₃). FABMS: m/z 299 (55, [M + Na]⁺), 277 (100, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₁H₂₀N₂O₄S: C, 47,81; H, 7,29; N, 10,14. Encontrado: C, 47,69; H, 7,17; N, 9,94.
- 55 *(5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-octilimino-2-tiaindolizidina (20)*. $[\alpha]_D^{25} -14,3$ (c 0,6, MeOH). RMN-¹H (300 MHz, DMSO) δ 5,44 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,4$ Hz, H-5), 4,67 (t a, $J_{8a,1a} = J_{8a,1b} = 8,5$ Hz, 1H, H-8a), 4,03 (t a, 1H, $J_{1a,1b} = 8,5$ Hz, H-1a), 3,69 (s a, 1H, H-8), 3,64 (d a, 1H, $J_{6,7} = 9,6$ Hz, H-7), 3,52 (dd, 1H, H-6), 3,25 (m, 1H, H-1b), 3,09 (m, 2H, CH₂N), 1,49 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,24 (m, 10H, CH₂), 0,84 (t, 3H, $^3J_{H,H} = 6,9$ Hz, CH₃). RMN-¹³C (75,5 MHz, DMSO) δ 170,9 (CN), 76,7 (C-5), 70,0 (C-7), 69,4 (C-8), 68,3 (C-6), 60,2 (C-8a), 52,6 (CH₂N), 31,7, 30,5, 29,2, 29,1 (CH₂), 27,4 (C-1), 22,5 (CH₂CH₃), 14,4 (CH₃). FABMS: m/z 355 (65, [M + Na]⁺), 333 (100, [M + H]⁺). Anal. calc. para C₁₅H₂₈N₂O₄S: C, 54,19; H, 8,49; N, 8,43. Encontrado: C, 53,83; H, 8,39; N, 8,30.
- 60 *Clorhidrato de (5R,6R,7S,8S,8aR)-2-aza-2-bencilimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina (21)*. $[\alpha]_D^{25} +7,0$ (c 0,8, H₂O). F_R 0,32 (CH₃CN-H₂O-AcOH 20:2:1). RMN-¹H (300 MHz, D₂O) δ 7,39-7,27 (m, 5H, Ph), 5,45 (d, 1H, $J_{5,6} = 3,8$ Hz, H-5), 4,41 (s, 2H, CH₂Ph), 4,28 (td, 1H, $J_{8a,1a} = J_{8a,1b} = 9,8$ Hz, $J_{8,8a} = 1,4$ Hz, H-8a), 3,99 (dd, 1H, $J_{7,8} = 2,7$ Hz, H-8), 3,84 (dd, 1H, $J_{6,7} = 10,2$ Hz, H-7), 3,77 (dd, 1H, H-6), 3,68 (t, 1H, $J_{1a,1b} = 9,8$ Hz, H-1a), 3,55 (t, 1H, H-1b). RMN-¹³C (75,5 MHz, D₂O) δ 156,7 (CN), 136,1-127,6 (Ph), 74,8 (C-5), 69,7 (C-7), 68,7 (C-8), 68,4 (C-6),

ES 2 337 435 A1

56,4 (C-8a), 46,4 (CH₂Ph), 42,5 (C-1). FABMS: *m/z* 294 (100, [M - Cl]⁺). HRFABMS: *m/z* 294,144663; calc. para C₁₄H₂₀N₃O₄: 294,145381.

Clorhidrato de (5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-2-aza-3-butylimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina (22). [α]_D +8,0 (c 1,0, H₂O).
5 RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,40 (d, 1H, *J*_{5,6} = 4,0 Hz, H-5), 4,25 (t, 1H, *J*_{8a,1a} = *J*_{8a,1b} = 9,7 Hz, H-8a), 3,98 (m, 1H, H-8), 3,82 (dd, 1H, *J*_{6,7} = 9,8 Hz, *J*_{7,8} = 2,5 Hz, H-7), 3,74 (dd, 1H, H-6), 3,69 (t, 1H, *J*_{1a,1b} = 9,7 Hz, H-1a), 3,56 (t, 1H, H-1b), 3,15 (t, 2H, ³*J*_{H,H} = 7,0 Hz, CH₂N), 1,48 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,26 (m, 2H, CH₂CH₃), 0,81 (t, 3H, ³*J*_{H,H} = 7,3 Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 155,9 (CN), 74,0 (C-5), 69,2 (C-7), 68,1 (C-8), 67,8 (C-6), 55,7 (C-8a), 42,7 (CH₂N), 41,7 (C-1), 30,1 (CH₂CH₂N), 19,2 (CH₂CH₃), 12,9 (CH₃). FABMS: *m/z* 260 (100, [M - Cl]⁺). HRFABMS:
10 *m/z* 260.160864; calc. para C₁₁H₂₂N₃O₄: 260.161031. Anal. calc. para C₁₁H₂₂ClN₃O₄: C, 44,67; H, 7,50; N, 14,21. Encontrado: C, 44,29; H, 7,35; N, 13,93.

Clorhidrato de (5*R*,6*R*,7*S*,8*S*,8*aR*)-2-aza-5,6,7,8-tetrahidroxi-3-octiliminoindolizidina (23). [α]_D -1,9 (c 1,0, H₂O), [α]₅₇₈ -3,9 (c 1,0, H₂O). RMN-¹H (500 MHz, D₂O) δ 5,42 (d, 1H, *J*_{5,6} = 4,0 Hz, H-5), 4,28 (t, 1H, *J*_{8a,1a} = *J*_{8a,1b} = 9,8 Hz, H-8a), 4,01 (s a, 1H, H-8), 3,85 (dd, 1H, *J*_{6,7} = 10,3 Hz, *J*_{7,8} = 2,8 Hz, H-7), 3,77 (dd, 1H, H-6), 3,72 (t, 1H, *J*_{1a,1b} = 9,8 Hz, H-1a), 3,59 (t, 1H, H-1b), 3,18 (t, 2H, ³*J*_{H,H} = 7,0 Hz, CH₂N), 1,53 (m, 2H, CH₂CH₂N), 1,23 (m, 10H, CH₂), 0,80 (t, 3H, ³*J*_{H,H} = 7,0 Hz, CH₃). RMN-¹³C (125,7 MHz, D₂O) δ 155,9 (CN), 74,1 (C-5), 69,2 (C-7), 68,1 (C-8), 67,8 (C-6), 55,7 (C-8a), 42,9 (CH₂N), 41,7 (C-1), 31,0, 28,3, 28,2, 28,0, 25,7 (CH₂), 22,0 (CH₂CH₃), 13,4 (CH₃). FABMS: *m/z* 316 (100, [M + H - Cl]⁺). Anal. calc. para C₁₅H₃₀ClN₃O₄·H₂O: C, 48,71; H, 8,72; N, 11,36. Encontrado: C, 48,84;
20 H, 8,72; N, 11,25.

Ejemplo 2

25 2.1. Preparación de complejos de inclusión entre azúcares sp² y ciclodextrinas

La presencia de un resto hidrófobo en los inhibidores de tipo azúcar sp² 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 α , β o γ 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 W02004087768. El vehículo ciclodextrina preferido según esta invención es β 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.

40 2.2. Cultivo celular

Se cultivaron fibroblastos cutáneos derivados de una persona sana y de pacientes con enfermedad de Gaucher (mutaciones N370S/N370S, F213I/F213I, N188S/G193W y F213I/L444P) a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% usando medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con antibióticos (estreptomina y penicilina) y suero bovino fetal al 10%. Cuando las células se volvieron confluentes al 80%, 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. Se determinaron las concentraciones de proteína en los lisados con un kit de ensayo de microproteína BCA (Pierce).

50 2.3. Ensayo enzimático en lisados

Se determinaron las actividades de β -glucocerebrosidasa en lisados celulares usando β -D-glucopiranosido 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.

60 2.4. Ensayo enzimático en lisados para la determinación de las actividades inhibitoras frente a β -glucocerebrosidasa humana

Para explorar los efectos de los compuestos sobre β -glucocerebrosidasa mutante, se cultivaron células de controles sanos y pacientes con enfermedad de Gaucher durante 4 días en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de compuestos. 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. Se midieron las actividades β -glucocerebrosidasa en lisados celulares.

2.5. Ensayo de β -glucocerebrosidasa intacta para la determinación de actividades inhibitoras frente a β -glucocerebrosidasa humana

El ensayo enzimático *ex vivo* no indicaba si la actividad de enzima lisosómica estaba potenciada por estos compuestos. Para compensar esto, se empleó un “ensayo de enzima intacta” descrito por Sawkar y col. (A.R. Sawkar, W.C. Cheng, E. Beutler, C.H. Wong, W.E. Balch, J.W. Kelly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15428-15433, 2002) en el que se estimó la actividad enzimática celular mediante la aplicación del sustrato (β -D-glucopiranosido conjugado con 4-metilumbeliferona) a células intactas seguido de cuantificación de la 4-metilumbeliferona liberada. En este ensayo se pretrataron las células con o sin una alta concentración (0,5 mM) de conduritól-B-epóxido (CBE), un inhibidor irreversible de la β -glucosidasa lisosómica, antes de exposición al sustrato.

Brevemente, se trataron placas de 24 pocillos con ingredientes activos de la presente invención durante 4 días. Después de lavar con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), se incubaron las células en 80 μ l de PBS y 80 μ l de tampón acetato 0,2 M (pH 4,0). Se inició la reacción mediante la adición de 100 μ l de β -D-glucopiranosido conjugado con 4-metilumbeliferona (5 mM), seguido de incubación a 37°C durante 1 h. Se detuvo la reacción lisando las células mediante la adición de 2 ml de tampón de glicina 0,2 M (pH 10,7) y se cuantificó la liberación de 4-metilumbeliferona. Se realizó cada experimento en paralelo con células preincubadas con o sin CBE 0,5 mM durante 1 h. Se asignó el componente sensible a CBE a la β -glucosidasa lisosómica, mientras que se asignó el componente insensible a CBE a la β -glucosidasa no lisosómica.

2.6 Ensayo de β -galactosidasa intracelular

Se cultivaron fibroblastos en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con suero bovino fetal al 10% y antibióticos, y se recogieron por raspado. Se reunieron mediante centrifugación, se lavaron una vez con disolución salina tamponada con fosfato y se suspendieron en agua. Se sometió a sonicación la suspensión celular y se usó para ensayo enzimático (disolución enzimática). Se realizó el ensayo de β -galactosidasa en placas de 96 pocillos. La mezcla de ensayo enzimático consistía en 10 μ l de disolución enzimática, con o sin ingrediente activo de la invención a una concentración final de hasta 5 μ M, y 10 μ l de disolución de sustrato que contenía 4-metilumbeliferil- β -galactósido 1 mM (Sigma, St Louis, MO) en tampón citrato 0,1 M (pH 4,5) y NaCl 0,1 M. Después de la incubación durante 1 h a 37°C, se terminó la reacción enzimática añadiendo tampón glicina-NaOH 0,2 M (pH 10,7) y se midió la 4-metilumbeliferona liberada mediante fluorometría (excitación 355 nm; emisión 460 nm) como se describe anteriormente (Sakuraba, Aoyagi T, Suzuki Y. *Clin. Chim. Acta* 1982; 125: 275-282). Se determinó la proteína con el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce, Rockford, IL).

Ejemplo 3

Inhibición in vitro de β -glucosidasa y β -galactosidasa humanas por azúcares sp²

Se recoge el resumen de los valores de CI₅₀ seleccionados para la inhibición de β -glucosidasa y β -galactosidasa humanas en la Tabla 1. En general, los azúcares sp² de la invención que tienen un perfil de hidroxilación de complementariedad estructural con D-glucosa (glucomiméticos; por ejemplo, 3, 6 y 14) son inhibidores muy potentes de la β -glucosidasa humana. Aquellos que tienen un perfil de hidroxilación de complementariedad estructural con D-galactosa (galactomiméticos; por ejemplo 17, 20 y 23) son potentes inhibidores tanto de β -glucosidasa como de β -galactosidasa. Es destacable que los azúcares sp² de la invención no inhibían significativamente ni α -glucosidasa ni α -galactosidasa. La inhibición de las β -glucosidasas era al menos 1.000 veces más eficaz, en términos de valores de CI₅₀, en comparación con la inhibición de α -glucosidasas. Los resultados sugieren a los solicitantes que el uso de azúcares sp² de la invención como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el mal funcionamiento de β -glucosidasa y/o β -galactosidasa humanas, tales como enfermedad de Gaucher o gangliosidosis G_{M1}, evitará o reducirá al mínimo los efectos secundarios asociados a interferencias en el funcionamiento de α -glucosidasa y/o α -galactosidasa.

TABLA 1

Actividad inhibidora de algunos de los inhibidores sobre β -glucosidasa y β -galactosidasa humanas en fibroblastos

Inhibidor	β -glucosidasa (CI_{50} , μM) ^a	β - galactosidasa (CI_{50} , μM) ^a
3	5,6	>2500
6	3,5	>2500
14	4,0	>250
17	80,8	100
20	7,1	25
23	5,2	5.0

^aLos datos representan valores medios a partir de tres líneas celulares de control independientes

Ejemplo 4

Potenciación in vitro de la actividad de β -glucosidasa mutante por azazúcares sp²

La actividad β -glucosidasa en Usados obtenidos a partir de fibroblastos de Gaucher con diferentes mutaciones se incrementó al aumentar la concentración de inhibidor en un cierto intervalo. Se recoge el resumen de los datos seleccionados para algunos de los inhibidores en la Tabla 2. Tanto los glucomiméticos como los galactomiméticos de la invención son activos como chaperonas farmacológicas frente a mutantes N370S/N370S, F213I/F213I y N188S/G193W en este ensayo, con potenciaciones de actividad relativa que van hasta 3,4 veces en el caso más favorable. Los resultados anteriores apoyan el concepto terapéutico de los solicitantes de que los inhibidores de tipo azazúcar sp² potentes pueden servir como chaperonas farmacológicas eficaces para potenciar la actividad enzimática mutante de pacientes con enfermedad de Gaucher.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Potenciones de actividad sobre la actividad β -glucosidasa en fibroblastos de Gaucher (lisados) inducidos en presencia de algunas chaperonas farmacológicas de la invención 3 μ M (arriba) y 30 μ M (abajo) para diferentes mutaciones. SP indica sin potenciación

Mutación	Actividad residual ^a	Chaperona farmacológica			
		3	6	17	20
Silvestre (control)	100%				
N370S/N370S (DMN00.41)	6,4%	8,8% (x1,4) 7,8% (x1,2)	8,6% (x1,3) 10,5% (x1,6)	9,1% (x1,4) 8,7% (x1,4)	9,9% (x1,5) 9,4% (x1,5)
N370S/N370S (DMN87.30)	3,5%	5,4% (x1,6) 5,1% (x1,5)	4,3% (x1,2) 3,5% (SP)	3,1% (SP) 4,6% (x1,3)	4,9% (x1,4) 5,7% (x1,6)
F213I/F213I	10,1%	10,3% (SP) 11,0% (x1,1)	10,7% (x1,1) 11,2% (x1,1)	13,1% (x1,3) 12,0% (x1,2)	7,6% (SP) 11,4% (x1,1)
N188S/G193W	10,1%	22,5% (x2,2) 33,9% (x3,4)	31,9% (x3,2) 21,0% (x2,1)	14,0% (x1,4) 16,8% (x1,7)	14,0% (x1,1) 24,3% (x2,4)

^aLa actividad residual se refiere a las células control silvestres.

Ejemplo 5

Potenciación intracelular de la actividad de β -glucosidasa en fibroblastos de pacientes con Gaucher por azazúcares sp^2

Se investigó *ex vivo* la actividad de potenciación intracelular de los inhibidores de tipo azazúcar sp^2 de la invención con fibroblastos procedentes de pacientes con Gaucher con fenotipos N370S/N370S, F213I/F213I, N188S/G193W, N370S/84GG, L444P/RecNcil y F213I/L444P. Se recogen en la Tabla 3 los datos seleccionados para algunos glucomiméticos (compuestos 3, 6 y 14), que se encontró que eran mucho más activos que los galactomiméticos en este ensayo.

Los compuestos 3 y 6 a baja concentración (3 μ M) potenciaban la actividad de fibroblastos de tipo silvestre (control) en un 23,6 y un 6,5%, respectivamente. Concentraciones mayores de 30 μ M anulaban el efecto de potenciación en el control. En contraposición, aumentar la concentración de 3 a 30 mM causaba generalmente una mayor potenciación de la actividad en el caso de β -glucosidasas mutantes, apoyando una alta relación de actividad chaperona frente a inhibidora para esta familia de derivados.

Los glucomiméticos de azazúcar sp^2 de la invención demostraron un impacto significativo sobre la potenciación de la actividad enzimática intracelular en fibroblastos de Gaucher. La actividad enzimática residual en los mutantes aumentaba hasta 3,5 veces en el caso más favorable. La magnitud de la potenciación dependía del fenotipo y de la estructura del compuesto. El compuesto 3, que tiene una isourea cíclica en la estructura, era particularmente eficaz frente

ES 2 337 435 A1

a mutaciones N370S/N370S y F213I/F213I, con elevaciones de actividad residual de 2,7 y 3,5 veces, respectivamente, a una concentración 30 μ M. El compuesto 6, que tiene una isourea cíclica en la estructura, era particularmente eficaz frente a las mutaciones N370S/N370S, F213I/F213I y L444P/RecNcil, con elevaciones de actividad residual de 2,7, 3,5 y 1,3 veces, respectivamente, a una concentración 30 μ M. El compuesto 6, que tiene una isotiourea cíclica en la estructura, era el más eficaz de la serie frente a la mutación N370S/84GG (potenciación de actividad residual elevada en 1,8 veces a una concentración 30 μ M), mientras que el compuesto 14, que tiene una guanidina cíclica en la estructura, era el más eficaz frente a las mutaciones N188S/G193W y F213I/L444P (potenciaciones de la actividad residual elevada en 2,2 veces a una concentración 30 μ M en ambos casos). Se cree que la biodisponibilidad de estos compuestos mejora significativamente por la naturaleza anfífila de las moléculas, lo que posiblemente facilita su paso a través de las membranas celular y del RE, aumentando así la concentración intracelular de estos compuestos.

TABLA 3

Potenciaciones de la actividad sobre la actividad de β -glucosidasa en fibroblastos de Gaucher intactos inducidas en presencia de ciertas chaperonas farmacológicas de la invención a 3 μ M (arriba) y 30 μ M (abajo) para diferentes mutaciones. SP indica sin potenciación

Mutación	Actividad residual ^a	Chaperona farmacológica		
		3	6	14
Silvestre (control)	100%	123,6 (x1,2) 97,0 (SP)	106,5% (x1,1) No determ.	87,7% (SP) 88,9% (SP)
N370S/N370S (DMN00.41)	5,5%	11,3% (x2,0) 14,7% (x2,7)	7,9% (x1,4) No determ.	6,1% (x1,1) 7,2% (x1,3)
N370S/N370S (DMN87.30)	7,9%	14,6% (x1,8) 14,6% (x1,8)	12,0% (x1,5) No determ.	8,0% (SP) 9,5% (x 1,2)
F213I/F213I	11,4%	21,9 (x1,9) 40,0% (x3,5)	23,5% (x2,1) No determ.	13,7%(x1,2) 18,3%(x1,4)
N188S/G193W	27,4%	44,4% (x1,6) 56,0% (x2,0)	50,4% (x1,8) 39,5% (x1,4)	49,3%(x1,8) 65,8%(x2,2)
N370S/84GG	4,9%	7,3% (x1,6) 8,3% (x1,7)	50,4% (x1,8) No determ.	No determ. No determ.
L444P/RecNcil	5,3%	7,0% (x1,3) 5,8% (x1,1)	5,4% (SP) 4,1% (SP)	No determ. No determ.
F213I/L444P	5,3%	No determ. No determ.	No determ. No determ.	7,1% (x1,3) 11,8%(x2,2)

Ejemplo 6

Potenciación intracelular de la actividad de β -galactosidasa en fibroblastos de pacientes con gangliosidosis G_{M1} por azazúcares sp^2

Los azazúcares sp^2 inhibidores de la invención que tienen un perfil de hidroxilación de complementariedad estructural con D-galactosa (galactomiméticos; por ejemplo, los compuestos 15-23) potencian la actividad β -galactosidasa en fibroblastos de células de control así como en fibroblastos de pacientes con gangliosidosis G_{M1} . Como ejemplo, la Tabla 4 recoge los datos correspondientes del compuesto 17, que tiene una funcionalidad isourea cíclica en su estructura. La actividad intracelular β -galactosidasa en el control se elevó un 46% usando una concentración 50 μ M de 17. La actividad β -galactosidasa intracelular en fibroblastos de gangliosidosis G_{M1} se elevó un 17% usando una concentración 50 μ M de 17.

ES 2 337 435 A1

TABLA 4

Potenciaciones de la actividad sobre la actividad β -galactosidasa en fibroblastos silvestres (control) y de gangliosidosis G_{M1} intactos inducidas por la presencia del compuesto 17 a diferentes concentraciones

		Concentración del compuesto 17 (μ M)		
β -galactosidasa	Actividad enzimática (%)	1	10	50
Silvestre (control)	100	100	111	146
G_{M1}	100	106	108	117

Ejemplo 7

Potenciación *in vitro* y *ex vivo* de la actividad de β -glucosidasa mutante por complejos de inclusión de azúcares sp^2 : β CD

Los inhibidores azúcares sp^2 de la invención formaban fácilmente complejos de inclusión con β CD en agua a diferentes proporciones relativas, como se observa a partir de los experimentos de RMN. Los complejos resultantes permitieron aumentar la solubilidad del inhibidor en agua sin observar efectos perjudiciales sobre la actividad inhibidora frente a las glucosidasas humanas.

Se elevó la actividad enzimática en fibroblastos de Gaucher, tanto en lisados como en células intactas, aumentando la concentración de complejos de inclusión de azúcares sp^2 : β CD. Se recogen en la Tabla 5 datos seleccionados de algunos complejos. Los solicitantes encontraron esta formulación particularmente apropiada para compuestos que tienen una baja solubilidad acuosa, tal como es el caso del compuesto 6. Al usar proporciones relativas 1:1 de 6 y β CD a una concentración de 30 μ M, se consiguieron aumentos de hasta 3 veces de la actividad residual de la β -glucosidasa mutante para el fenotipo N370S/N370S.

TABLA 5

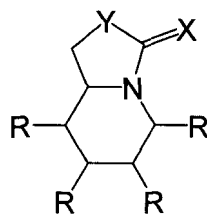
Potenciaciones de la actividad β -glucosidasa en fibroblastos de Gaucher (lisados) o células intactas inducidas en presencia de algunos complejos de sp^2 -azúcares: β CD para diferentes mutaciones. SP indica sin potenciación

Mutación	Complejo de inclusión (proporción relativa de componentes) ^a		
	6: β CD (1:1) ^b	6: β CD (1:2) ^b	17: β CD (1:1.5) ^c
N370S/N370S (DMN00.41)	x2,0 (3 μ M) x2,5 (30 μ M)	X2,0 (3 μ M) x2,5 (30 μ M)	SP (3 μ M) SP (30 μ M)
N370S/N370S (DMN87.30)	x3,0 (30 μ M)	x1,3 (3 μ M) x2,0 (30 μ M)	SP (3 μ M) SP (30 μ M)
F213I/F213I	SP (3 μ M) SP (30 μ M)	SP (3 μ M) SP (30 μ M)	SP (3 μ M) x1,3 (30 μ M)
N188S/G193W	x1,5 (30 μ M)	x1,5 (30 μ M)	x1,3 (3 μ M) x1,5 (30 μ M)
F213I/L444P	No determ. No determ.	No determ. No determ.	SP (3 μ M) x1,3 (30 μ M)

^aLas concentraciones se refieren al componente azúcar sp^2 activo. ^bEn lisados. ^cEn células intactas

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I), o cualquiera de sus sales,



(I)

donde: R es un sustituyente, igual o diferente, y que se selecciona de entre un átomo de H, un grupo hidroxilo (-OH) o un grupo OR²; donde

R² es un grupo seleccionado de entre acilo, sustituido o no sustituido, alquilo (C₁-C₁₈), sustituido o no sustituido, arilo, sustituido o no sustituido, aralquilo, sustituido o no sustituido, amino (NH₂), acetamido (NHAc), o un NHR³; donde

R³ es un grupo seleccionado de entre acilo, sustituido o no sustituido, alquilo (C₁-C₁₈), sustituido o no sustituido, arilo, sustituido o no sustituido o aralquilo, sustituido o no sustituido.

Y se selecciona de entre un O, NH ó S; y

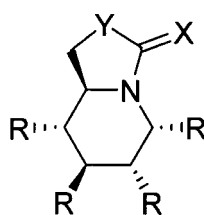
X es el grupo -NR¹. Donde R¹ se selecciona del entre un grupo alquilo (C₁-C₁₈), sustituido o no sustituido, un grupo arilo (C₅-C₁₈), sustituido o no sustituido, o un grupo aralquilo, sustituido o no sustituido.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde Y es un átomo de oxígeno.

3. Compuesto según la reivindicación 1 donde Y es NH.

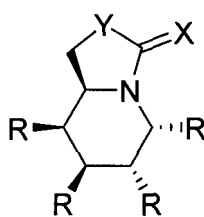
4. Compuesto según la reivindicación 1, donde Y es un átomo de azufre.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, de fórmula general (Ia'):



Ia'

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, de fórmula general (Ib'):



Ib'

ES 2 337 435 A1

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R es OH.
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde R¹ es un grupo alquilo (C₃-C₉).
- 5 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde R¹ es un grupo arilo (C₅-C₇).
10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho compuesto es una sal de un clorhidrato.
- 10 11. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula:
- a. (5R,6R,7S,8R,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-oxaindolizidina
- b. (5R,6R,7S,8R,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-butilimino-2-oxaindolizidina
- 15 c. (5R,6S,7R,8R,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-2-oxa-3-octilimino-indolizidina.
- d. (5R,6R,7S,8R,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-tiaindolizidina.
- 20 e. (5R,6R,7S,8R,8aR)-3-Butilimino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina
- f. (5R,6R,7S,8R,8aR)-Tetrahidroxi-3-octilimino-2-tiaindolizidina
- g. (5R,6R,7S,8R,8aR)-3-[2'-N,N-Bis-(2-hexanamidoetil)aminoetil]-imino]-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina
- 25 h. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8R,8aR)-3-(8-aminoetil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina
- i. (5R,6R,7S,8R,8aR)-3-(4-Adamantano-1-ilcarboxamidobutil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina.
- 30 j. (5R,6R,7S,8R,8aR)-3-(11-Azida-3,6,9-trioxaundecil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina
- k. (5R,6R,7S,8R,8aR)-3-(11-Adamantano-1-ilcarboxamido-3,6,9-trioxaundecil)imino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina.
- 35 l. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8R,8aR)-2-aza-3-bencilimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina.
- m. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8R,8aR)-2-aza-3-butilimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina.
- 40 n. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8R,8aR)-2-aza-5,6,7,8-tetrahidroxi-3-octiliminoindolizidina.
- o. (5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-fenilimino-2-oxaindolizidina.
- p. (5R,6R,7S,8S,8aR)-3-Butilimino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-oxaindolizidina.
- 45 q. (5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-octilimino-2-oxaindolizidina.
- r. (5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-S-fenilimino-2-tiaindolizidina.
- s. (5R,6R,7S,8S,8aR)-3-Butilimino-5,6,7,8-tetrahidroxi-2-tiaindolizidina.
- 50 t. (5R,6R,7S,8S,8aR)-5,6,7,8-Tetrahidroxi-3-octilimino-2-tiaindolizidina.
- u. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8S,8aR)-2-aza-3-bencilimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina.
- 55 v. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8S,8aR)-2-aza-3-butilimino-5,6,7,8-tetrahidroxindolizidina; o
- w. Clorhidrato de (5R,6R,7S,8S,8aR)-2-aza-5,6,7,8-tetrahidroxi-3-octiliminoindolizidina.
- 60 12. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula general (I) que comprende:
- a. introducir un grupo amino en la posición C-5 del correspondiente azúcar en forma de furanosa;
- b. cerrar un anillo de cinco miembros entre las posiciones C-5 y C-6 mediante un segmento de tipo pseudoamida del compuesto obtenido en el paso (a); y
- 65 c. transposición del anillo de furano a un ciclo de piperidina fusionado con el anillo de pseudoamida cíclico de cinco miembros obtenido en el paso (b).

ES 2 337 435 A1

13. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica.

14. Uso del compuesto de fórmula general (I) para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad relacionada con β -glucosidasa y/o β -galactosidasa mutadas humanas.

5

15. Uso del compuesto según la reivindicación 14, donde las enfermedades son enfermedad de Gaucher, gangliosidosis GM1 o enfermedad de Morquio B.

16. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los compuestos de fórmula general (I).

10

17. Composición farmacéutica según la reivindicación 16, que además comprende otro componente activo y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

18. Composición farmacéutica según la reivindicación 17, donde el vehículo es una ciclodextrina o cualquiera de sus derivados.

19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, donde el vehículo es β -ciclodextrina.

20

20. Procedimiento *in vitro* para potenciar la actividad de una enzima glicosidasa, que comprende poner en contacto la proteína con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula general (I).

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 337 435

② N° de solicitud: 200802988

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.10.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCIA MORENO, M.I.: "Synthesis and evaluation of isourea-type glycomimetics related to the indolizidine and trehazolin glycosidase inhibitor families". J. Org. Chem, 2003, vol. 68, páginas 8890-8901, página 8893, esquemas 1 y 3, página 8896, tab. 1.	1,2,5-20
X	GARCIA MORENO, M.I.: "Castanospermine-trehazolin hybrids: a new family of glycomimetics with tuneable glycosidase inhibitory properties". Chem. Comm. 2002, n° 8, páginas 848-849, página 1, y compuesto 11.	1,2,5-20
X	US 5131946 A (FRANKE ET AL) 21.07.0992, columnas 9-12, tabla.	1,2,4,9
X	EP 440319 A1 (SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT) 07.08.1991, reivindicación 5.	1,4,9
X	ARYA. V. et al.: "Synthesis of new heterocycles: part XVI-Synthesis of thiazolo (3,4 alfa) pyridines, pyrido (1,3)thiazines & related heterocycles". Indian Journal of Chemistry, 1976, vol. 14B, páginas 770-772, página 770, fórmula II.	1,4,9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

08.02.2010

Examinador

H. Aylagas Cancio

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 498/04 (2006.01)

C07D 513/04 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/4355 (2006.01)

A61K 31/4365 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

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

C07D, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, NPL, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,4-20.	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,4-20.	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	J. Org. Chem, vol. 68, páginas 8890-8901	2003
D02	Chem. Comm. nº 8, páginas 848-849	2002
D03	US 5131946 A	21-07-1992
D04	EP 440319 A1	07-08-1991
D05	Indian Journal of chemistry, vol.s 14B, páginas 770-772.	1976

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a compuestos de fórmula I con actividad inhibidora de enzimas glicosidasas, procedimiento de obtención y su uso en el tratamiento de enfermedades en que se producen trastornos de almacenamiento lisosómico tales como la enfermedad de Gaucher, gangliosidosis o la enfermedad de Morquio B.

Los documentos D1 y D2 se refieren a inhibidores de glicosidasas que son compuestos en los que se ha modificado el anillo de un compuesto que es la castanospermina (ver documento D2, compuesto 1). Estos compuestos son los compuestos 21-23, página 8893 del documento D1 y compuesto 11 del documento D2. El procedimiento de obtención de dichos compuestos aparece descrito en dichos documentos (ver esquema 1 de los documentos D1 y D2). Y así mismo se describe su uso como inhibidores de glicosidasas (ver tabla I del documento D1).

Por lo tanto, las reivindicaciones 1, 2, 5-20 carecen de novedad y de actividad inventiva según los documentos D1 y D2.

Los compuestos descritos en el documento D3 entran dentro del ámbito de los compuestos de las reivindicaciones 1, 2, 4 y 9. (ver tabla columnas 9-12 cuando W es oxígeno o azufre y D no existe). Los compuestos del documento D4 cuando A es -CH₂-CH₂- y la el compuesto que corresponde a la fórmula II de la página 770 del documento D5 afectan a los compuestos de las reivindicaciones 1, 4 y 9.

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados las reivindicaciones 1, 2, 4-20 carecen de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los artículos

6.1 y 8.1 de la ley de patentes 11/1986.

Ninguno de los documentos citados divulga los compuestos de la reivindicación 3 en los que el sustituyente Y es NH. Así mismo no existen sugerencias que dirijan a un experto en la materia hacia este tipo de compuestos con actividad inhibidora de enzimas glicosidasas.

Por lo tanto, la reivindicación 3 tiene novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la ley de patentes 11/1986.