

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2007.06.25	(73) Titular(es): AMICUS THERAPEUTICS, INC. 6 CEDAR BROOK DRIVE CRANBURY, NJ 08512 US
(30) Prioridade(s): 2006.06.23 US 815952 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2009.04.01	(72) Inventor(es): BRANDON WUSTMAN US
(45) Data e BPI da concessão: 2012.05.02 148/2012	(74) Mandatário: MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA PT

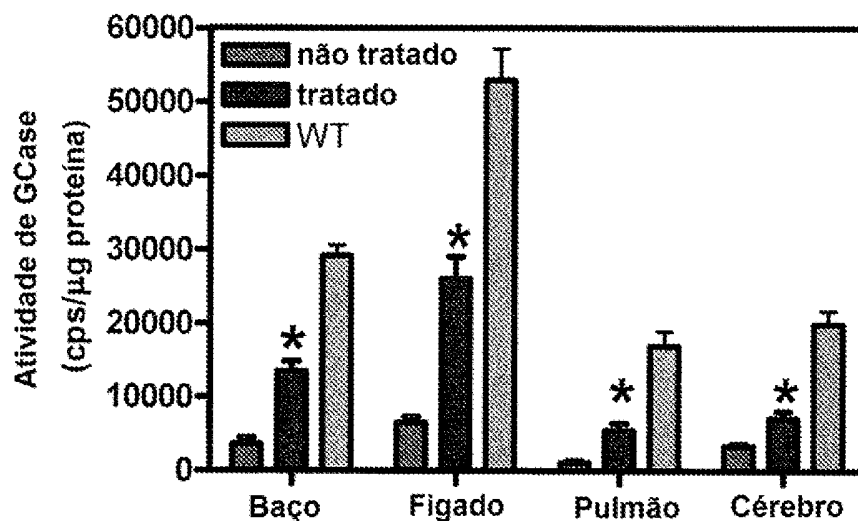
(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS ATRAVÉS DO AUMENTO DA ATIVIDADE DA -GLUCOCEREBROSIDASE**

(57) Resumo:

É PROPORCIONADO UM MÉTODO PARA AUMENTAR A ESTABILIDADE DA  GLUCOCEREBROSIDASE DE TIPO SELVAGEM. TAMBÉM SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS DE TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UM INDIVÍDUO POSSUINDO UMA DOENÇA NEUROLÓGICA NA QUAL SERIA BENÉFICO UM AUMENTO DA EXPRESSÃO OU ATIVIDADE DA -GLUCOCEREBROSIDASE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL. ESTE MÉTODO COMPREENDE ADMINISTRAR UMA QUANTIDADE EFICAZ DE UMA CHAPERONA FARMACOLÓGICA PARA A  GLUCOCEREBROSIDASE, NA CONDIÇÃO DE QUE O INDIVÍDUO NÃO POSSUA UMA MUTAÇÃO NO GENE QUE CODIFICA A -GLUCOCEREBROSIDASE. ALÉM DISSO, SÃO PROPORCIONADOS INIBIDORES DE -GLUCOCEREBROSIDASE QUE FORAM IDENTIFICADOS COMO CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS ESPECÍFICAS E QUE SE DEMONSTROU QUE AUMENTAM A ATIVIDADE DA  GLUCOCEREBROSIDASE IN VIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.

RESUMO

"MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS ATRAVÉS DO AUMENTO DA ATIVIDADE DA β -GLUCOCEREBROSIDASE"



É proporcionado um método para aumentar a estabilidade da β -glucocerebrosidase de tipo selvagem. Também são proporcionados métodos de tratamento e/ou prevenção de um indivíduo possuindo uma doença neurológica na qual seria benéfico um aumento da expressão ou atividade da β -glucocerebrosidase no sistema nervoso central. Este método compreende administrar uma quantidade eficaz de uma chaperona farmacológica para a β -glucocerebrosidase, na condição de que o indivíduo não possua uma mutação no gene que codifica a β -glucocerebrosidase. Além disso, são proporcionados inibidores de β -glucocerebrosidase que foram identificados como chaperonas farmacológicas específicas e que se demonstrou que aumentam a atividade da β -glucocerebrosidase in vivo no sistema nervoso central.

DESCRIÇÃO

"MÉTODO PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS ATRAVÉS DO AUMENTO DA ATIVIDADE DA β -GLUCOCEREBROSIDASE"

Este pedido reivindica a prioridade do Pedido de Patente Provisório U.S. com o nº de Série 60/815,952, apresentado em 23 de Junho de 2006, cuja divulgação é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a métodos para aumentar a atividade da enzima lisossômica β -glucocerebrosidase para o tratamento de α -sinucleinopatias tais como a doença de Parkinson, e para o tratamento da Doença de Niemann-Pick de tipo C. A invenção proporciona chaperonas farmacológicas específicas para a β -glucocerebrosidase, as quais aumentam o trânsito citosólico e a atividade enzimática da β -glucocerebrosidase, presumivelmente estabilizando a enzima.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Agregação de Proteína Em Doenças Neurodegenerativas

Nos neurónios, os sistemas proteossómico e lisossómico trabalham em uníssono para manter a homeostasia de proteínas degradando proteínas danificadas, incorretamente dobradas ou em excesso. Muitas doenças neurodegenerativas associadas à agregação patológica de proteínas ou lípidos exibem uma função proteossómica e lisossómica enfraquecida, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença de Gaucher, Tay Sachs, Farber, Niemann-Pick de Tipos A, B & C, Gangliosidose G_{M1} , Gangliosidose G_{M2} e MPS-I. A agregação de proteína nos neurónios é particularmente

terrível, uma vez que os neurónios são incapazes de regenerar após a neurodegenerescência ou apoptose que resulta de stress neuronal ou outras causas associadas à agregação.

Agregação de proteína e lisossomas. O sistema lisossómico é crítico na prevenção da acumulação de agregados de proteína que são difíceis de degradar pelos proteassomas. A importância dos lisossomas na degradação de agregados de proteína é apoiada por um grande número de relatórios de proteínas lisossómicas e marcadores autofágicos que se co-localizam na mesma estrutura que os agregados de proteína encontrados em cérebros humanos (Bjørkøy et al., *J Cell Biol.* 2005;171(4):603-14; Tribl et al., *Mol Cell Proteomics*, 2005; 4(7): 945-57; Wong et al., *Mol Genet Metab*, 2004. 82(3): 192-207; Zhou, *J Biol Chem.* 2004. 279(37): 39155-64). Em particular, a neutralização dos compartimentos ácidos (lisossomas) leva à acumulação de agregados de α -sinucleína (α -syn) e exacerba a toxicidade da α -syn em células neuronais pós-mitóticas (Lee, *J Neurosci*, 2004; 24(8): 1888-96). A agregação patológica de α -syn está associada a doença de Parkinson e outras α -sinucleinopatias. Finalmente, foi descrita disfunção lisossómica em modelos de rato transgénico que acumulam α -syn (Meredith et al., *Brain Res*, 2002; 956(1):156-65; Rockenstein et al., *J Neurosci Res*, 2005; 80(2): 247- 59).

Agregação de proteína e proteassomas. O proteassoma é intrínseco na degradação de proteínas citosólicas. A degradação mediada por proteassomas começa com a modificação de substratos por cadeias de poliubiquitina, que visam a proteólise pelo proteassoma 26S, um complexo de protease multicatalítico. Estudos revelaram que a ubiquitina é um componente de muitos dos corpos de inclusão

filamentosos característicos de doenças neurodegenerativas, sugerindo a ativação de uma resposta neuronal comum neste tipo de processo patológico (Lowe et al., *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1990; 16: 281 - 91). Estudos genéticos, incluindo a identificação de mutações em genes associados a Parkinson familiar (SNCA) e a presença de inclusões citoplasmáticas proteicas em neurónios dopaminérgicos nigrais disponíveis em casos raros de Parkinson, sugeriram um papel importante para o sistema ubiquitina-proteassoma e a degradação de proteína aberrante nesta doença (Betarbet et al., *Exp Neurol.* 2005;191 Suppl 1 :S 17-27).

Uma vez que está bem estabelecido que a acumulação ou agregação de um grande número de proteínas e lípidos mal dobrados numa célula, incluindo neurónios, leva a stress do retículo endoplasmático e célula, quantidades aumentadas de poliubiquitina, uma proteína de "stress" celular, sugere que o sistema proteossómico está sobreativado. No entanto, uma teoria alternativa para a rutura da homeostasia neuronal nas doenças de agregação do SNC é devido à supressão da via ubiquitina/proteassoma (Rocca et al., *Molecular Biology of the Cell.* 2001; 12: 1293-1301). Estudos *in vivo* e *in vitro* ligaram a agregação de α -syn e o stress oxidativo, ambos traços distintivos da doença de Parkinson, a um sistema de ubiquitina-proteassoma comprometido e à patogénese da doença de Parkinson. (Lev et al., *Neurosci Lett.* 2006; 399(1-2):27-32). Especificamente, a exposição a espécies reativas de oxigénio (ROS) combinada com inibição proteossómica aumentou a formação de agregados de α -syn relativamente à inibição proteossómica sozinha. Além do mais, defeitos estruturais e funcionais nos proteassomas 26/20S, com acumulação e agregação de proteínas anormais potencialmente citotóxicas, foram identificados na substantia nigra *pars compacta* de doentes

com doença de Parkinson esporádica (McKnaught et al, *Ann Neurol.* 2003; 53 Suppl 3:S73-84). Além disso, mutações na SNCA que originam uma dobragem incorreta da proteína e resistência à degradação proteossômica estão muito associadas a doença de Parkinson familiar. Também foi mostrado que a α -syn agregada inibe a função proteossômica por interação com a S6', uma subunidade do proteassoma (Snyder et al., *J Mol Neurosci.* 2004; 24(3):425-42). Finalmente, a função proteossômica está diminuída nos cérebros de indivíduos com doença de Parkinson bem como nos cérebros de indivíduos e animais que carecem de parkina, a qual é uma ligase da ubiquitina E3 e é uma parte integrante do sistema proteossômico de ubiquitina.

Assim, um defeito no manuseamento de proteínas pelo proteassoma parece ser um fator comum na forma esporádica e nas várias formas familiares da doença de Parkinson. Esta mesma conclusão foi retirada a partir de experiências em que foram adicionadas associações de um inibidor de proteassoma com agentes que induzem a dobragem incorreta de proteínas a uma cultura de neurónios dopaminérgicos (Mytilineou et al., *J Neural Transm.* 2004; 111(10-11):1237-51). A perda preferencial de neurónios dopaminérgicos e a morte celular foram acentuadamente aumentadas quando foram combinados os dois.

Mesmo níveis baixos de inibição de proteassoma podem levar a uma regulação negativa do sistema ubiquitina proteassoma e à ativação do sistema lisossômico ou da resposta autofágica (Ding et al., *J Neurochem*, 2003; 86(2):489-97; Iwata et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102(37):13135-40; Butler et al., *Rejuvenation Res.* 2005; 8(4):227-37). Foi proposto que um desequilíbrio entre as chaperonas de ER endógenas e as proteínas danificadas/desnaturadas/

incorretamente dobradas, que levam à acumulação das últimas, pode resultar em senescência, inibição do proteassoma (que conduz à apoptose) ou necrose, dependendo da gravidade do desequilíbrio (Soti et al., *Aging Cell*. 2003; 2; 39-45). Esta hipótese é referida como a "hipótese de acumulação de proteína tóxica."

Defeitos de Lípidos e Doenças Neurodegenerativas

É bem conhecido que a acumulação de lípidos está associada a neurodegenerescência, como é evidente a partir dos distúrbios de depósito lisossómico tais como Gaucher, Tay Sachs, Farber, Niemann-Pick Tipos A, B e C, Gangliosidose G_{M1} e doenças MPS-I. No entanto, também foi observada outras acumulações de lípidos em doenças neurológicas nas quais não existem deficiências nas hidrolases lisossómicas. Como um exemplo, as acumulações patológicas de lactosilceramida, GlcCer, ganglioside G_{M2} e asialo- G_{M2} estão presentes na doença de Niemann-Pick de Tipo C, a qual é uma doença de depósito lisossómico de colesterol que não está associada a esfingomielinase ácida deficiente devido a mutações de sentido invertido no gene que codifica a enzima (Vanier et al., *Brain Pathology*. 1998; 8: 163-74). Esta acumulação pode ser provocada por outros mecanismos, tais como trânsito anómalo de lípidos. Um sistema de trânsito endossomal saudável é crítico para a função neuronal (Buckley et al., *J Physiol*, 2000; 525(Pt 1):11-9). A rutura do metabolismo de glicosfingolípidos, incluindo GlcCer, impede o trânsito celular e origina a sequestração e acumulação de colesterol (Pagano et al., *Traffic*, 2000; 1(11): 807-15; Sillence et al., *J Lipid Res*, 2002; 43(11):1837-1845; Helms et al., *Traffic*, 2004; 5(4):247-54). Os glicolípidos acumulados formam "jangadas lipídicas" que podem sequestrar proteínas importantes para a manutenção do trânsito normal no sistema endossomal

(Pagano, *supra*). Além do mais, o trânsito anômalo de lípidos observado nos fibroblastos de células de Niemann-Pick de Tipo C pode ser invertido por tratamento com um inibidor potente da biossíntese de glicosfingolípidos (Lachmann et al., *Neurobiol Dis*, 2004; 16(3):654- 8), realçando ainda mais o envolvimento de GlcCer e outros lípidos na patologia desta doença.

Além disso, a associação com jangadas lipídicas é necessária para a localização normal de α -syn na sua localização celular nativa, as sinapses (Fortin et al., *J Neurosci*, 2004; 24(30):6715-23). Mutações associadas à patologia da doença de Parkinson rompem esta associação. Assim, alterações na composição da jangada lipídica que rompem esta associação também poderiam contribuir para a doença de Parkinson impedindo a localização e distribuição normal da α -syn.

Glicosfingolípidos Ajudam a Estimular a Agregação de Proteínas

A alfa-sinucleína tem uma afinidade elevada para os gangliosídeos e a α -syn de tipo selvagem forma complexos estáveis a SDS com gangliosídeos que têm GlcCer no seu núcleo (Zimran et al., *N Engl J Med*, 2005; 352(7):728-31). As formas solúveis de α -syn e da proteína β -amilóide ligam-se fortemente a GMI, estimulando potencialmente a agregação (Yanagisawa et al., *Neurobiol Aging*, 1998; 19(1 Suppl):S65-7; Yanagisawa et al., *Nat Med*, 1995; 1(10):1062-6; Lee et al., *J Biol Chem*, 2002; 277(1): 671-8; Hayashi et al., *J Neurosci*. 2004; May 19;24(20):4894-902). Recentemente, experiências com base em células demonstraram que mutações da enzima lisossômica β -glucocerebrosidase (GCase) pode aumentar o risco para o desenvolvendo de doença de

Parkinsons (Aharon-Peretz, et al., *N Engl J Med*, 2004; 351(19): 1972-7; Goker-Alpan et al., *J Med Genet*, 2004; 41(12):937-40; Clark et al., *Mov Disord*, 2005; 20(1):100-3; Eblan et al., *Mov Disord*, 2005; 31 :31). Embora os transportadores de alelos mutantes não pareçam acumular níveis significativos de glucosilceramida (histologicamente), alterações subtis no metabolismo de glicosfingolípídeos poderiam aumentar o risco de doença de Parkinson nestes indivíduos, por exemplo, rompendo as respostas autofágicas para agregados normais ou inibindo os proteassomas. Além disso, doentes com doença de Gaucher de tipo 1 (devido a deficiências de GCase) e parkinsonismo/demência exibiram inclusões positivas de α -syn nos neurónios CA2-4 do hipocampo; um doente tinha corpos de Lewy de tipo tronco cerebral e tipo cortical, e um tinha perda neuronal acentuada de neurónios de substantia nigra (Wong et al., *Mol. Genet. Metabol.* 2004; 38: 192-207).

Analogamente, *in vitro*, vesículas unilamelares grandes de lípidos cerebrais associaram-se prontamente a fragmentos de exão 1 de huntingtina N-terminais solúveis, a proteína patológica que se acumula na doença de Huntington, e estimularam a fibrilogénese de agregados de huntingtina mutantes (Suopanki et al., *J Neurochem.* 2006; 96(3):870-84). Finalmente, num modelo da doença de Sandhoff em rato (Gangliosidose G_{M2}), as α -syn e β -sinucleína acumulam-se nos neurónios para além dos gangliosídeos G_{M2} (Suzuki et al., *Neuroreport.*, 2003; 14(4):551-4). Assim, a manipulação do metabolismo de gangliosídeos poderia afetar a propensão das proteínas para formar agregados.

O anterior sugere que as interações lipídicas *in vivo* poderiam influenciar a dobragem incorreta de proteínas e

podem desempenhar um papel significativo na patogénese de doenças neurodegenerativas.

Acumulação de Lípido e/ou Proteína e Inflamação

Tem sido crescentemente reconhecido que a inflamação desempenha um papel importante na patogénese da doença de Parkinson. Estigmas inflamatórios e imunes, ou até mesmo autoimunes, foram descritos em cérebros post-mortem de doentes com doença de Parkinson. Os agregados de alfa-syn poderiam ativar as células microgliais, resultando em inflamação crónica que leva a neurodegenerescência (Wersinger et al., *Curr Med Chem.* 2006;13(5):591-602).

Chaperonas Farmacológicas Derivadas de Inibidores Enzimáticos Específicos Resgatam Enzimas Mutantes e Melhoram as Enzimas de Tipo Selvagem

Foi anteriormente demonstrado que a ligação de inibidores de molécula pequena de enzimas associadas a LSDs podem aumentar a estabilidade de enzimas mutantes e das correspondente enzimas de tipo selvagem (ver Patente U.S. nº 6,274,597; 6,583,158; 6,589,964; 6,599,919; 6,916,829 e 7,141,582, todas aqui incorporadas por referência). Em particular, descobriu-se que administração de derivados de molécula pequena de glucose e galatose, os quais são inibidores competitivos seletivos, específicos para várias enzimas lisossómicas alvo, *aumentaram* eficazmente a estabilidade das enzimas em células *in vitro* e aumentaram, desse modo, a quantidade da enzima na lisossoma como determinada medindo a atividade enzimática. Assim, ao aumentar a quantidade de enzima no lisossoma, é espertado que aumente a hidrólise dos substratos de enzima. A teoria original por detrás desta estratégia foi como se segue: uma

vez que a enzima mutante é instável no ER (Ishii et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), a proteína enzimática é atrasada na via de transporte normal (ER -> aparelho de Golgi -> endossomas -> lisossoma) e degradada prematuramente. Por conseguinte, um composto que se ligue e aumente a estabilidade de um enzima mutante pode servir como uma "chaperona" para a enzima e aumentar a quantidade que pode sair do ER e dirigir-se para os lisossomas. Além disso, uma vez que a dobragem e trânsito de algumas proteínas de tipo selvagem é incompleto, com até 70% de algumas proteínas de tipo selvagem a serem degradadas nalguns casos antes de atingir a sua localização celular final, as chaperonas podem ser utilizadas para estabilizar as enzimas de tipo selvagem e aumentar a quantidade de enzima que pode sair do ER e transitar para as localizações celulares nativas.

Uma vez que são conhecidos alguns inibidores de enzima que se ligam especificamente ao centro catalítico da enzima (o "sítio ativo"), resultando na estabilização da conformação da enzima *in vitro*, foi proposto, um pouco paradoxalmente, que estes inibidores eram chaperonas eficazes que poderiam ajudar a restabelecer a saída do ER, o trânsito para os lisossomas e a atividade hidrolítica. Estas chaperonas farmacológicas específicas foram designadas "chaperonas específicas para o sítio ativo (ASSCs)" ou "chaperonas farmacológicas específicas" uma vez que se ligam no sítio ativo da enzima de um modo específico e não têm um efeito geral em todas as proteínas.

Um método de tratamento da doença de Parkinson em indivíduos possuindo mutações na GCase lisossômica e, por isso, uma redução na atividade de GCase, é descrito no pedido U.S. copendente com o n° de Série 11/449,528 apresentado em 8 de Junho de 2006. Embora o resgate de

enzimas lisossómicas mutantes possa inverter a patologia de certas doenças, continua a existir uma necessidade para reduzir a patologia de doenças que não envolvem mutações de enzimas lisossómicas particulares, mas para as quais seria benéfico um aumento nas enzimas lisossómicas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um tratamento ou prevenção de um distúrbio neurológico num indivíduo, em que o distúrbio neurológico está associado a agregação de proteínas e lípidos nas células do sistema nervoso central, administrando uma quantidade eficaz de uma chaperona farmacológica específica para a GCase, mas em que o distúrbio neurológico não está associado a uma GCase mutante.

Numa forma de realização, a presente invenção proporciona um método para melhorar a dobragem e processamento intracelular e, desse modo, a atividade da GCase de tipo selvagem expondo os neurónios a uma quantidade eficaz de uma chaperona farmacológica específica para a GCase.

Num aspeto desta forma de realização, o distúrbio neurológico a ser tratado é uma α -sinucleinopatía.

Em formas de realização específicas, o α -sinucleinopatía é doença de Parkinson, Doença de Corpo de Lewy, Atrofia Sistémica Múltipla, doença de Hallervorden-Spatz ou Demência Frontotemporal.

Noutro aspeto desta forma de realização, o distúrbio neurológico a ser tratado é a doença de Parkinson.

Noutro aspeto desta forma de realização, o distúrbio neurológico a ser tratado é doença de Niemann-Pick de Tipo C (NPCD).

Numa forma de realização da invenção, a chaperona farmacológica é um inibidor reversível de GCase.

Numa forma de realização específica deste aspeto da invenção, a chaperona farmacológica é isofagomina ou um seu sal.

Numa outra forma de realização, o aumento na atividade enzimática da GCase é pelo menos, mas não está limitado a, 1,2, 1,5, 2, 3 ou 5 vezes em relação aos níveis de base.

Numa forma de realização alternativa na qual o distúrbio neurodegenerativo é doença de Niemann-Pick de Tipo C, o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo consistindo de alopregnanolona, uma estatina, um fenofibrato, niacina; ezetimiba, uma resina de ligação, uma chaperona farmacológica específica para a β -hexosaminidase A ou β -galactosidase ácida, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, nagstatina, 4-epi-isofagomina e 1-desoxigalatonojirimicina.

A presente invenção também se refere ao tratamento ou prevenção um distúrbio neurodegenerativo num indivíduo que possui ou em risco de desenvolver um distúrbio neurodegenerativo, em que o indivíduo não tem uma mutação no gene que codifica a GCase, administrando ao indivíduo uma chaperona farmacológica que se liga à GCase.

A invenção também proporciona uma terapia de associação com a chaperona de GCase e outros agentes terapêuticos para o

tratamento do distúrbio neurológico. Além disso, a invenção proporciona composições de matéria compreendendo uma mistura de uma chaperona farmacológica de GCase e outro agente terapêutico. Numa forma de realização na qual o distúrbio neurológico é Doença de Parkinsons, parkinsonismo ou Demência de Corpo de Lewy, o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo consistindo de levodopa, um anticolinérgico, um inibidor de Catecol-O-metil-transferase (COMT), um agonista do recetor de dopamina, um inibidor de monoamina-oxidase (MAOI), um inibidor de descarboxilase periférica e um anti-inflamatório.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O arquivo da patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado a cores. As cópias da patente ou publicação de pedido de patente com o(s) desenho(s) a cores serão fornecidos pelo Instituto após pedido e pagamento da taxa necessária.

Figura 1. Figura 1 mostra o aumento da GCase no baço, pulmão, cérebro e fígado de ratos C57BL6 normais tratados com 200 mg/kg/dia de tartrato de isofagomina (IFG; AT2101) durante 4 semanas.

Figura 2. Figura 2 mostra as alterações na atividade da GCase após administração de tartrato de isofagomina a voluntários saudáveis.

Figura 3A-C. Figura 3 mostra os resultados da revelação imuno-histoquímica para a α -sinucleína no córtex de ratos transgênicos que sobreexpressam a α -sinucleína tratados ou não tratados com tartrato de IFG. Figura 3A mostra os resultados de um controlo tratado com veículo; Figuras 3B e

3C mostram os resultados de ratos tratados diariamente com 2 mg/kg durante 3 meses.

Figura 4A-C. Figura 4 mostra resultados qualitativos da revelação imuno-histoquímica para a α -sinucleína no hipocampo de ratos transgênicos que sobreexpressam a α -sinucleína tratados ou não tratados com tartrato de IFG. Figura 4A mostra os resultados de um controle tratado com veículo; Figuras 4B e 4C mostram os resultados de ratos tratados diariamente com 2 mg/kg durante 3 meses.

Figura 5A-D. Figura 5 mostra resultados qualitativos da revelação imuno-histoquímica para a α -sinucleína em amostras pré-tratadas com Proteinase K do cérebro de um rato transgênico.

Figura 6A-B. Figura 6 mostra resultados quantitativos da revelação imuno-histoquímica para a α -sinucleína no córtex (A) e hipocampo (B) de ratos transgênicos que sobreexpressam a α -sinucleína tratados ou não tratados com IFG às concentrações indicadas durante 3 meses. Foi avaliado o número de células positivas para α -sinucleína por mm.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção refere-se à constatação de que uma chaperona farmacológica específica pode aumentar a atividade da GCase de tipo selvagem até um nível suficiente para inibir, até mesmo ao ponto de prevenir, a patologia associada à acumulação de proteínas e lípidos substratos agregados. Isto, por sua vez, pode ser utilizado para tratar fatores de risco, condições ou distúrbios

neurológicos associados à agregação daquelas proteínas e lípidos substrato nas células do sistema nervoso central.

Especificamente, a presente invenção proporciona um método de administração de uma ou mais chaperonas farmacológicas para a GCase a um indivíduo diagnosticado, em risco ou suspeito de ter um distúrbio neurológico que poderia ser favorecido pelo aumento da atividade de GCase. As chaperonas farmacológicas adequadas incluem qualquer/quaisquer composto(s) que, após administração a um indivíduo, se ligarão especificamente à GCase, aumentarão a estabilidade e trânsito da GCase e, desse modo, aumentarão a atividade da GCase no lisossoma, na condição de que a doença neurológica ou distúrbio não esteja associado a uma mutação no gene que codifica a GCase. O melhoramento da função enzimática nas células do sistema nervoso central, presumivelmente em consequência de uma forma de GCase intracelular mais estável, aumenta o metabolismo dos péptidos associados a GCase e dos substratos lipídicos de GCase nas células, o que é útil no tratamento de distúrbios neurológicos tais como doença de Parkinson e doença de Niemann-Pick de Tipo C, nenhuma das quais está associada a atividade deficiente da GCase.

A invenção baseia-se, em parte, na descoberta de uma aptidão da chaperona farmacológica para promover uma atividade da proteína de tipo selvagem significativamente aumentada em humanos. Este fenómeno é extremamente específico para a proteína especificamente ligada pela chaperona farmacológica particular, em contraste com os métodos que atuam geralmente na expressão de todas as proteínas. Os resultados experimentais que estão na base da presente invenção incluem as observações de que as chaperonas farmacológicas podem aumentar a atividade da proteína de tipo selvagem endógena em pelo menos cerca de

20-25%, nalguns casos em pelo menos cerca de 50% e em formas de realização específicas em pelo menos cerca de 90% e até mesmo 100%. Este nível de aumento *in vivo* não foi observado com células em cultura de tecido e surge como uma surpresa, dada a expectativa de que os processos fisiológicos normais abafariam os efeitos das chaperonas farmacológicas *in vivo*. Não havia qualquer base para esperar que uma chaperona farmacológica pudesse aumentar o nível de atividade de um proteína de tipo selvagem *in vivo* num humano em pelo menos 20-25% e, particularmente, em pelo menos cerca de 50%. Como exemplificado *infra*, a administração de isofagomina a indivíduos saudáveis resultou num aumento dependente da dose da atividade da GCase (Figura 2). A algumas concentrações, as quais foram facilmente testadas utilizando ensaios dose-resposta de rotina, o nível de aumento da atividade enzimática aumentou pelo menos 50% até 100%.

A presente invenção surgiu da relação conhecida entre a insuficiência de enzimas lisossómicas e estados neurológicos patológicos (por exemplo, doença de Gaucher de Tipos 2 e 3), e do facto de se observar agregação de proteínas e/ou lípidos e morte/degenerescência neuronal em muitos dos distúrbios neurodegenerativos não LSD, tal como descrito atrás na secção de Antecedentes. Assim, a presente invenção explora inesperadamente a capacidade de aumentar a atividade de enzimas lisossómicas não deficientes para aumentar a eliminação de agregados de proteína, em particular agregados nos quais as proteínas (ou seus fragmentos incluindo monómeros) estão associadas a substratos lipídicos da enzima lisossómica, tais como, por exemplo, SCNA com GlcCer. A redução do substrato lipídico ao qual se associa a proteína patológica provavelmente reduzirá a agregação da proteína patológica, melhorando

desse modo os sintomas neurológicos e/ou prevenindo a morte ou neurodegenerescência neuronal. Alternativamente, o melhoramento da atividade da GCCase pode reduzir a concentração de um lípido, o que, por sua vez, proporciona um ambiente celular mais capaz de controlar a degradação de proteínas suscetíveis a agregação.

A invenção também explora inesperadamente a capacidade de aumentar a atividade de enzimas lisossômicas não deficientes para alterar o perfil lipídico em neurónios nos quais existe uma acumulação de GlcCer, glucosilesfingosina (GlcSph; ou outros lípidos cujos níveis mudam em resposta à atividade da GCCase devido a metabolismo anormal de lípidos) por um mecanismo diferente da redução da atividade da GCCase, ou devido a anormalidades no trânsito intracelular de lípidos.

A utilização de chaperonas farmacológicas específicas de acordo com a presente invenção tem vantagens potenciais em relação a outros métodos de administração de GCCase, tais como por administração de enzima recombinante (ERT) ou utilizando terapia de redução de substrato (SRT) com, por exemplo, Zavesca®, uma vez que o anterior tem de ser administrado diretamente no cérebro através de um cateter, e o último inibe a síntese de um grande número de glicolípidos, e não apenas aqueles que podem ser benéficos para diminuir um distúrbio neurológico particular. Zavesca® tem efeitos secundários graves e a sua utilização está limitada a doentes que não toleram ERT. Por conseguinte, estes tratamentos são menos eficazes do que um tratamento que pode melhorar a atividade hidrolase ubíqua da enzima de eleição.

Definições***Biológicas e Clínicas***

Os termos utilizados nesta especificação têm geralmente os seus significados habituais na técnica, no contexto desta invenção e no contexto específico em que cada termo é utilizado. Certos termos são discutidos abaixo, ou em qualquer outra parte da especificação, para proporcionar uma orientação adicional ao praticante ao descrever as composições e métodos da invenção e do modo como preparar e utilizar a invenção.

Os termos "distúrbio neurológico," ou "distúrbio neurodegenerativo" referem-se a qualquer doença do sistema nervoso central (SNC) ou sistema nervoso periférico (SNP) que está associada a defeitos de células neuronais ou gliais incluindo, mas não se limitando a, perda neuronal, degenerescência neuronal, desmielinização neuronal, gliose (incluindo macro- e micro-gliose), ou acumulação neuronal ou extraneuronal de proteínas aberrantes ou toxinas (por exemplo, β -amilóide ou α -sinucleína). O distúrbio neurológico pode ser crónico ou agudo. Os distúrbios neurológicos ilustrativos incluem mas não se limitam a doença de Gaucher, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ALS), esclerose múltipla (MS), doença de Huntington, ataxia de Fredrich, Deficiência Cognitiva Ligeira, Angiopatia Amilóide Cerebral, Doença de Parkinsonismo, Doença de Corpo de Lewy, Demência Frontotemporal (FTD) Atrofia Sistémica Múltipla (MSA), Paralisia Supranuclear Progressiva e distúrbios do movimento (incluindo ataxia, paralisia cerebral, coreoatetose, distonia, síndrome de Tourette, icterícia nuclear) e distúrbios de tremor, e leucodistrofias (incluindo adrenoleucodistrofia, leucodistrofia

metacromática, doença de Canavan, doença de Alexander, doença de Pelizaeus-Merzbacher), ceroidolipofuscinose neuronal, ataxia telangiectasia e Síndrome de Rett.

Em particular, o termo " α -sinucleinopatia" refere-se a doenças associadas a acumulação aberrante de α -syn, incluindo mas não se limitando a parkinsonismo, doença de Parkinson, Doença de Corpo de Lewy, Atrofia Sistémica Múltipla, doença de Hallervorden-Spatz e Demência Frontotemporal.

Um "distúrbio neurológico associado a mutações numa enzima lisossómica" refere-se a qualquer distúrbio neurológico em que também estão presentes mutações e um ou mais gene ou genes lisossómicos quando avaliados em indivíduos que possuem o distúrbio neurológico, em comparação com indivíduos que não possuem o distúrbio neurológico. Num exemplo não limitativo, o distúrbio neurológico associado a mutações de Gba é uma doença de depósito lisossómico, tal como a doença de Gaucher, ou uma doença neurodegenerativa associada a uma mutação heterozigótica de Gba, tal como um subconjunto de doentes com doença de Parkinson. Um aspeto da presente invenção é que ele se refere ao tratamento de um distúrbio neurológico que não envolve uma mutação em Gba.

O termo "aumento na atividade lisossómica" refere-se a um aumento na quantidade de um polipéptido de enzima lisossómica que adota uma conformação funcional no ER numa célula posta em contacto com uma chaperona farmacológica específica para uma enzima lisossómica, relativamente à expressão da enzima lisossómica numa célula (preferencialmente do mesmo tipo de célula) que não foi posta em contacto com a chaperona farmacológica específica para a enzima lisossómica, aumentando assim a velocidade do

metabolismo do lípido e/ou proteína mediado pelo lisossoma numa célula, relativamente à velocidade antes da administração da(s) chaperona(s) farmacológica(s). Embora um aumento da atividade de uma única enzima lisossômica no lisossoma resulte num aumento da atividade lisossômica, a invenção proporciona vantajosamente o aumento da atividade de um número de enzimas lisossômicas, resultando num metabolismo vasto de lípidos e/ou proteínas.

O termo supramencionado também significa o aumento da eficiência de transporte de um polipéptido da enzima lisossômica de tipo selvagem do ER para o lisossoma numa célula posta em contacto com uma chaperona farmacológica específica para a enzima lisossômica, relativamente à eficiência de transporte do polipéptido da enzima lisossômica de tipo selvagem endógena numa célula (preferencialmente do mesmo tipo de célula) que não foi posta em contacto com a chaperona farmacológica específica para a enzima lisossômica.

Os termos "enzima lisossômica" ou "enzima do lisossoma" referem-se a qualquer enzima que atua no lisossoma. As enzimas lisossômicas incluem, mas não se limitam a α -galactosidase A; β -glucosidase; α -glucosidase; β -hexosaminidase A; β -hexosaminidase B; α -L-iduronidase; β -galactosidase; β -glucuronidase; α -glucuronidase; α -fucosidase; sulfatases; ceramidases ácidas; NPC1; esfingomielinase ácida; prosaposina (saposinas A,B,C,D); catepsinas (A, D, H, S, Z); H(+)-ATPases; sialidase; β -galatocerebrosidase; arilsulfatase; iduronato-2-sulfatase; heparano-N-sulfatase; α -N-acetilglucosaminidase; α -glucosaminidase-N-acetiltransferase; N-acetilglucosamina-6-sulfato-sulfatase; N-acetilgalatosamina-6-sulfato-sulfatase; arilsulfatase B; α -manosidase ácida; β -

manosidase ácida; α -L-fucosidase ácida; α -N-acetil-neuraminidase; β -N-acetilglucosaminidase; e α -N-acetilgalatosaminidase.

Os termos ou "enzima lisossômica de tipo selvagem" referem-se a polipéptidos lisossômicos endógenos normais e a sequências de nucleótidos que codificam os polipéptidos de enzimas lisossômicas, e qualquer outra sequência de nucleótidos que codifica um polipéptido de enzima lisossômica (possuindo as mesmas propriedades funcionais e afinidades de ligação que o polipéptido supramencionado), tais como variantes alélicas em indivíduos normais, que têm a capacidade de conseguir uma conformação funcional no ER, conseguir localização lisossômica e exibir atividade de tipo selvagem (isto é, diminuir as concentrações do substrato da enzima lisossômica). A enzima lisossômica de tipo selvagem não é um mutante, ou proteína ou enzima mutada. No entanto, a invenção não exclui a possibilidade de poder haver mais do que um alelo de tipo selvagem para uma enzima lisossômica. Assim, este termo inclui polimorfismos que não possuam qualquer efeito prejudicial na função ou atividade da enzima lisossômica.

Certos ensaios podem avaliar atributos de uma proteína que pode ou não corresponder à sua função efetiva *in vivo*, mas não obstante são homólogos da funcionalidade da proteína, e o comportamento de tipo selvagem nestes ensaios é uma consequência aceitável das técnicas de resgate ou melhoramento da proteína da invenção. Uma atividade desse tipo de acordo com a invenção é o transporte apropriado de uma enzima lisossômica de tipo selvagem do retículo endoplasmático para o lisossoma, a sua localização nativa.

Como aqui utilizados os termos "proteína mutada" ou "enzima mutada" referem-se a proteínas ou enzimas traduzidas a partir de genes que contêm mutações genéticas que resultam em sequências proteicas modificadas a partir da sequência de tipo selvagem, as quais têm um efeito na função ou atividade da proteína. Numa forma de realização específica, tais mutações resultam na incapacidade da proteína para conseguir uma conformação estável nas condições normalmente presentes no ER. A insuficiência para conseguir esta conformação leva a que estas proteínas sejam degradadas, ou agregadas, em vez de serem transportadas através da sua via normal no sistema de transporte de proteínas para a sua localização apropriada na célula. Mutações diferentes de mutações conformacionais também podem resultar numa menor atividade enzimática ou uma ciclização mais rápida.

Como aqui utilizados, os termos "chaperona farmacológica" ou por vezes "chaperona farmacológica específica" ("SPC") referem-se a uma molécula, tal como um molécula pequena, proteína, péptido, ácido nucleico ou hidrato de carbono, que se liga especificamente a uma proteína e tem um ou mais dos seguintes efeitos: (i) melhoramento da formação de uma conformação molecular estável da proteína; (ii) indução do trânsito da proteína do ER para outra localização celular, preferencialmente uma localização celular nativa, isto é, prevenindo a degradação associada ao ER da proteína; (iii) prevenção da agregação de proteínas incorretamente dobradas; e/ou (iv) restabelecimento ou melhoramento pelo menos parcial da função e/ou atividade de tipo selvagem da proteína. Um composto que se liga especificamente, por exemplo, a uma enzima lisossômica, significa que se liga e exerce um efeito de tipo chaperona na enzima lisossômica e não num grupo genérico de proteínas relacionadas ou não relacionadas. Assim, uma chaperona farmacológica para uma enzima lisossômica é uma molécula que se liga

preferencialmente a essa enzima lisossômica, resultando numa dobragem, trânsito, não agregação e atividade apropriadas dessa enzima lisossômica. Como aqui utilizado, este termo não se referem a chaperonas endógenas, tal como a BiP, ou a agentes não específicos que exibiram atividade de tipo chaperona contra várias proteínas, tal como o DMSO ou água deuterada.

Numa forma de realização não limitativa, a chaperona farmacológica pode ser um inibidor, ou análogo estruturalmente semelhante deste, da GCase. A chaperona farmacológica é isofagomina e seus sais.

Um "inibidor competitivo" de uma enzima pode referir-se a um composto que se assemelha estruturalmente à estrutura química e geometria molecular do substrato da enzima para ligar a enzima aproximadamente no mesmo local que o substrato. Assim, o inibidor compete para o mesmo sítio ativo que a molécula de substrato, aumentando assim o K_m . A inibição competitiva é geralmente reversível se estiverem disponíveis moléculas de substrato suficientes para deslocar o inibidor, isto é, os inibidores competitivos podem ligar-se reversivelmente. Por conseguinte, a quantidade de inibição da enzima depende da concentração de inibidor, concentração de substrato e das afinidades relativas do inibidor e substrato para o sítio ativo.

A inibição competitiva não clássica ocorre quando o inibidor se liga a um sítio que está afastado do sítio ativo, criando uma alteração conformacional na enzima de tal forma que o substrato já não se consegue ligar à mesma. Na inibição competitiva não clássica, a ligação do substrato no sítio ativo impede a ligação do inibidor num sítio separado e vice versa. Isto inclui a inibição alostérica.

Um "inibidor não competitivo" refere-se a um composto que forma ligações fortes com uma enzima e pode não ser substituído pela adição de excesso de substrato, isto é, os inibidores não competitivos podem ser irreversíveis. Um inibidor não competitivo pode estar ligado no sítio ativo, ou próximo ou afastado do sítio ativo de uma enzima ou proteína, e em relação às enzimas, não tem qualquer efeito no K_m mas diminui a V_{max} .

Inibição não competitiva refere-se a uma situação em que o inibidor se liga apenas ao complexo de ES. A enzima torna-se inativa quando o inibidor se liga. Este difere dos inibidores competitivos não clássicos, os quais se podem ligar à enzima na ausência de substrato.

O termo " V_{max} " refere-se à velocidade inicial máxima de uma reação catalisada por enzima, isto é, a níveis de saturação de substrato.

O termo " K_m " é a concentração de substrato necessária para alcançar $\frac{1}{2}$ da V_{max} .

Um "potenciador" da enzima é um composto que se liga a uma enzima lisossómica e aumenta a velocidade da reação enzimática.

O termo "estabilizam uma enzima lisossómica" refere-se à aptidão de uma chaperona farmacológica para induzir ou estabilizar uma conformação de uma proteína de enzima lisossómica de tipo selvagem ou funcionalmente idêntica. O termo "funcionalmente idêntica" significa que apesar de poderem existir variações menores na conformação (quase todas as proteínas exibem alguma flexibilidade conformacional no seu estado fisiológico), a flexibilidade conformacional não resulta em (1) agregação de proteína,

(2) eliminação através da via de degradação associada ao retículo endoplasmático, (3) impedimento da função da proteína, por exemplo, degradando proteínas danificadas, incorretamente dobradas ou em excesso, e/ou (4) transporte inadequado na célula, por exemplo, localização num lisossoma dentro do citosol, num grau maior ou menor do que o da proteína de tipo selvagem. A estabilização pode ser determinada por qualquer um de (i) aumento da semivida da enzima na célula; (ii) aumento dos níveis de enzima no lisossoma; ou (iii) aumento da atividade hidrolítica como medida em lisados celulares utilizando um substrato artificial.

Como aqui utilizado, o termo "eficiência de transporte" refere-se à aptidão de uma proteína mutante para ser transportada do retículo endoplasmático para a sua localização nativa na célula, membrana celular ou no ambiente extracelular. A localização nativa para uma enzima lisossômica é o lisossoma.

Como aqui utilizado, os termos "doente" ou "população doente" referem-se a indivíduo(s) diagnosticado(s) como tendo um distúrbio neurológico ou em risco de desenvolver um distúrbio neurológico. O diagnóstico de distúrbios neurológicos inclui a identificação de sintomas de função neurológica diminuída. Os sintomas incluem, mas não se limitam a, tremor, tremor nas mãos, braços, pernas, maxila e face; rigidez ou dureza dos membros e tronco; bradicinesia, ou lentidão de movimento; instabilidade postural, ou equilíbrio e coordenação debilitados; amnésia; afaxia; apraxia; agnosia; alterações da personalidade; depressão; alucinações; e delírios. Os métodos de diagnóstico de distúrbios neurológicos são conhecidos dos especialistas na técnica. Numa forma de realização, o distúrbio neurológico pode ser esporádico, sem qualquer

associação a um genótipo mutante. Noutra forma de realização, o distúrbio neurológico pode ser devido a um aumento da agregação de substratos das enzimas lisossómicas, ou outras proteínas ou seus fragmentos, nas células do SNC ou SNP em doentes que não são deficientes em hidrolases lisossómicas, isto é, não têm uma mutação num gene que codifica uma hidrolase lisossómica que resulta numa atividade enzimática reduzida. Embora estes doentes possam ter uma mutação numa enzima não lisossómica, por exemplo, α -syn, que promove a agregação. Noutra forma de realização não limitativa, o distúrbio neurológico pode ter uma base genética que não é tratada por qualquer uma, ou por uma associação, de chaperonas utilizadas. Por exemplo, um doente pode ter um genótipo consistindo de uma mutação homozigótico nula para uma enzima lisossómica em que é produzida uma proteína não funcional. Neste caso, um aumento da atividade de outras enzimas lisossómicas não mutadas de acordo com o método da presente invenção podem compensar a enzima lisossómica deficiente.

Um "respondedor" é um indivíduo diagnosticado com um distúrbio neurológico associado a uma proteína e lípido agregados em células do sistema nervoso central, e tratado de acordo com o método presentemente reivindicado, o qual exhibe uma melhoria, melhoramento ou prevenção de um ou mais sintomas clínicos, ou uma melhoria ou inversão de um ou mais marcadores clínicos substitutos. Numa forma de realização específica, alterações nos níveis de α -sinucleína no plasma, incluindo o aumento e diminuição em comparação com controlos normais, é um marcador substituto para uma resposta positiva à terapia com chaperona farmacológica para a GCase.

Os termos "dose terapeuticamente eficaz" e "quantidade eficaz" referem-se à quantidade de chaperona farmacológica

específica que é suficiente para resultar numa resposta terapêutica. Uma resposta terapêutica pode ser qualquer resposta que um assistente (por exemplo, um clínico) reconhecerá como uma resposta eficaz à terapia, incluindo os sintomas e marcadores clínicos substitutos anteriores. Assim, uma resposta terapêutica será geralmente um melhoramento de um ou mais sintomas de uma doença ou distúrbio, tais como aqueles descritos acima.

A frase "farmaceuticamente aceitável" refere-se a entidades moleculares e composições que são fisiologicamente toleráveis e, tipicamente, não produzem reações inconvenientes quando administradas a um humano. Preferencialmente, como aqui utilizado, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por uma agência reguladora do governo Federal ou de um estado ou listado na U.S. Pharmacopeia ou outro farmacopeia geralmente reconhecida para utilização em animais e, mais particularmente, em humanos. O termo "transportador" refere-se a um diluente, adjuvante, excipiente ou veículo com o qual o composto é administrado. Tais transportadores farmacêuticos podem ser líquidos estéreis, tais como água e óleos. A água ou as soluções aquosas salinas e soluções aquosas de dextrose e glicerol são preferencialmente utilizadas como transportadores, particularmente para soluções injetáveis. Transportadores farmacêuticos adequados são descritos em "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin, 18th Edition.

Os termos "cerca" e "aproximadamente" significam geralmente um grau de erro aceitável para a quantidade medida dada a natureza ou precisão das medições. Os graus de erro típicos, ilustrativos encontra-se dentro de 20 por cento (%), preferencialmente dentro de 10%, e mais preferencialmente dentro de 5% de um dado valor ou gama de

valores. Alternativamente, e particularmente em sistemas biológicos, os termos "cerca" e "aproximadamente" podem significar valores que estão dentro de uma ordem de grandeza, preferencialmente dentro de 5 vezes e mais preferencialmente dentro de 2 vezes de um dado valor. As quantidades numéricas aqui dadas são aproximadas salvo indicação em contrário, o que significa que o termo "cerca" ou "aproximadamente" pode ser inferido quando não for expressamente especificado.

Química

O termo "alquilo" refere-se a um grupo hidrocarboneto C_1-C_{20} linear ou ramificado consistindo exclusivamente de átomos de carbono e hidrogénio, não contendo qualquer insaturação, e o qual está ligado ao resto da molécula por uma ligação simples, por exemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), *n*-butilo, *n*-pentilo, 1,1-dimetiletilo (*t*-butilo). Os alquilos aqui utilizados são preferencialmente alquilos C_1-C_8 .

O termo "alcenilo" refere-se a um grupo hidrocarboneto alifático C_2-C_{20} contendo pelo menos uma ligação dupla carbono-carbono e o qual pode ser uma cadeia linear ou ramificada, por exemplo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), iso-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo.

O termo "alcinilo" refere-se a cadeia monovalente de hidrocarboneto não ramificado ou ramificado possuindo uma ou mais ligações triplas na mesma. A ligação tripla de um grupo alcinilo pode estar não conjugada ou conjugada com outro grupo insaturado. Os grupos alcinilo adequados incluem, mas não se limitam a, grupos alcinilo(C_2-C_8), tais

como etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, metilpropinilo, 4-metil-1-butinilo, 4-propil-2-pentinilo e 4-butil-2-hexinilo. Um grupo alcinilo pode estar não substituído ou substituído com um ou dois substituintes adequados.

O termo "cicloalquilo" denota um sistema de anel de hidrocarboneto mono- ou multicíclico insaturado, não aromático tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo. Os exemplos de grupos cicloalquilo multicíclicos incluem grupos per-hidronaftilo, adamantilo e norbornilo, grupos cíclicos em ponte ou grupos esprirobicíclicos, por exemplo, espiro(4,4)non-2-ilo.

O termo "cicloalquilalquilo" refere-se a um cicloalquilo como definido acima diretamente ligado a um grupo alquilo como definido acima, que resulta na criação de uma estrutura estável tal como ciclopropilmetilo, ciclobutiletilo, ciclopentiletilo.

O termo "éter alquílico" refere-se a um grupo alquilo ou grupo cicloalquilo como definido acima possuindo pelo menos um oxigénio incorporado na cadeia alquilo, por exemplo, éter metil-etílico, éter dietílico, tetra-hidrofurano.

O termo "alquilamina" refere-se a um grupo alquilo ou um grupo cicloalquilo como definido acima possuindo pelo menos um átomo de azoto, por exemplo, n-butilamina e tetra-hidrooxazina.

O termo "arilo" refere-se a radicais aromáticos possuindo na gama de cerca de 6 até cerca de 14 átomos de carbono tais como fenilo, naftilo, tetra-hidronaftilo, indanilo, bifenilo.

O termo "arilalquilo" refere-se a um grupo arilo como definido acima diretamente ligado a um grupo alquilo como definido acima, por exemplo, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ e $-\text{C}_2\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5$.

O termo "heterocíclico" refere-se a um radical de anel de 3 a 15 membros estável, o qual consiste de átomos de carbono e de um até cinco heteroátomos selecionados do grupo consistindo de azoto, fósforo, oxigénio e enxofre. Para os fins desta invenção, o radical de anel heterocíclico pode ser um sistema de anel monocíclico, bicíclico ou tricíclico, o qual pode incluir sistemas de anel fundido, em ponte ou espiro, e os átomos de azoto, fósforo, carbono, oxigénio ou enxofre no radical de anel heterocíclico podem estar opcionalmente oxidados em vários estados de oxidação. Além disso, o átomo de azoto pode estar opcionalmente quaternizado; e o radical de anel pode estar parcialmente ou completamente saturado (isto é, heteroaromático ou heteroarilo aromático). Exemplos de tais radicais de anel heterocíclico incluem, mas não se limitam a, azetidínio, acridínio, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofuranilo, carbazolilo, cinolinilo, dioxolanilo, indolizínio, naftiridínio, per-hidroazepínio, fenazínio, fenotiazínio, fenoxazínio, ftalazínio, piridilo, pteridínio, purínio, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazólio, imidazolilo, tetra-hidroisoquinolilo, piperidínio, piperazínio, 2-oxopiperazínio, 2-oxopiperidínio, 2-oxopirrolidínio, 2-oxoazepínio, azepínio, pirrolilo, 4-piperidonilo, pirrolidínio, pirazínio, pirimidínio, piridazínio, oxazolilo, oxazolinilo, oxasolidínio, triazolilo, indanilo, isoxazolilo, isoxasolidínio, morfolínio, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidínio, isotiazolilo, quinuclidínio, isotiazolidínio, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, octa-hidroindolilo, octa-hidroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, deca-

hidroisoquinolilo, benzimidazolilo, tiadiazolilo, benzopiraniilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, furilo, tetra-hidrofurtilo, tetra-hidropiraniilo, tienilo, benzotienilo, tiamorfolinilo, sulfóxido de tiamorfolinilo, sulfona de tiamorfolinilo, dioxafosfolaniilo, oxadiazolilo, cromaniilo, isocromaniilo.

O radical de anel heterocíclico pode estar ligado à estrutura principal em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulte na criação de uma estrutura estável.

O termo "heteroarilo" refere-se a um anel heterocíclico em que o anel é aromático.

O termo "heteroarilalquilo" refere-se a um radical de anel heteroarilo como definido acima diretamente ligado a grupo alquilo. O radical heteroarilalquilo pode estar ligado à estrutura principal em qualquer átomo de carbono do grupo alquilo que resulte na criação de uma estrutura estável.

O termo "heterociclilo" refere-se a um radical de anel heterocíclico como definido acima. O radical de anel heterociclilo pode estar ligado à estrutura principal em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulte na criação de uma estrutura estável.

O termo "heterociclilalquilo" refere-se a um radical de anel heterocíclico como definido acima diretamente ligado a grupo alquilo. O radical heterociclilalquilo pode estar ligado à estrutura principal no átomo de carbono do grupo alquilo que resulte na criação de uma estrutura estável.

Os substituintes no "alquilo substituído", "alcenilo substituído," "alcinilo substituído," "cicloalquilo

substituído," "cicloalquilalquilo substituído," "cicloalcenilo substituído," "arilalquilo substituído," "arilo substituído," "anel heterocíclico substituído," "anel heteroarilo substituído," "heteroarilalquilo substituído" ou "anel heterociclicilalquilo substituído," podem ser iguais ou diferentes com um ou mais selecionados dos grupos hidrogénio, hidroxilo, halogéneo, carboxilo, ciano, amino, nitro, oxo (=O), tio (=S), ou grupos opcionalmente substituídos selecionados de alquilo, alcoxilo, alcenilo, alcinilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, anel heterocíclico, $-\text{COOR}^x$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^x$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^x$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{C}(\text{O})\text{ONR}^x\text{R}^y$, $-\text{NR}^x\text{CONR}^y\text{R}^z$, $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SOR}^y$, $-\text{N}(\text{R}^x)\text{SO}_2\text{R}^y$, $-(=\text{N}-\text{N}(\text{R}^x)\text{R}^y)$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$, $-\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{O})\text{R}^y-$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{S})\text{R}^y$, $-\text{NR}^x\text{C}(\text{S})\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{SONR}^x\text{R}^y-$, $-\text{SO}_2\text{NR}^x\text{R}^y-$, $-\text{OR}^x$, $-\text{OR}^x\text{C}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{OR}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^x$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^x\text{R}^y$, $-\text{R}^x\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{R}^x\text{R}^y\text{R}^z$, $-\text{R}^x\text{CF}_3$, $-\text{R}^x\text{NR}^y\text{C}(\text{O})\text{R}^z$, $-\text{R}^x\text{OR}^y$, $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{OR}^y$, $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{NR}^y\text{R}^z$, $-\text{R}^x\text{C}(\text{O})\text{R}^x$, $-\text{R}^x\text{OC}(\text{O})\text{R}^y$, $-\text{SR}^x$, $-\text{SOR}^x$, $-\text{SO}_2\text{R}^x$, $-\text{ONO}_2$, em que R^x , R^y e R^z em cada um dos grupos acima podem ser átomo de hidrogénio, alquilo substituído ou não substituído, haloalquilo, arilalquilo substituído ou não substituído, arilo substituído ou não substituído, cicloalquilo substituído ou não substituído, cicloalquilalquilo substituído ou não substituído, anel heterocíclico substituído ou não substituído, heterociclicilalquilo substituído ou não substituído, heteroarilo substituído ou não substituído ou heteroarilalquilo substituído ou não substituído.

O termo "halogéneo" refere-se a radicais de flúor, cloro, bromo e iodo.

O termo "um unidade de ligação flexível curta" refere-se a unidades de ligação com comprimento linear de cerca de 6 Å até cerca de 12 Å, preferencialmente cerca de 9 Å. Uma

unidade de ligação flexível curta compreende moléculas ligadas umas às outras, por exemplo, mas não se limitando a, carbono ligado a carbono e carbono ligado a um heteroátomo tal como azoto, oxigénio, ou enxofre, em que as moléculas ligadas em conjunto podem rodar em torno do eixo de ligação. Numa forma de realização particular, a unidade de ligação flexível pode adotar conformações e orientações diferentes que podem alterar a distância entre domínios moleculares ligados pela unidade de ligação flexível curta.

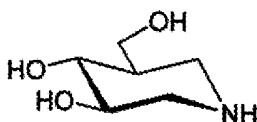
Terapia com Chaperona para Distúrbios Neurodegenerativos

Numa série de formas de realização, chaperonas farmacológicas de molécula pequena aumentam a estabilidade de uma GCase não mutante no ER, aumentam trânsito para o lisossoma e aumentam a vida da enzima estabilizando a proteína no lisossoma. Esta estratégia pode resultar num aumento da atividade enzimática ou função da enzima no lisossoma e, desse modo, num aumento da atividade lisossómica. O metabolismo de lípidos, tal como o metabolismo de GlcCer, pode ser assim modulado aumentando a atividade da GCase, levando a um nível reduzido de GlcCer na célula em comparação com a uma célula que não foi posta em contacto com a chaperona. Como discutido acima, espera-se que esta estratégia diminua a quantidade de α -syn e/ou melhorará a acumulação patológica de GlcCer ou qualquer desequilíbrio lipídico disruptivo que envolva a GlcCer em células, particularmente nos neurónios.

Chaperonas para a GCase. Há um grande número de compostos que podem ser utilizados, sozinhos ou em associação, como chaperonas farmacológicas para aumentar a atividade lisossómica, aumentando a atividade da GCase. Como discutido acima, foi anteriormente demonstrado que os

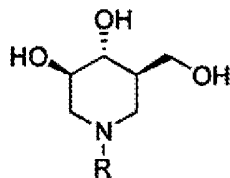
inibidores competitivos para a GCase aumentam a atividade da GCase. Por conseguinte, antecipa-se que estes e outros inibidores de GCase podem ser úteis para diminuir a quantidade de α -syn, provavelmente aumentando a atividade da GCase no lisossoma, embora sejam possíveis outros mecanismos.

Isifagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidinadiol) refere-se a um composto possuindo a seguinte estrutura:



O tartrato de isifagomina foi recentemente descrito no pedido de patente de propriedade geral U.S. com o número de série 11/752,658, apresentado em 23 de Maio de 2007, e foi-lhe atribuído o número CAS 919364-56-0. A isifagomina também pode ser preparada na forma de outros sais de adição de ácido feitos com uma variedade de ácidos orgânicos e inorgânicos. Esses sais incluem aqueles preparados com cloreto de hidrogénio, brometo de hidrogénio, ácido metanossulfónico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido benzenossulfónico, ácido toluenossulfónico e vários outros (por exemplo, nitrato, fosfato, boratos, citratos, benzoatos, ascorbatos, salicilatos e semelhantes). Esses sais podem ser preparados como conhecido pelos especialistas na técnica.

Também são aqui divulgados derivados de N-álquilo de isifagomina. Esses compostos são descritos nas patentes U.S. 6,046,214 de Kristiansen et al. e 5,844,102 de Sierks et al. Um derivado de isifagomina tem a fórmula I seguinte:



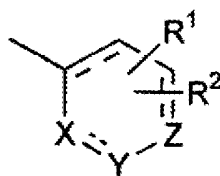
em que:

R é haloalquilo C_{1-7} , alquilo C_{1-10} , alcenilalquilo C_{3-7} , alcoxialquilo C_{2-7} , carbamoilalquilo C_{1-7} ou $X-Ar^1$;

X é $-(CH)_n-$ ou alcenileno C_2-C_3 ;

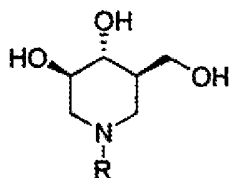
n é um número inteiro desde 0-3;

Ar^1 é



em que R_1 e R_2 são independentemente selecionados de hidrogénio, halo, alquilo C_{1-3} , alcoxilo C_{1-3} , amino, nitro, heteroarilo, arilo ou ciano; X e Z são independentemente C, N, O ou S quando Y é C, N, O ou S; ou X e Z são independentemente C, $N-R^3$, O ou S quando Y é uma ligação simples que liga X e Z em que R^3 é alquilo C_{1-3} ou hidrogénio, ou seus sais farmaceuticamente aceitáveis.

Um derivado de isofagomina tem a fórmula Ia seguinte:



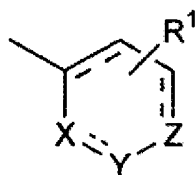
em que:

R é alquilo C_{1-10} , alcenilalquilo C_{3-7} , alcoxialquilo C_{2-7} ou X-Ar;

X é $-(CH)_n-$ ou alcenileno C_2-C_3 ;

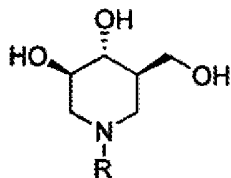
n é um número inteiro desde 0-3;

Ar é

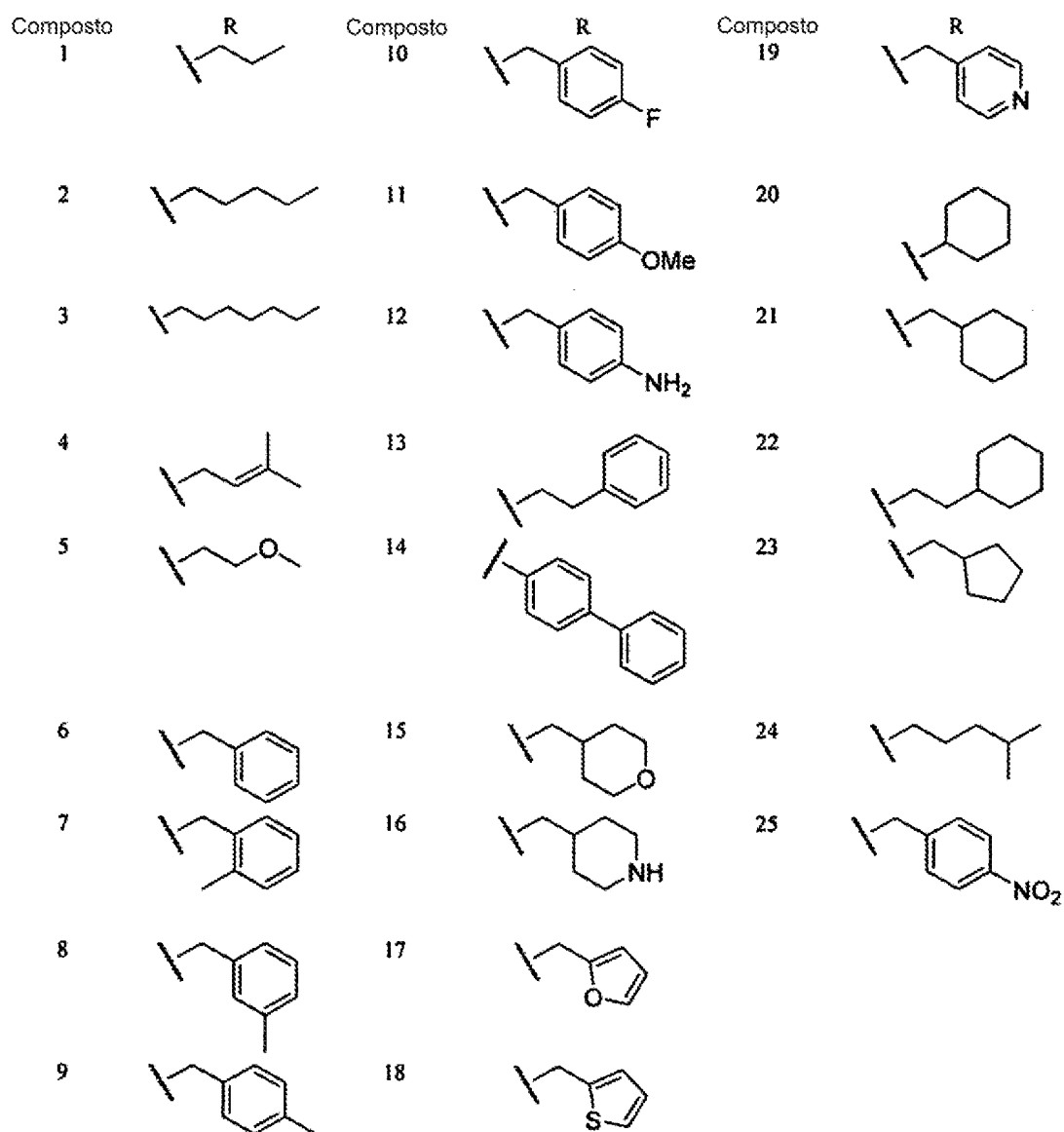


em que X e Z é C, N, O ou S; Y é C, N, O, S ou uma ligação simples que liga X e Z; R_1 é um hidrogénio, halo, alquilo C_{1-3} , alcóxido C_{1-3} , amino, nitro, arilo ou ciano, ou seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

Derivados N-alquilo específicos incluem N-dodecil-isofagomina e aqueles proporcionados no Quadro 1 abaixo:



Quadro 1



Os compostos são designados como se segue: (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-propilpiperidina-3,4-diol (1); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-pentilpiperidina-3,4-diol (2); (3R,4R,5R)-1-heptil-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (3); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(3-metilbut-2-enil)piperidina-3,4-diol (4); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(2-metoxietil)piperidina-3,4-diol (5); (3R,4R,5R)-1-benzil-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (6); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(2-metilbenzil)piperidina-3,4-diol (7); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(3-metilbenzil)piperidina-

3,4-diol (8); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-metilbenzil)piperidina-3,4-diol (9); (3R,4R,5R)-1-(4-fluorobenzil)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (10); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-metoxibenzil)piperidina-3,4-diol (11); (3R,4R,5R)-1-(4-aminobenzil)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (12); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(2-feniletal)piperidina-3,4-diol (13); (3R,4R,5R)-1-(bifenil-4-ilmetil)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (14); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-((tetra-hidro-2H-piran-4-il)metil)piperidina-3,4-diol (15); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(piperidin-4-ilmetil)piperidina-3,4-diol (16); (3R,4R,5R)-1-(furan-2-ilmetil)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (17); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(tiofen-2-ilmetil)piperidina-3,4-diol (18); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(piridin-4-ilmetil)piperidina-3,4-diol (19); (3R,4R,5R)-1-ciclo-hexil-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (20); (3R,4R,5R)-1-(ciclo-hexilmetil)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (21); (3R,4R,5R)-1-(2-ciclo-hexiletal)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (22); (3R,4R,5R)-1-(ciclopentilmetil)-5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol (23); (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-metilpentil)piperidina-3,4-diol (24); e (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-1-(4-nitrobenzil)piperidina-3,4-diol (25).

Os dados de inibição adicionais destes compostos para a GCCase e ou alguns dados de melhoramento celular para a GCCase são proporcionados no Quadro 2 abaixo:

Quadro 2

Composto	IC ₅₀ (μM) (n = 3)	Ki (μM) (n = 3)	EC ₅₀ (μM) (n = 3)
1	35,81 ± 6,69	14,84 ± 2,77	65,9 ± 15,6

Composto	IC ₅₀ (μM) (n = 3)	Ki (μM) (n = 3)	EC ₅₀ (μM) (n = 3)
2	979,9 ± 137	406,06 ± 56,34	266,1 ± 47,7
3	41,70 ± 3,05	17,28 ± 1,26	9,99 ± 2,56
4	4,00 ± ,035	1,66 ± 0,015	63,0 ± 14,1
5	5,99 ± 0,11	2,48 ± 0,05	60,7 ± 0,11
6	200,27 ± 61,78	82,99 ± 25,6	115,3 ± 18,5
7	69,47 ± 8,18	28,79 ± 3,39	46,4 ± 8,7
8	12,7 ± 2,14	5,26 ± 0,89	11,6 ± 2,4
9	129,63 ± 14,71	53,72 ± 6,10	144,8 ± 2,9
10	269,80 ± 39,21	111,8 ± 16,25	70,6 ± 2,1
11	nd	nd	nd
12	9,36 ± 1,16	3,88 ± 0,48	7,7 ± 1,5
13	7,5 ± 0,82	3,11 ± 0,34	2,2 ± 0,1
14	nd	nd	nd
15	49,22 ± 5,5	20,39 ± 2,28	68,3 ± 5,7
16	1,07 ± 0,02	0,44 ± 0,01	6,9 ± 1,5
17	280,07 ± 62,55	116,39 ± 25,92	65,6 ± 15,7
18	27,55 ± 0,49	11,42 ± 0,2	139,0 ± 27,8
19	19,35 ± 1,24	8,02 ± 0,51	35,0 ± 3,6
20	nd	nd	nd
21	nd	nd	nd
22	nd	nd	nd
23	15,63 ± 2,2	6,48 ± ,091	18,8 ± 2,8
24	2,13 ± 0,17	0,88 ± 0,07	30,5 ± 4,8
25	44,96 ± 3,99	18,63 ± 1,65	16,4 ± 2,2

nd = não efetuado

Métodos de síntese de isofagomina e alguns derivados são bem conhecidos e são descritos nos seguintes: Jespersen et al., *Angew. Chem., Int. ed. Engl.* 1994; 33: 1778-9; Dong et

al., *Biochem.* 1996; 35:2788; Lundgren et al., *Diabetes.* 1996; 45:S2 521; Schuster et al., *Bioorg Med Chem Lett.* 1999;9(4):615-8; Andersch et al., *Chem. Eur. J.* 2001; 7: 3744-3747; Jakobsen et al., *Bioorg Med Chem.* 2001; 9: 733-44; 36:435; Pandey et al., *Synthesis.* 2001 : 1263-1267; Zhou et al., *Org Lett.* 2001;3(2):201-3; Best et al., *Can. J. Chem./Rev. Can. Chim.* 2002; 80(8): 857-865; Huizhen et al., *J. Carbohydr Chem.* 2004;23: 223-238; Mehta et al., *Tetrahedron Letters* 2005; 41(30):5747-5751; Ouchi et al., *J Org Chem.* 2005;70(13):5207-14; e muito recentemente, Meloncelli et al., *Australian Journal of Chemistry.* 2006; 59(11) 827-833. A síntese do estereoisómero L é descrita em Panfil et al., *J. Carbohydr Chem.* 2006; 25: 673-84.

Especificamente, os derivados N-alquilo de isofagomina descritos acima podem ser preparados por vias conhecidas na técnica para alquilar amina secundárias, tal como por substituição de um mesilato (a partir dos álcoois correspondentes comercialmente disponíveis) ou por aminação redutiva. Uma breve descrição destes métodos é proporcionada a seguir.

Método geral para alquilação

Depois de 1 equivalente do álcool e 1,5 equivalentes de trietilamina serem dissolvidos em CH₂Cl₂, adiciona-se cloreto de metanossulfonilo (1,2 equivalentes) gota a gota à mistura reacional a 0 °C. A mistura reacional é agitada à T.A. durante 2 horas e em seguida vertida para água e extraída com CH₂Cl₂. O solvente é removido para dar o produto em bruto que foi utilizado diretamente no passo seguinte.

Suspende-se 3 equivalentes do produto em bruto do passo anterior e 1 equivalente de 5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol e K₂CO₃ (5 equivalentes) em DMF, e a mistura é agitada e aquecida a 70 °C durante 3 dias . A mistura reacional é filtrada e o solvente é removido para dar um produto em bruto. O produto em bruto e sílica gel são suspensos em solução de MeOH.HCl e agitados à T.A. durante 30 min. O solvente é removido para dar um sólido, o qual é empacotado ao topo da coluna de sílica gel. O composto final é eluído com Acetato de Etilo/MeOH/amoníaco aquoso (9/1/0,2).

Método geral para aaminação redutiva

Suspende-se 3 equivalente de aldeído ou cetona e 1 equivalente de 5-(hidroximetil)piperidina-3,4-diol em metanol, em seguida adiciona-se Na(CN)BH₃ (6 eq). A mistura reacional é agitada à T.A. durante 3 dias. A mistura reacional é filtrada e o solvente foi removido para dar um produto em bruto. O produto em bruto e sílica gel é suspenso em solução de MeOH.HCl e agitada à T.A. durante 30 min. O solvente é removido para dar um sólido, o qual é empacotado no topo da coluna de sílica gel. O composto final foi eluído com Acetato de Etilo/MeOH/amoníaco aquoso (9/1/0,2).

Método geral para redução de Nitro

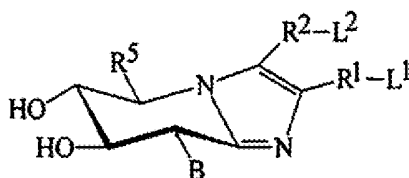
5-(Hidroximetil)-1-(4-nitrobenzil)piperidina-3,4-diol e Zinco (10 eq) são agitados em solução de MeOH.HCl à T.A. durante uma hora. O solvente é removido para dar um produto em bruto, o qual é purificado por coluna de sílica gel.

Uma vez que estes compostos se ligam especificamente e melhoram a GCase, eles também podem ser utilizados para o

tratamento de doença de Gaucher e outros distúrbios neurológicos associados a mutações na GCase.

Outras chaperonas para a GCase incluem glucoimidazole, poli-hidroxilcicloalquilaminas e derivados, e derivados de hidroxipiperidina, os quais são descritos nos pedidos U.S. publicados pendentes 2005/0130972 e 2005/0137223, e nos correspondentes pedidos PCT WO 2005/046611 e WO 2005/046612, todos apresentados em 12 de Novembro de 2004.

O glucoimidazole e derivados são representados pela fórmula II seguinte:



em que B é selecionado do grupo consistindo de hidrogénio, hidroxilo, acetamino e halogéneo;

R^1 e R^2 opcionalmente presentes são unidades de ligação flexíveis, curtas com um comprimento linear de cerca de 6Å até cerca de 12Å, preferencialmente cerca de 9Å. R^1 e R^2 também podem ser independentemente selecionados do grupo consistindo de alquilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ e $-S(O)_mNR^3$; alcenilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ e $-S(O)_mNR^3$; alcinilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S,

$S(O)_m$ e $-S(O)_m NR^3$, em que m é 1 ou 2, e R^3 é independentemente selecionado em cada ocorrência dos grupos consistindo de hidrogénio, alquilo substituído ou não substituído, alcenilo substituído ou não substituído; alcenilo substituído ou não substituído; cicloalquilo substituído ou não substituído, cicloalcenilo substituído ou não substituído; arilo substituído ou não substituído; arilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilo substituído ou não substituído; heterocíclico substituído ou não substituído; heterociclilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilalquilo substituído ou não substituído.

Além disso, R^1-L^1 e/ou R^2-L^2 podem ser hidrogénio.

R^5 representa um hidrogénio, hidroxilo ou hidroxilmetilo; L^1 e L^2 são grupos lipófilos selecionados do grupo consistindo de alquilo C_3-C_{12} substituído ou não substituído, alcenilo substituído ou não substituído, alcinilo substituído ou não substituído; cicloalquilo substituído ou não substituído, cicloalcenilo substituído ou não substituído; arilo substituído ou não substituído; arilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilo substituído ou não substituído; heterocíclico substituído ou não substituído; heterocicloalquilo substituído ou não substituído; heteroarilalquilo substituído ou não substituído.

Em formas de realização específicas, os compostos de GIZ incluem GIZ, (5R, 6R, 7S, 8S)-5-hidroximetil-2-octil-5,6,7,8-tetra-hidroimidazo[1,2-a]piridina-6,7,8-triol e (5R, 6R, 7S, 8S)-5-hidroximetil-2-(3,3-dimetilbutil)-5,6,7,8-tetra-hidroimidazo[1,2-a]piridina-6,7,8-triol.

A síntese dos anteriores pode ser conseguida como se segue:

a. (5R, 6R, 7S, 8S)-5-Hidroximemil-2-n-octil-5,6,7,8-tetra-hidroimidazo[1,2-a]piridina-6,7,8-triol (IC_{50} para a GCase = ~ 0,07 nM)

Uma solução de (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-Tris(benziloxi)-5-[(benziloxi)metil]-2-(1-octinil)-5,6,7,8-tetra-hidroimidazo[1,2-a]piridina (120 mg, 0,179 mmol) em THF/EtOH (2:1) (3 ml) é rapidamente agitada com Pd(OH)₂/C (0,1 g) sob uma atmosfera de hidrogénio durante 14h. Após filtração do catalisador, a solução orgânica é concentrada num evaporador rotativo e o resíduo é dissolvido em CH₂Cl₂ (10 ml). A solução é arrefecida num banho de acetona-gelo seco e é lentamente adicionada uma solução de BCl₃ (1,0 M) em CH₂Cl₂. A mistura reacional é aquecida até à temperatura ambiente e agitada durante 3 horas. A mistura reacional é arrefecida num banho de água com gelo, adicionada água e durante 0,5 horas. A maior parte do solvente é removido utilizando um evaporador rotativo e o produto em bruto é purificado por cromatografia (CHCl₃/MeOH/H₂O 64:25:4). A liofilização de água dá o composto em epígrafe como uma espuma branca. RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD): 57,22 (s, 1H), 4,56 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,20-4,16 (m, 1H), 3,98-3,93 (m, 2H), 3,83 (t, 1H, J = 8,4 Hz), 3,70 (dd, 1H, J = 8,8 Hz e 10 Hz), 2,60 (t, 2H, J = 7,2 Hz), 1,67-1,63 (m, 2H), 1,35-1,30 (m, 10H), 0,90 (t, 3H, J = 6,8 Hz). MS (ES⁺): 313 [M+1].

b. (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-Tris(benziloxi)-5-[(benziloxi)metil]-2-(3,3-dimetilbut-1-inil)-5,6,7,8-tetra-hidroimidazo[1,2-a]piridina (IC_{50} para a GCase = ~ 1,1 nM)

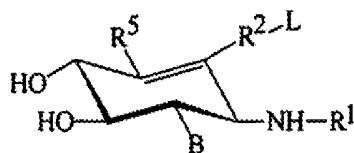
De um modo semelhante ao descrito em **a**, (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-Tris(benziloxi)-5-[(benziloxi)metil]-2-iodo-5,6,7,8-tetra-hidroimidazo[1,2-a]piridina é convertida no composto

em epígrafe. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): 5,71-7,14 (m, 20H), 7,13 (s, 1H), 5,10 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz), 4,81-4,66 (m, 3H), 4,62 (d, 1H, $J = 11,4$ Hz), 4,49-4,42 (m, 3H), 4,18-4,13 (m, 1H), 4,11-4,06 (m, 2H), 3,84-3,77 (m, 2H), 3,71 (dd, 1H, $J = 4,8$ Hz e $10,5$ Hz), 1,31 (s, 9H). MS (ES+): 641 [M+1].

c. (5R, 6R, 7S, 8S)-5-Hidroximetil-2-(3,3-dimetilbutil)-5,6,7,8-tetra-hidro-imidazo[1,2-a]piridina-6,7,8-triol
(IC_{50} para a GCase = $\sim 0,03$ nM)

De um modo semelhante ao descrito em **(b)**, (5R, 6R, 7S, 8S)-6,7,8-Tris(benziloxi)-5-[(benziloxi)metil]-2-(3,3-dimetilbut-1-inil)-5,6,7,8-tetra-hidro-imidazo[1,2-a]piridina foi convertida no composto em epígrafe. RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD): 5,6,97 (s, 1H), 4,41 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 4,09 (dd, 1H, $J = 2,4$ Hz e 12 Hz), 3,86 (dd, 1H, $J = 4,0$ Hz e 12 Hz), 3,79-3,71 (m, 2H), 3,61 (dd, 1H, $J = 8,4$ Hz e $9,2$ Hz), 2,48-2,44 (m, 2H), 1,50-1,47 (m, 2H), 0,89 (s, 9H). MS (ES+): 285 [M+1].

Os derivados de poli-hidroxilcicloalquilaminas (PHCA) considerados para serem utilizados na presente invenção incluem os compostos representados pela fórmula III seguinte:



em que B é selecionado do grupo consistindo de hidrogénio, hidroxilo, N-acetamino e halogéneo.

R^1 é independentemente selecionado em cada ocorrência a partir do grupo consistindo de hidrogénio; alquilo

substituído ou não substituído, alcenilo substituído ou não substituído, alcinilo substituído ou não substituído, cicloalquilo substituído ou não substituído, cicloalcenilo substituído ou não substituído, arilo substituído ou não substituído, arilalquilo substituído ou não substituído, heteroarilo substituído ou não substituído, heterocíclico substituído ou não substituído, heterociclilalquilo substituído ou não substituído, heteroarilalquilo substituído ou não substituído, $-C(O)R^3$ e $-S(O)_mR^3$, em que m é 1 ou 2, e R^3 é independentemente selecionado em cada ocorrência a partir dos grupos consistindo de hidrogénio, alquilo substituído ou não substituído, alcenilo substituído ou não substituído; alcinilo substituído ou não substituído; cicloalquilo substituído ou não substituído, cicloalcenilo substituído ou não substituído; arilo substituído ou não substituído; arilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilo substituído ou não substituído; heterocíclico substituído ou não substituído; heterociclilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilalquilo substituído ou não substituído, e $-C(O)$ ligado a um alquilo C_{1-6} substituído ou não substituído.

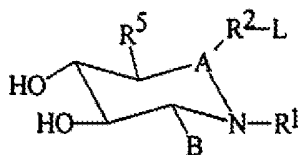
R^2 opcionalmente presente é uma unidade de ligação flexível, curta com um comprimento linear de cerca de 6Å até cerca de 12Å, preferencialmente, cerca de 9Å. R^2 também pode ser selecionado do grupo consistindo de alquilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ e $-S(O)_mNR^3$; alcenilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ e $-S(O)_mNR^3$; alcinilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NHCOO, NHCONH,

NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, S(O)_m e $-\text{S(O)}_m \text{NR}^3$, em que m é 1 ou 2, e R^3 é independentemente selecionado em cada ocorrência a partir dos grupos consistindo de hidrogénio, alquilo substituído ou não substituído, alcenilo substituído ou não substituído; alcinilo substituído ou não substituído; cicloalquilo substituído ou não substituído, cicloalcenilo substituído ou não substituído; arilo substituído ou não substituído; arilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilo substituído ou não substituído; heterocíclico substituído ou não substituído; heterociclilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilalquilo substituído ou não substituído, e $-\text{C(O)}$ ligado a um alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ substituído ou não substituído; e seus sais e pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis.

L é um grupo lipófilo selecionado do grupo consistindo de alquilo $\text{C}_3\text{-C}_{12}$ substituído ou não substituído, alcenilo substituído ou não substituído, alcinilo substituído ou não substituído; cicloalquilo substituído ou não substituído; cicloalcenilo substituído ou não substituído; arilo substituído ou não substituído; arilalquilo substituído ou não substituído; heteroarilo substituído ou não substituído; heterocíclico substituído ou não substituído; heterocicloalquilo substituído ou não substituído; heteroarilalquilo substituído ou não substituído.

Estes compostos podem ser preparados de acordo com os métodos descritos no pedido de patente U.S. publicado 2005/130972.

Os derivados de hidroxilpiperidina considerados para serem utilizados na presente invenção quando Gba está mutada são representados pela fórmula IV seguinte.



em que A representa um carbono ou azoto;

B é um hidrogénio, hidroxilo, N-acetamida ou um halogéneo;

R^1 é um hidrogénio, substituído ou não substituído: alquilo, alcenilo, alcinilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalcenilo, arilo, arilalquilo, heteroarilo, heterocíclico, heterociclilalquilo ou heteroarilalquilo; $-C(O)R^3$ ou $-S(O)_mR^3$. Preferencialmente, R^1 compreende H ou uma unidade orgânica possuindo 1 - 12 átomos de carbono.

R^2 é uma unidade de ligação flexível, curta opcional com um comprimento linear desde cerca de 6Å até cerca de 12Å. Alternativamente, R^2 é um C_1-C_6 substituído ou não substituído: alquilo, alcenilo ou alcinilo opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, $NHCOO$, $NHCONH$, $NHCSO$, $NHCSNH$, $CONH$, $NHCO$, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ e $-S(O)_mNR^3$.

R^3 é hidrogénio, ou um substituído ou não substituído: alquilo, alcenilo; alcinilo; cicloalquilo, cicloalcenilo; arilo; arilalquilo; heteroarilo; heterocíclico; heterociclilalquilo; ou heteroarilalquilo. Preferencialmente, R^3 compreende H ou uma unidade orgânica possuindo 1 - 12 átomos de carbono, ou mais preferencialmente 1 - 6 átomos de carbono.

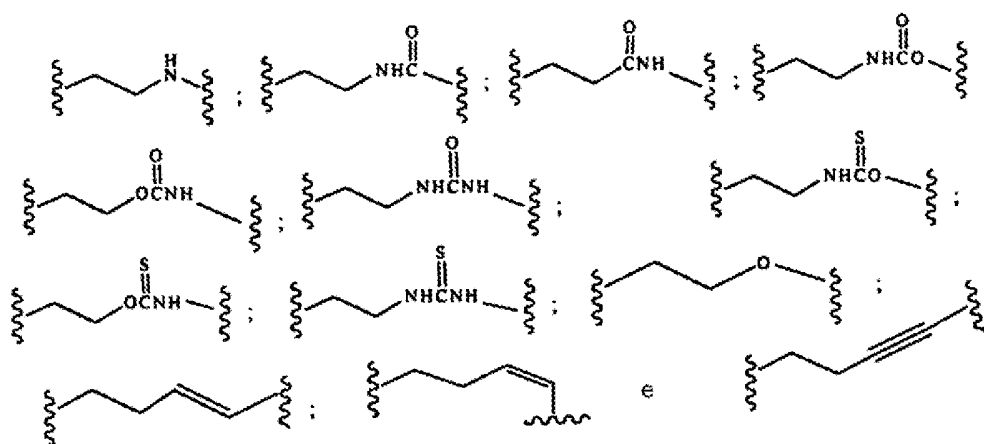
m é 1 ou 2, e

R^5 é um hidrogénio, hidroxilo ou hidroximetilo.

L é um hidrogénio, grupo lipófilo possuindo 1 - 12 átomos de carbono compreendendo um substituído ou não substituído: alquilo, alcenilo, alcinilo; cicloalquilo, cicloalcenilo; arilo; arilalquilo; heteroarilo; heterocíclico; heterocicloalquilo; ou heteroarilalquilo.

Nalgumas formas de realização, R^2 é selecionado do grupo consistindo de alquilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NR^3 e O; alcenilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por uma ou mais unidades escolhidas do grupo consistindo de NH, NR^3 e O; alcenilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por um ou mais heteroátomos escolhidos do grupo consistindo de NH, NR^3 e O; alcenilo C_2-C_6 substituído ou não substituído opcionalmente interrompido por um ou mais heteroátomos escolhidos do grupo consistindo de NH, NR^3 e O.

Noutras formas de realização, R^2 é escolhido do grupo consistindo de



Noutras formas de realização R^2 não está presente e L é hidrogénio, alquilo C_1-C_{12} não substituído ou alquilo C_6-C_{12} não substituído, tal como um alquilo C_6 não substituído, alquilo C_7 não substituído, alquilo C_8 não substituído, alquilo C_9 ou benzilo.

Em formas de realização específicas, os compostos de hidroxilpiperidina considerados para serem utilizados na

invenção são (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-di-hidroxipiperidina; e (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-di-hidroxipiperidina.

Noutras formas de realização específicas, os compostos de hidroxilpiperidina considerados para serem utilizados na presente invenção incluem mas não se limitam aos seguintes: (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-butil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-di-hidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-benzil-3,4-di-hidroxipiperidina.

Ainda outras chaperonas para a GCase são descritas na Patente U.S. 6,599,919 de Fan et al, e incluem calistegina A₃, calistegina A₅, calistegina B₁, calistegina B₂, calistegina B₃, calistegina B₄, calistegina C₁, N-metil-calistegina B₂, DMDP, DAB, castanospermina, 1-desoxinojirimicina, N-butil-desoxinojirimicina, bissulfito de 1-desoxinojirimicina, N-butil-isofagomina, N-(3-ciclohexilpropil)-isofagomina, N-(3-fenilpropil)-isofagomina e N-((2Z,6Z)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-isofagomina.

Os compostos da presente invenção incluem sais e pró-fármacos farmaceuticamente aceitáveis das estruturas acima. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem sais derivados de bases inorgânicas tais como Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn; sais de bases orgânicas tais como N,N'-

diacetiletilenodiamina, glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, diciclo-hexilamina, metformina, benzilamina, trialquilamina, tiamina; bases quirais como alquilfenilamina, glicinol, fenilglicinol, sais de aminoácidos naturais tais como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxiprolina, histidina, ornitina, lisina, arginina, serina; aminoácidos não naturais tais como D-isómeros ou aminoácidos substituídos; guanidina, guanidina substituída em que os substituintes são selecionados de nitro, amino, alquilo, alcenilo, alcinilo, amónio ou sais de amónio substituídos e sais de alumínio. Os sais podem incluir sais de adição de ácido quando apropriado, os quais são sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidro-halogenetos, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, succinatos, palmoatos, metanossulfonatos, benzoatos, salicilatos, benzenossulfonatos, ascorbatos, glicerofosfatos, cetoglutaratos. Os solvatos farmacologicamente aceitáveis podem ser hidratos ou compreender outros solventes de cristalização tais como álcoois.

Os pró-fármacos são compostos que são convertidos *in vivo* em formas ativas (ver, por exemplo, R. B. Silverman, 1992, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action", Academic Press, Chp. 8). Os pró-fármacos podem ser utilizados para modificar a biodistribuição (por exemplo, para permitir compostos que tipicamente não entrariam no sítio reativo da protease) ou a farmacocinética de um composto particular. Por exemplo, um grupo ácido carboxílico, pode ser esterificado, por exemplo, com um grupo metilo ou um grupo etilo para produzir um éster. Quando o éster é administrado a um indivíduo, o éster é dissociado, enzimaticamente ou não enzimaticamente, redutivamente, oxidativamente ou hidroliticamente, para

revelar o grupo aniônico. Um grupo aniônico pode ser esterificado com unidades (por exemplo, ésteres de aciloximetilo) que são dissociadas para revelar um composto intermediário que se decompõe subsequentemente para produzir o composto ativo.

Os exemplos de pró-fármacos e suas utilizações são bem conhecidos na técnica (Ver, por exemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Os pró-fármacos podem ser preparados *in situ* durante o isolamento e purificação finais dos compostos, ou fazendo reagir separadamente o composto purificado com um agente de derivatização adequado. Por exemplo, os grupos hidroxilo podem ser convertidos em ésteres via tratamento com um ácido carboxílico na presença de um catalisador. Exemplos de unidades pró-fármaco dissociáveis de álcool incluem unidades éster de alquilo inferior substituído e não substituído, ramificado ou não ramificado, (por exemplo, ésteres etílicos), ésteres de alcenilo inferior, ésteres de di-alquil inferior-amino-alquilo inferior (por exemplo, éster de dimetilaminoetilo), ésteres de acilamino-alquilo inferior, ésteres aciloxi-alquilo inferior (por exemplo, éster de pivaloiloximetilo), ésteres de arilo (éster de fenilo), ésteres de aril-alquilo inferior (por exemplo, éster benzílico), ésteres de arilo e aril-alquilo inferior substituídos (por exemplo, com substituintes metilo, halo ou metoxilo), amidas, alquilamidas inferiores, di-alquilamidas inferiores e hidroxiamidas.

Formulação, Dosagem e Administração de Chaperonas Farmacológicas Específicas

A presente invenção proporciona que a chaperona farmacológica específica seja administrada numa forma de

dosagem que permita administração sistémica, uma vez que os compostos precisam de atravessar a barreira hematoencefálica para exercerem os efeitos nas células neuronais. Numa forma de realização, a chaperona farmacológica específica é administrada como uma monoterapia, preferencialmente numa forma de dosagem oral (descrita mais abaixo), embora sejam consideradas outras formas de dosagem. A administração oral inclui a administração diária em doses divididas, ou de formulações de libertação controlada, ou através da administração menos frequente de formas de dosagem de libertação imediata ou prolongada. As formulações, dosagem e via de administração para a chaperona farmacológica específica são detalhadas abaixo.

Formulações

A chaperona farmacológica específica pode ser administrada numa forma adequada para qualquer via de administração, incluindo por exemplo, por via oral na forma comprimidos ou cápsulas ou líquido, ou em solução aquosa estéril para injeção. Quando a chaperona farmacológica específica é formulada para administração oral, os comprimidos ou cápsulas podem ser preparados por meios convencionais com excipientes farmacologicamente aceitáveis tais como aglutinantes (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropilmetilcelulose); enchimentos (por exemplo, lactose, celulose microcristalina ou hidrogenofosfato de cálcio); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco ou sílica); desintegrantes (por exemplo, amido de batata ou amidoglicolato de sódio); ou humectantes (por exemplo, laurilsulfato de sódio). Os comprimidos podem ser revestidos por métodos bem conhecidos na técnica. As preparações líquidas para administração oral podem tomar a forma de, por exemplo, soluções, xaropes ou

suspensões, ou podem ser apresentadas como um produto seco para reconstituição com água ou outro veículo adequado antes da utilização. Tais preparações líquidas podem ser preparadas por meios convencionais com aditivos farmacêuticamente aceitáveis tais como agentes de suspensão (por exemplo, xarope de sorbitol, derivados de celulose ou gorduras comestíveis hidrogenadas); emulsionantes (por exemplo, lecitina ou goma-arábica); veículos não aquosos (por exemplo, óleo de amêndoa, ésteres oleosos, álcool etílico ou óleos vegetais fracionados); e conservantes (por exemplo, metil- ou propil-p-hidroxibenzoatos ou ácido sórbico). As preparações também podem conter sais tampão, aromatizantes, corantes e edulcorantes consoante apropriado. As preparações para administração oral podem ser adequadamente formuladas para proporcionar uma libertação controlada ou prolongada da chaperona farmacológica específica.

As formulações farmacêuticas da chaperona farmacológica específica adequadas para utilização parentérica/injetável incluem geralmente soluções aquosas estéreis (quando solúvel em água), ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Em todos os casos, a forma tem de ser estéril e tem de ser fluida até ao ponto em que permita uma aplicação fácil com seringa. Ela tem de ser estável sob as condições de fabrico e conservação e tem de ser conservada contra a ação contaminadora de microrganismos tais como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol, e semelhantes), misturas adequadas destes e óleos vegetais. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pela utilização de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula

necessário no caso da dispersão e pela utilização de tensioativos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser conseguida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, álcool benzílico, ácido sórbico e semelhantes. Em muitos casos, será razoável incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida pela utilização nas composições de agentes de retardamento da absorção, por exemplo, monoesterato de alumínio e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis são preparadas incorporando a chaperona farmacológica específica na quantidade necessária no solvente apropriado com vários dos outros ingredientes enumerados acima, consoante necessário, seguida de esterilização por filtração ou terminal. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando os vários ingredientes ativos esterilizados num veículo estéril que contém o meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferidos são secagem em vácuo e a técnica de secagem por congelação que produzem um pó do ingrediente ativo com qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução daqueles previamente esterilizada por filtração.

A formulação pode conter um excipiente. Os excipientes farmaceuticamente aceitáveis que podem ser incluídos na formulação são tampões tais como tampão de citrato, tampão de fosfato, tampão de acetato e tampão de bicarbonato, aminoácidos, ureia, álcoois, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tais como albumina de soro, colagénio e gelatina; sais tais como EDTA ou EGTA, e cloreto de sódio;

lipossomas; polivinilpirrolidona; açúcares, tais como dextrano, manitol, sorbitol e glicerol; propileno glicol e polietileno glicol (por exemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina ou outros aminoácidos; e lípidos. Os sistemas tampão para serem utilizados com as formulações incluem tampões de citrato; acetato; bicarbonato; e fosfato. O tampão de fosfato é uma forma de realização preferida.

A formulação também pode conter um detergente não iônico. Os detergentes não iônicos preferidos incluem Polissorbato 20, Polissorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, Octil- α -glucósido, Octil- β -glucósido, Brij 35, Pluronic e Tween 20.

Administração

A via de administração da chaperona farmacológica específica pode ser oral (preferencialmente) ou parentérica, incluindo intravenosa, subcutânea, intra-arterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bucal, retal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradérmica, intracraniana, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosal, transdérmica ou via inalação.

A administração das formulações parentéricas de chaperona farmacológica específica descritas acima pode ser por injeções periódicas de um bolus da preparação, ou podem ser administradas por administração intravenosa ou intraperitoneal a partir de um reservatório que é externo (por exemplo, um saco i.v.) ou interno (por exemplo, um implante bioerodível). Ver, por exemplo, Pat. U.S. n° 4,407,957 e 5,798,113, cada uma aqui incorporada por

referência. Os métodos e aparelho para administração intrapulmonar são descritos, por exemplo, nas Pat. U.S. nº 5,654,007, 5,780,014 e 5,814,607, cada uma aqui incorporada por referência. Outros sistemas de administração parentérica úteis incluem partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusão implantáveis, administração com bomba, administração por célula encapsulada, administração lipossomal, injeção administrada com agulha, injeção sem agulha, nebulizador, aerosolizador, eletroporação e adesivo transdérmico. Dispositivos injetores sem agulha são descritos nas Pat. U.S. nº 5,879,327; 5,520,639; 5,846,233 e 5,704,911, cujas especificações são aqui incorporadas por referência. Qualquer uma das formulações descritas acima pode ser administrada utilizando estes métodos.

As injeções subcutâneas têm a vantagem de permitir a autoadministração, resultando também numa semivida no plasma prolongada em comparação com a administração intravenosa. Além disso, uma variedade de dispositivos concebidos para conforto do doente, tais como canetas de injeção recarregáveis e dispositivos de injeção sem agulha, pode ser utilizada com as formulações da presente invenção como aqui discutidas.

Dosagem

A quantidade de chaperona farmacológica específica eficaz para resgatar a enzima lisossômica mutante endógena pode ser determinada numa base caso a caso pelos especialistas na técnica. As farmacocinética e farmacodinâmica tais como a semivida ($t_{1/2}$), concentração máxima no plasma (C_{max}), tempo até à concentração máxima no plasma (t_{max}), exposição como medida pela área sob a curva (AUC) e distribuição no tecido para a proteína de substituição e a chaperona

farmacológica específica, bem como os dados para a ligação chaperona farmacológica específica/enzima lisossômica (constantes de afinidade, constantes de associação e dissociação, e valência), podem ser obtidas utilizando métodos correntes conhecidos na técnica para determinar quantidades compatíveis necessárias para estabilizar a proteína de substituição, sem inibir a sua atividade, e conferir desse modo um efeito terapêutico.

Os dados obtidos a partir do ensaio de cultura de células ou estudos animais podem ser utilizados para formular uma gama de dosagem terapêutica para ser utilizada em humanos e animais não humanos. A dosagem de compostos utilizados nos métodos terapêuticos da presente invenção situa-se preferencialmente dentro de uma gama de concentrações circulantes que inclui a concentração ED_{50} (eficaz para 50% da população testada) mas com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem particular utilizada em qualquer tratamento pode variar dentro desta gama, dependendo de fatores tais como a forma de dosagem particular utilizada, a via de administração utilizada, as condições do indivíduo (por exemplo, doente) e assim por diante.

Uma dose terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente estimada a partir de ensaios de cultura de células e formulada em modelos animais para conseguir uma gama de concentração circulante que será superior à EC_{50} observada nas células durante um intervalo de tempo e inferior à IC_{50} observada durante um intervalo de tempo. A concentração EC_{50} de um composto é a concentração que consegue um aumento correspondente a metade do máximo na atividade enzimática (por exemplo, como determinado a partir de ensaios de cultura de células), enquanto a IC_{50} é a concentração que consegue uma inibição correspondente a metade da máxima da atividade enzimática. As dosagens

apropriadas para serem utilizadas num indivíduo particular, por exemplo em doentes humanos, pode ser depois determinada com mais exatidão utilizando informação como a descrita mais abaixo.

A medições de compostos no plasma podem ser rotineiramente medidas num indivíduo tal como um doente por técnicas tais como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou cromatografia gasosa.

A toxicidade e eficácia terapêutica da composição pode ser determinada por procedimentos farmacêuticos correntes, por exemplo em ensaios de cultura de células ou utilizando animais experimentais para determinar a LD_{50} e a ED_{50} . Os parâmetros LD_{50} e ED_{50} são bem conhecidos na técnica e referem-se às doses de um composto que é letal para 50% de uma população e terapeuticamente eficaz em 50% de uma população, respetivamente. A relação de dose entre os efeitos tóxico e terapêutico é referida como o índice terapêutico e pode ser exprimida como a relação: LD_{50}/ED_{50} . São preferidas as chaperonas farmacológicas específicas que exibem índices terapêuticos grandes.

Quando a chaperona é um inibidor, as doses ótimas da chaperona farmacológica específica são determinadas de acordo com a quantidade necessária para estabilizar a GCase, por exemplo, enzima lisossômica, *in vivo*, no tecido ou em circulação, sem sustentar a inibição da enzima. Isto dependerá da biodisponibilidade da chaperona farmacológica específica no tecido ou em circulação, e da farmacocinética e farmacodinâmica da chaperona farmacológica específica no tecido ou em circulação, durante um intervalo de tempo prolongado. A concentração de inibidor pode ser determinada calculando os valores de EC_{50} e IC_{50} da chaperona específica para a enzima pelo que a dose administrada (i) alcançaria

uma concentração no plasma acima do EC_{50} durante algum tempo para permitir o trânsito máximo para o lisossoma, e (ii) permitiria que a concentração no plasma caísse abaixo da IC_{50} durante algum tempo assim que a enzima se encontrasse no lisossoma para que o substrato pudesse ser hidrolisado.

Esta determinação também dependerá de fatores farmacocinéticos incluindo a semivida da chaperona no sangue e tecido, T_{max} e C_{max} , e a semivida da enzima lisossômica. Numa forma de realização, os raciais para estimar os regimes de dosagem para as chaperonas farmacológicas são adicionalmente descritos no pedido provisório de patente U.S. 60/914,288, apresentado em 27 de Abril de 2007, o qual é incorporado por referência na sua totalidade. Este pedido descreve a dosagem "máxima e baixa" para os inibidores de GCCase em que é dada uma "dose de ataque" diária inicial para maximizar a estabilização da enzima e o trânsito para o lisossoma, seguida de um período de administração em intervalos não diários que permite a dissociação do inibidor e hidrólise do substrato. No entanto, também são considerados outros regimes de administração.

Terapia Farmacológica de Associação

A chaperona farmacológica pode ser utilizada para tratar doentes com doenças neurológicas em associação com outros fármacos que também são utilizados para tratar o distúrbio. Os tratamentos farmacológicos convencionais para a doença de Parkinson incluem mas não se limitam a; RNAi e agentes farmacológicos tais como levodopa, anticolinérgicos, inibidores de COMT (Catecol-O-metil-transferase), agonistas do recetor de dopamina, MAOI (inibidor de monoamina-oxidases), inibidores de descarboxilase periférica.

A chaperona ou chaperonas farmacológicas para a GCase também podem ser utilizadas para tratar doentes com doença de Niemann-Pick de Tipo C em associação com alopregnanolona, uma dieta baixa em colesterol ou agentes de diminuição de colesterol tais como as estatinas (por exemplo, Lipitor®); fibratos tais como fenofibrato (Lipidil®); niacina; ezetimiba (Zetia®) e/ou resinas de ligação tais como colestiramina (Questran®).

Além disso, a chaperona farmacológica pode ser utilizada em associação com terapia de genes. É considerada a terapia de genes tanto com genes de substituição tais como Gba ou com um inibidor de ARN (siRNA) para o gene de SNCA. A terapia de genes é descrita em mais pormenor no pedido de patente de propriedade geral com o número de série 10/781,356, apresentado em 17 de Fevereiro de 2004.

Outra terapia de associação considerada inclui associações de chaperonas farmacológicas específicas com terapia de vacina, compreendendo uma tal vacina α -syn e um adjuvante (Pilcher et al., *Lancet Neurol.* 2005; 4(8):458-9) ou associações de chaperonas de GCase com chaperonas para a α -syn, tal como Hsp70 ou uma chaperona farmacológica específica, associações com agentes anti-inflamatórios tais como ibuprofeno ou outros NSAIDS, ou com outros agentes que podem ser protetores em doenças neurodegenerativas tais como o dextrometorfano (Li et al., *FASEB J.* 2005; Apr;19(6):489-96), genisteína (Wang et al., *Neuroreport.* 2005; Feb 28;16(3):267-70) ou minociclina (Blum et al., *Neurobiol Dis.* 2004; Dec;17(3):359-66).

Também é considerada a terapia de associação com um inibidor de substrato para a GCase, tal como a N-butil-desoxinojirimicina (Zavesca®).

Por fim também são consideradas as associações de chaperonas para a GCase com uma ou mais chaperonas para outras enzimas lisossômicas. Numa forma de realização, as chaperonas são administradas a um indivíduo que não tem quaisquer mutações em qualquer uma das enzimas lisossômicas para as quais são administradas as chaperonas. Noutra forma de realização, o indivíduo tem uma mutação numa enzima lisossômica diferente da GCase e é administrada uma chaperona específica para essa enzima em associação com a chaperona para a GCase. A seguir encontra-se um Quadro que lista chaperonas potenciais para enzimas lisossômicas.

Quadro 1

ENZIMA LISSOSSÓMICA	CHAPERONA FARMACOLÓGICA ESPECÍFICA
α -Glucosidase GenBank N° de Acesso Y00839	1-desoxinojirimicina (DNJ) α -homonojirimicina castanospermina
β -Glucosidase Ácida (β -glucocerebrosidase) GenBank N° de Acesso J03059	Isofagomina C-benzil-isofagomina e derivados N-alkyl (C9-12)-DNJ Glucoimidazole (e derivados) C-alkyl-IFG (e derivados) N-alkyl- β -valeinaminas Flufenozina calisteginas A ₃ , B ₁ , B ₂ e C ₁
α -Galatosidase A GenBank N° de Acesso NM000169	1-desoxigalatonojirimicina (DGJ) α -alo-homonojirimicina α -galato-homonojirimicina β -1-C-butyl-desoxinojirimicina calisteginas A ₂ e B ₂ N-metil calisteginas A ₂ e B ₂
β -Galatosidase Ácida GenBank N° de Acesso M34423	4-epi-isofagomina 1-desoxigalatonojirimicina
Galatocerebrosidase (β -Galatosidase Ácida) GenBank N° de Acesso D25283	4-epi-isofagomina 1-desoxigalatonojirimicina
α -Manosidase Ácida GenBank N° de Acesso U68567	1-desoximanojirimicina Swainsonina Manostatina A
β -Manosidase Ácida GenBank N° de Acesso U60337	2-hidroxi-isofagomina
α -L-fucosidase Ácida GenBank N° de Acesso NM_000147	1-desoxifuconojoirrimicina α -homofuconojoirrimicina 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol 2,5-desoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol
α -N-Acetilglucosaminidase GenBank N° de Acesso U40846	1,2-didesoxi-2-N-acetamido- nojirimicina
α -N-Acetilgalatosaminidase GenBank N° de Acesso M62783	1,2-didesoxi-2-N-acetamido- galatonojirimicina

ENZIMA LISSOSSÓMICA	CHAPERONA FARMACOLÓGICA ESPECÍFICA
β -Hexosaminidase A GenBank N° de Acesso NM 000520	2-N-acetilamino-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina nagstatina
β -Hexosaminidase B GenBank N° de Acesso NM 000521	2-N-acetilamido-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina nagstatina
α -L-Iduronidase GenBank N° de Acesso NM 000203	1-desoxiiduronojirimicina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
β -Glucuronidase GenBank N° de Acesso NM 000181	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Sialidase GenBank N° de Acesso U84246	ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico Siaistatina B
Iduronato-sulfatase GenBank N° de Acesso AF 011889	2,5-anidromanitol-6-sulfato
Esfingomielinase ácida GenBank N° de Acesso M59916	desipramina, fosfatidilinositol-4,5-difosfato

Numa forma de realização específica, a doença de Niemann-Pick de Tipo C é tratada com uma chaperona farmacológica específica para a GCase em associação com uma chaperona farmacológica específica para a β -hexosaminidase A e/ou uma chaperona farmacológica específica para a β -galactosidase ácida, uma vez que esta doença se caracteriza pela acumulação de gangliosídeos G_{M2} e gangliosídeos G_{M1} além de GlcCer (Vanier et al., *Brain Pathology*. 1998; 8: 163-74).

Determinação das Respostas à Terapia com Chaperonas

Como indicado acima, doentes com sintomas neurológicos característicos de doenças neurodegenerativas. Por exemplo, doentes possuindo doença de Parkinson sentem tremor, rigidez, bradicinesia e desequilíbrio postural. Doentes possuindo Demência de Corpo de Lewy sentem sintomas psicóticos fortes (alucinações visuais) além de declínio mental tal como perda de memória e uma incapacidade para realizar tarefas simples. A observação de melhorias nos sintomas com a terapia farmacológica de chaperonas, ou um atraso no início de certos sintomas em doentes em risco de

desenvolver um distúrbio, ou um atraso na progressão do distúrbio será evidência de uma resposta favorável à terapia de chaperonas.

Além disso, marcadores substitutos mensuráveis também podem ser úteis para avaliar a resposta à terapia de chaperonas. Por exemplo, alguns investigadores descreveram a deteção de níveis mais elevados de α -syn ou foram detetadas formas oligoméricas de α -syn no plasma de doentes com doença de Parkinson (Lee et al., *J Neural Transm.* 2006;113(10):1435-9; El-Agnaf et al., *FASEB J.* 2006;20(3):419-25), enquanto alguns descreveram uma diminuição de α -syn no plasma de doentes com Parkinson em comparação com controlos normais (Li et al., *Exp Neurol.* 2007;204(2):583-8).

EXEMPLOS

A presente invenção é ainda descrita por meio dos exemplos, apresentados abaixo. Do mesmo modo, a invenção não está limitada a quaisquer formas de realização particulares preferidas aqui descritas. De facto, muitas modificações e variações da invenção serão evidentes para os especialistas na técnica ao lerem esta especificação. Por conseguinte, a invenção é para ser limitada apenas pelos termos das reivindicações apenas juntamente com o âmbito total de equivalentes aos quais as reivindicações são intituladas.

EXEMPLO 1: Atividade de GCase In Vivo em Ratos Após Tratamento com IFG

Uma chaperona para a GCase, IFG, foi administrada a ratos normais que expressam a GCase de tipo selvagem e foi avaliada a atividade da GCase.

Métodos

Administração de fármaco. Este Exemplo proporciona informação sobre os efeitos da isofagomina, uma chaperona específica para a GCase em ratos. A IFG foi administrada em ratos a 200 mg/kg/dia; os órgãos e plasma foram recolhidos 4 semanas após o início do estudo. Foram utilizados dez ratos C57BL6 masculinos (25 g) por grupo. O fármaco foi administrado na água de beber, pelo que o consumo de água foi seguido diariamente.

No grupo de controlo (0 mg/kg/dia), os ratos foram administrados diariamente na água de beber (sem fármaco) e divididos em dois grupos. Dez animais foram mortos por eutanásia após 4 semanas de tratamento, o sangue foi colhido a partir da aorta descendente ou da veia cava, e os tecidos foram colhidos e em seguida necropsiados.

No grupo de ensaio, 10 ratos foram administrados diariamente na água de beber com um objetivo de administração de 200 mg/kg/dia.

As amostras de sangue foram colhidas para heparina de lítio e centrifugadas em relação ao plasma. Após o sangramento, o baço, pulmão, cérebro e fígado foram retirados e colocados em frascos. Os frascos foram colocados em gelo seco para congelação rápida. Os tecidos e plasma foram então analisados em relação aos níveis e GCase no tecido.

Preparação do tecido. Foram retiradas pequenas porções de tecido e adicionadas a 500 µl de tampão de lise (citrato de sódio 20 mM e di-hidrogenofosfato de sódio 40 mM, pH 4,0, incluindo 0,1% de Triton X-100). Os tecidos foram em seguida homogeneizados durante um intervalo de tempo curto

utilizando um micro-homogeneizador, seguida de centrifugação a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e utilizados no ensaio de enzima.

Ensaio de enzima no tecido. A 2,5 µl de sobrenadante (em placas de 96 poços) foram adicionados 17,5 µl de tampão de reação (tampão de citrato fosfato, pH 4,5, sem Triton X-100), e 50 µl de substrato marcado com 4-metil-umbeliferona (4-MU), β -glucopiranósido ou um controle negativo marcado (α -glucopiranósido ou α -galactopiranósido). As placas foram incubadas a 37 ° durante 1 hora, seguida da adição de 70 µl de tampão de paragem (glicina-NaOH 0,4 M, pH 10,6). A atividade da GCase foi determinada medindo a emissão a 460 nm por excitação a 355 nm utilizando um tempo de leitura de 1 segundo por poço (contador multietiqueta Victor2-Wallac). A atividade enzimática foi normalizada à quantidade de lisado adicionada em µl e foi estimada a atividade enzimática por µl de lisado. A taxa de melhoramento é igual à atividade com o composto em relação à atividade sem o composto.

Resultados

Como demonstrado na **Figura 1**, os níveis de GCase aumentaram após duas semanas de tratamento com IFG no fígado (1), baço (2), cérebro (3) e pulmão (4). Foram observados resultados semelhantes numa experiência separada em que 10 ratos foram tratados, cada, com 0, 1, 10 ou 100 mg/kg/dia de IFG base livre; a GCase de tipo selvagem atividade exibiu um aumento dose-resposta linear com a IFG base livre.

Estes resultados sustentam a confirmação que as chaperonas farmacológicas específicas podem aumentar a atividade da GCase não mutante *in vivo* e particularmente no cérebro.

Estes resultados sustentam a confirmação que as chaperonas farmacológicas específicas podem aumentar a atividade da GCase não mutante *in vivo* e particularmente no cérebro.

EXEMPLO 2: Administração de Doses Múltiplas de IFG para Avaliar a Segurança, Tolerabilidade, Farmacocinética e Efeito na Atividade Enzimática da β -Glucocerebrosidase

Foi anteriormente demonstrado que a DGJ, uma chaperona farmacológica para a α -galactosidase A, outra enzima lisossômica, produziu um aumento dependente da dose na atividade da α -galactosidase A em glóbulos brancos de voluntários saudáveis a 50 mg b.i.d. e 150 mg b.i.d.

Este exemplo descreve dois estudos de Fase I de duplo cego, controlado com placebo para a administração oral de IFG para avaliar a segurança, tolerabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica da IFG em voluntários saudáveis.

Conceção e Duração do Estudo. Num primeiro estudo de dose única ascendente em humanos (1a) foram administrada doses de 8, 25, 75, 150 (dois coortes) e 300 mg (6 ativos, 2 placebos em cada coorte). Num estudo de dose ascendente múltipla (1b) foram administradas diariamente doses de 25, 75 e 225 mg durante sete dias (6 ativos, 2 placebos em cada coorte). Em ambos os estudos, dos oito indivíduos em cada grupo; seis foram distribuídos aleatoriamente para receber tartrato de IFG e dois indivíduos receberam placebo. Os indivíduos foram mantidos confinados desde o anoitecer do dia 1 até 24 h após a conclusão da administração. Na estudo

de fase 1a, os indivíduos regressaram às 48 h (amostragem PK) e 7 dias (seguimento de segurança) após administração. No estudo de fase 1b, os indivíduos regressaram às 48 h (amostragem PD), 7 dias (amostragem PD e seguimento de segurança) e 14 dias (amostragem PD) após a última dose.

População de Estudo. Os indivíduos eram voluntários masculinos e femininos saudáveis entre 19 e 55 anos de idade (inclusive) constituídos por membros da comunidade em geral.

Avaliações de Segurança e Tolerabilidade. A segurança foi determinada avaliando os sinais vitais, parâmetros laboratoriais (química do soro, hematologia e exame de urina), exame físico e registrando eventos desfavoráveis durante o Intervalo de Tratamento.

Amostragem Farmacocinética. Foram colhidas amostras de sangue (10 mL cada) em tubos de colheita de sangue contendo EDTA antes da administração ter sido determinada em intervalos regulares para a fase 1a durante 48 h após administração. No estudo de fase 1b foi determinado um perfil farmacocinético total do tartrato de IFG durante 24 h após a primeira dose, os valores de C_{min} foram obtidos pré-dose nos dias 6 e 7, e foi determinado outro perfil total durante 24 h após a dose final, dia 7.

Amostragem para a atividade enzimática da GCase. A atividade da GCase foi determinada pré-dose nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 14 e 21. As amostras de sangue foram arrefecidas num banho de gelo e centrifugadas sob refrigeração o mais cedo possível. As amostras de plasma foram divididas em duas alíquotas e conservadas a $20 \pm 10^{\circ}\text{C}$ a aguardar ensaio. No final do estudo, todas as amostras foram transferidas

para o MDS Pharma Services Analytical Laboratories (Lincoln) para análise. Foi recolhida a produção total de urina de cada indivíduo para a análise de IFG para determinar a eliminação renal durante as primeiras 12 horas após a administração do tartrato de IFG nos dias 1 e 7.

Análise Estatística. Os dados de segurança incluindo avaliações laboratoriais, exames físicos, eventos desfavoráveis, acompanhamento do ECG e avaliações dos sinais vitais foram resumidos por grupo de tratamento e ponto de tempo da colheita. Foram calculadas estatísticas descritivas (média aritmética, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) em relação aos dados de segurança quantitativos bem como em relação à diferença relativamente ao valor de base. As contagens de frequência foram compiladas para classificação dos dados de segurança qualitativos.

Resultados

Farmacocinética. Em ambos os estudos, o tartrato de isofagomina foi geralmente bem tolerado a todas as doses e os eventos desfavoráveis emergentes do tratamento em ambos estudos foram sobretudo ligeiros. Não ocorreram quaisquer eventos desfavoráveis graves.

O tartrato de isofagomina exibiu uma boa exposição sistémica através da via oral. No estudo de dose única, os valores de AUC e Cmax no plasma correlacionaram linearmente com a dose administrada. Os níveis médios no plasma atingiram um máximo às 3,4 h (EPM: 0,6 h) e a semivida de eliminação do plasma foi de 14 h (EPM: 2 h). No estudo de dose múltipla, após 7 dias de administração oral, foi determinado que o comportamento farmacocinético era linear

com a dose, sem acumulação inesperada de tartrato de isofagomina. Os valores de Tmax e semivida foram semelhantes aos observados no estudo de dose única.

Depois de terem sido administradas doses repetidas de 25 a 225 mg de IFG a indivíduos masculinos e femininos saudáveis, as semividas médias variaram desde 5,14 a 19,9 horas. Foi observada uma acumulação mínima de IFG após doses repetidas, com base nas comparações de AUC e Cmax nos Dia 1 e Dia 7. Não foram observadas quaisquer diferenças entre géneros nos parâmetros farmacocinéticos avaliados.

Os eventos desfavoráveis mais frequentemente descritos pelos indivíduos adultos saudáveis que receberam IFG incluíram dermatite de contacto, dor de cabeça, náusea, aumento da bilirrubina no soro, tonturas, escaras, hiperemia ocular e dor no sítio de punção. Não ocorreram eventos desfavoráveis graves e nenhum indivíduo interrompeu o tratamento devido a um evento desfavorável.

Atividade da GCase. Em todos os indivíduos que receberam IFG houve um aumento acentuado dos níveis de GCase durante o intervalo de tratamento, seguido de uma diminuição após remoção do fármaco e um regresso próximo dos níveis de base cerca do dia 21, duas semanas após a última dose de IFG. Os aumentos nos níveis de enzima estavam relacionados com a dose, atingindo aproximadamente 3,5 vezes acima do valor de base (Figura 2). Estes resultados indicam que a IFG administrada por via oral tem o potencial de aumentar os níveis do seu alvo pretendido, GCase, *in vivo* em humanos.

EXEMPLO 3: Avaliação da IFG em Ratos Transgénicos que Sobreexpressam α -Sinucleína

Este exemplo descreve resultados da administração de IFG a ratos transgênicos que sobreexpressam α -sinucleína. A expressão neuronal de α -sinucleína humana de tipo selvagem resultou numa acumulação progressiva de α -sinucleína e em inclusões imunorreativas ubiquitinadas, incluindo nucleares e citoplasmáticas, em neurónios do neocórtex, hipocampo CA3 e substantia nigra cerca dos dois meses de idade (Masliah et al, *Science*. 2000; 287: 1269). Com base na aptidão da IFG para aumentar a atividade da GCase de tipo selvagem em ratos e humanos, antecipou-se que o aumento de GCase nestes ratos poderia compensar a α -sinucleína sobreexpressada e reduzir ou eliminar as inclusões.

Métodos

Ratos. 48 animais transgênicos (machos e fêmeas) foram distribuídos por 6 grupos (n=8) numa idade de 5 a 6 semanas em relação ao valor de base e 3 a 4 semanas, respetivamente em relação a todos os outros grupos de tratamento no início do tratamento. Um grupo de animais transgênicos serviu como o grupo de base (5 semanas de idade) e foi sacrificado sem tratamento no dia 0. Um grupo de animais transgênicos foi tratado com veículo.

Tratamento. Os ratos (3-4 semanas de idade) foram tratados uma vez por dia (por via oral) a 2 mg/kg; 20 mg/kg; ou 200 mg/kg de tartrato de IFG durante 3 meses. Um grupo também foi tratado uma vez dia sim dia não a 20 mg/kg.

Preparação de tecido. Os animais do grupo de base foram sacrificados às 5 semanas de idade. Todos os outros animais foram sacrificados no final dos 3 meses do intervalo de tratamento e foram extraídos sangue para a preparação de soro e macrófagos bem como pulmão, cérebro e CSF. Portanto,

todos os ratos foram sedados por anestesia de inalação corrente (Isoflurano, Baxter). O líquido cefalorraquidiano foi obtido por dissecação brusca e exposição do buraco occipital. Após exposição foi inserida uma pipeta Pasteur até uma profundidade aproximada de 0,3 - 1 mm no buraco occipital. O CSF foi recolhido por sucção e ação capilar até o fluxo parar completamente. O CSF foi imediatamente congelado e mantido a -80 °C.

Após amostragem do CSF, cada rato foi colocado em decúbito dorsal, o tórax foi aberto e uma agulha de calibre 26 ligada a uma seringa de 1 cc foi inserida na câmara ventricular cardíaca direita. Foi aplicada uma ligeira sucção na agulha. O sangue foi separado em 2 partes. Uma parte foi recolhida em citrato de sódio a 3,8% para obter o plasma e macrófagos, uma parte para obter soro. Os ratos foram perfundidos transcardiacamente com soro fisiológico (0,9%) e o tecido pulmonar bem como o cérebro foram retirados rapidamente. Os pulmões foram lavados com PBS frio (apenas por fora) para remover o sangue e em seguida foram congelados rapidamente.

Os cérebros foram retirados e cortados ao meio. Os hemisférios direitos de todos os ratos foram fixados por imersão em paraformaldeído a 4%/PBS recém-preparado (pH 7,4) durante uma hora à temperatura ambiente. Depois disso, os cérebros foram transferidos para uma solução de sacarose a 15% em PBS durante 24 horas para garantir crioproteção. No dia seguinte, os cérebros foram congelados em isopentano líquido e conservados a -80°C até serem utilizados em investigações histológicas. Para determinar os efeitos do tratamento com tartrato de IFG foram cortadas criossecções com 10 µm de espessura a partir de 8 animais por grupo para determinação de patologia de alfa-sinucleína. Todos os órgãos e tecidos mencionados foram amostrados e regiões

específicas do cérebro, isto é, hipocampo, mesencéfalo, córtex frontal e corpo estriado de um hemisfério cerebral foram extraídas e congeladas. O outro hemisfério cerebral foi processado para avaliação histológica.

Revelação. Para avaliação do número de células positivas para α -sinucleína e inclusões de tipo corpo de Lewy foi realizada uma revelação imuno-histoquímica utilizando o anticorpo monoclonal específico contra a alfa-sinucleína humana (Alexis®; Cat# 804-258-L001), diluição 1:5, detetado com o anticorpo secundário Cy2 (Jackson Immunoresearch®). Foi contado o número de células positivas para alfa-sinucleína em cinco camadas diferentes, uma fatia por camada, para avaliação no hipocampo inteiro e córtex separadamente.

Resumidamente, as amostras foram lavadas durante 10 min com PBS à temperatura ambiente, seguida de fixação durante 30 min à temperatura ambiente com paraformaldeído a 4%, seguida de lavagem 2 vezes durante 5 min cada com PBS à temperatura ambiente. Para as secções tratadas com Proteinase K, as secções foram incubadas em PBS contendo 10 μ g/ml de proteinase-K durante 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram incubadas durante 15 min à temperatura ambiente com solução de bloqueio para bloquear a peroxidase endógena, seguida de mais duas lavagens de 5 min com PBS. As amostras foram em seguida incubadas durante 60 min à temperatura ambiente com um reagente de bloqueio para bloquear a ligação não específica, seguida de mais duas lavagens de 5 min com PBS. As amostras foram em seguida incubadas com diluente M.O.M. durante 5 min à temperatura ambiente, seguida de incubação com o anticorpo primário (diluição 1:5 em diluente M.O.M.) durante 60 min à temperatura ambiente.

Após uma hora, as amostras foram lavadas 2 vezes durante 5 min com PBS à temperatura ambiente e incubadas durante mais 60 min à temperatura ambiente com reagente de bloqueio. Após duas lavagens, as amostras foram incubadas com um Ab Cy 2 secundário Anti-Ratazana de Cabra (Diluição 1:200 em M.O.M.) durante 60 minutos à temperatura ambiente, na ausência de luz. As amostras foram em seguida lavadas durante 5 min com PBS, durante 5 min com água de tipo biologia molecular estéril, e tapadas com poli(álcool vinílico).

Determinação da Patologia de α -Sinucleína no Cérebro. Para avaliação da imunorreatividade de α -sinucleína foi utilizado software de análise de imagem especializado (Image Pro Plus, versão 4.5.1.29). Cada imagem de fluorescência foi registada utilizando o mesmo tempo de exposição fixado em 400 ms. Foram reunidas até 100 imagens simples com amplificação de 100 vezes cada numa única imagem (tamanho real cerca de 3×1 m), garantindo uma resolução de pixel elevada para a contagem de IR. Todas as imagens reunidas foram contrastadas manualmente e para deteção em todas as medições foi utilizada o mesmo limiar com base na intensidade. Foi fixada uma restrição de tamanho para um tamanho de mínimo de $30 \mu\text{m}^2$ para se ter a certeza que se faz a contagem de uma única célula na camada muito perspicaz e apenas uma vez entre as camadas adjacentes. Durante o procedimento de classificação baseado em macro foram guardados os limites das contagens do objeto.

Num outro passo, todos os objetos medidos foram extraídos da imagem original (sem contraste) utilizando os limites guardados e reunidos de acordo com tamanho do objeto numa imagem objeto selecionada. As imagens objeto selecionadas

foram reavaliadas utilizando uma restrição circularidade (limite inferior: 1; limite superior: 1,5) para separar células positivas para α -sinucleína de objetos polarizados. Estas contagens automáticas de objetos foram visualmente controladas e a contagem manualmente corrigida adicionando todas as células explícitas que não são suficientemente circulares ou que não são separáveis das anteriores na folha de cálculo, levando à contagem de células final.

Os seguintes parâmetros foram avaliados e calculados:

- medição da área do córtex e do hipocampo em cada fatia; e
- número de células positivas para IR por área de medição das regiões específicas do cérebro hipocampo e córtex.

Resultados

Qualitativo. As diferenças entre ratos tratados e não tratados foram qualitativamente visíveis em graus diferentes desde fundo fortemente reduzido e diminuição do número de células positivas para α -sinucleína em alguns dos animais tratados com tartrato de IFG (2 e 20 mg/kg p.c. diariamente) até redução do fundo sem diminuição do número de células imunorreativa, em comparação com a patologia de animais de controlo (**Figuras 3A-C, córtex; Figuras 4A-C, hipocampo**). A intensidade do fundo em ratos que sobreexpressam α -sinucleína humana resulta de α -sinucleína intracelular em processos nevríticos e dendríticos bem como em sinapses, pelo que uma redução do fundo é equitativa a uma redução da expressão da proteína nestas estruturas neuronais.

Esta é a primeira demonstração que este modelo de rato desenvolve α -sinucleína agregada, como evidenciado pela revelação de secções de um rato tratado com um controlo de

veículo (**Figura 5A**). O pré-tratamento de secções com Proteinase-K antes da revelação em relação à α -sinucleína também revela a presença de α -sinucleína agregada por digestão de α -sinucleína monomérica (**Figura 5C**). O pré-tratamento do rato com IFG parece reduzir a agregação de α -sinucleína. A imagem representa a análise de um único animal que até à data respondeu a 20mg/kg de tartrato de IFG na ausência ou presença de pré-tratamento com Proteinase K (**Figuras 5B e D**, respetivamente). Uma vez que os agregados de α -sinucleína são resistentes a digestão pela Proteinase K, o pré-tratamento revela que os agregados de α -sinucleína acumulam neste modelo animal ao longo do quadro temporal investigado e que o tratamento com tartrato de IFG nos 3 meses anteriores ao sacrifício previne a acumulação destes agregados de α -sinucleína.

Quantitativo. O tratamento com tartrato de IFG levou a uma menor patologia de α -sinucleína em ambas as regiões cerebrais medidas, contudo o efeito foi mais pronunciado no hipocampo (**Figura 5B**) e não atingiu nível de significância no córtex (**Figura 6A**). A dose resposta foi claramente visível no hipocampo e potencialmente no córtex. A dose mais baixa, 2 mg tartrato de IFG/kg, foi a mais eficaz e reduziu significativamente o número de células imunorreativas no hipocampo em comparação com os controlos tratados com veículo ($p < 0,05$) (**Figura 6B**). Dosagens mais elevadas não levaram a reduções estatisticamente significativas da α -sinucleinopatologia. Não houve qualquer diferença entre um tratamento diário e dia sim dia não com 20 mg tartrato de IFG, e a média estava ao mesmo nível. No entanto tem de ser especificado que a dose de 20 mg não foi eficaz em comparação com os controlos e por conseguinte o resultado de que cada o tratamento todos os dias ou dia sim dia não tem a mesma eficácia pode não ser rigoroso.

As avaliações no grupo de base levaram aos seguintes resultados: Primeiro, à idade de cinco semanas houve variação nos ratos individuais no que se refere ao aspeto das células cheias de α -sinucleína no hipocampo, levando a variação da patologia no hipocampo e a um desvio padrão estatístico elevado. Além disso, o número de células imunorreativas no córtex foi consistentemente baixo nesta idade. Por conseguinte, o aumento da patologia durante o envelhecimento foi significativa relativamente a todos os grupos investigados no córtex, mas não atingiu nível de significância no hipocampo devido às diferenças individuais nesta região no grupo de base.

Depois de fazer a média de ambas regiões para uma média individual, igual para aumentar o volume total investigado por animal, todos os grupos tiveram uma carga de células positivas para α -sinucleína significativamente maior do que o valor de base ($p < 0,01$), exceto os ratos tratados com a dose mais eficaz, 2 mg de tartrato de IFG ($p > 0,05$). Isto permite concluir que a dosagem de 2 mg tartrato de IFG/kg preveniu que os ratos tivessem um aumento da patologia acompanhado pela idade.

Estes dados suportam que o aumento da GCase pode diminuir os níveis de α -sinucleína e prevenir a agregação de monómeros de α -sinucleína em agregados oligoméricos. Estas observações são ainda suportadas por resultados recentes em que foram observados níveis elevados de α -syn no plasma (como detetado por ELISA) de doentes com doença de Gaucher (isto é, possuindo atividade da GCase diminuída) em comparação com controlos normais ($p = 0,027$). Foram avaliados os plasmas de cinquenta e três seres masculinos e femininos com doença de Gaucher (incluindo um masculino com Tipo 3).

EXEMPLO 4: Acumulação de α -sinucleína e o Desenvolvimento de um Fenótipo Comportamental de Parkinsonismo nos Cérebros de Ratos com Atividade de GCase Reduzida

Este exemplo descreve resultados de análises imuno-histoquímicas de alfa-sinucleína nos cérebros de ratos transgênicos mutantes com gene exógeno introduzido com atividade de GCase reduzida e ratos V394L homozigóticos com gene exógeno introduzido tratados com β -epóxido de conduritól (CBE) um inibidor irreversível da GCase. Os modelos de ratos transgênicos que têm atividades de GCase reduzidas e acumulam glucosilceramida (Sun et al 2005, *Journal of lipid research*) no cérebro, também acumularam α -sinucleína ubiquitinada e agregada. Foi desenvolvido um modelo de rato transgênico para a doença de Gaucher que não acumula glucosilceramida ou α -sinucleína no cérebro, mas que poderia ser induzido a acumular glucosilceramida e α -sinucleína por tratamento com β -epóxido de conduritól (CBE), um inibidor irreversível de GCase.

Métodos

Ratos. Ratos homozigóticos para as mutações pontuais D409H ou V394L e que expressam um nível baixo de saposina C num fundo de prosaposina anulada foram analisados quanto à acumulação de α -sinucleína no cérebro. Foi descrito que estes ratos acumulam glucosilceramida no cérebro. Ratos homozigóticos apenas para as mutações pontuais V394L foram analisados quanto à acumulação de α -sinucleína com e sem tratamento com CBE. Estes ratos não acumulam glucosilceramida no cérebro, a menos que tratados com CBE. Os ratos foram administrada diariamente com CBE por injeção intraperitoneal durante 30 dias consecutivos (500 μ M calculada a partir do peso total do rato) e os cérebros

foram analisados por imuno-histoquímica em relação à acumulação de α -sinucleína.

Preparação de tecido e revelação. O tecido cerebral foi congelado e fixado para imuno-histoquímica com paraformaldeído a 4% e secções em série foram comarcadas com anti- α -sinucleína humana (ab1903; Abcam, Cambridge, MA) e anti-ubiquitina de coelho (ab7780; Abcam, Cambridge, MA).

Resultados

Secções em série dos cérebros de ratos possuindo uma mutação Gba combinada (D409H ou V394L) com expressão reduzida da proteína de ativação da GCase, prosaposina C foram reveladas em relação à α -sinucleína e ubiquitina. Em ratos com 10 semanas de idade foi observado um número significativo de agregados de α -sinucleína no hipocampo, gânglios basais (caudado, putamen, substantia nigra, núcleo subtalâmico), tronco cerebral e algumas regiões corticais e cerebelosas. Também foram encontrados agregados ubiquitinados nestas regiões e alguns estavam co-localizados com a α -sinucleína. No entanto não foram observados agregados de α -sinucleína em ratos V394L (com prosaposina normal). Contudo, o tratamento de ratos V394L com CBE durante 30 dias resultou na acumulação de α -sinucleína no cérebro. Combinados, estes resultados sugerem que a redução da atividade da GCase e o aumento dos níveis de glucosilceramida no cérebro pode levar a um aumento na acumulação de α -sinucleína.

Lisboa, 26 de Julho de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Isofagomina ou um seu sal para ser utilizado no tratamento de um indivíduo que possui ou está em risco de desenvolver uma alfa-sinucleinopatia, em que o indivíduo não tem uma mutação num gene que codifica a β -glucocerebrosidase.
2. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que o sal é tartrato de isofagomina.
3. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que a alfa-sinucleinopatia é selecionada de doença de Parkinson, Doença de Corpo de Lewy e Atrofia Sistémica Múltipla.
4. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que a alfa-sinucleinopatia é doença de Parkinson.
5. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que a isofagomina ou seu sal é administrado numa quantidade eficaz para aumentar a atividade da β -glucocerebrosidase em pelo menos 1,2 vezes em relação aos níveis de base do indivíduo.
6. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que a isofagomina ou seu sal é administrado numa quantidade eficaz para aumentar a atividade da β -glucocerebrosidase em pelo menos 1,5 vezes em relação aos níveis de base do indivíduo.
7. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 1, em que a isofagomina ou seu sal é administrado numa quantidade eficaz para aumentar a

atividade da β -glucocerebrosidase em pelo menos 2 vezes em relação aos níveis de base do indivíduo.

8. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 4, compreendendo ainda a coadministração de um segundo agente terapêutico.
9. Isofagomina ou um seu sal de acordo com a reivindicação 8, em que o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo consistindo de levodopa, um anticolinérgico, um inibidor de catecol-O-metil-transferase (COMT), um agonista do recetor de dopamina, um inibidor de monoamina-oxidase (MAOI), um inibidor de descarboxilase periférica e um anti-inflamatório

Lisboa, 26 de Julho de 2012

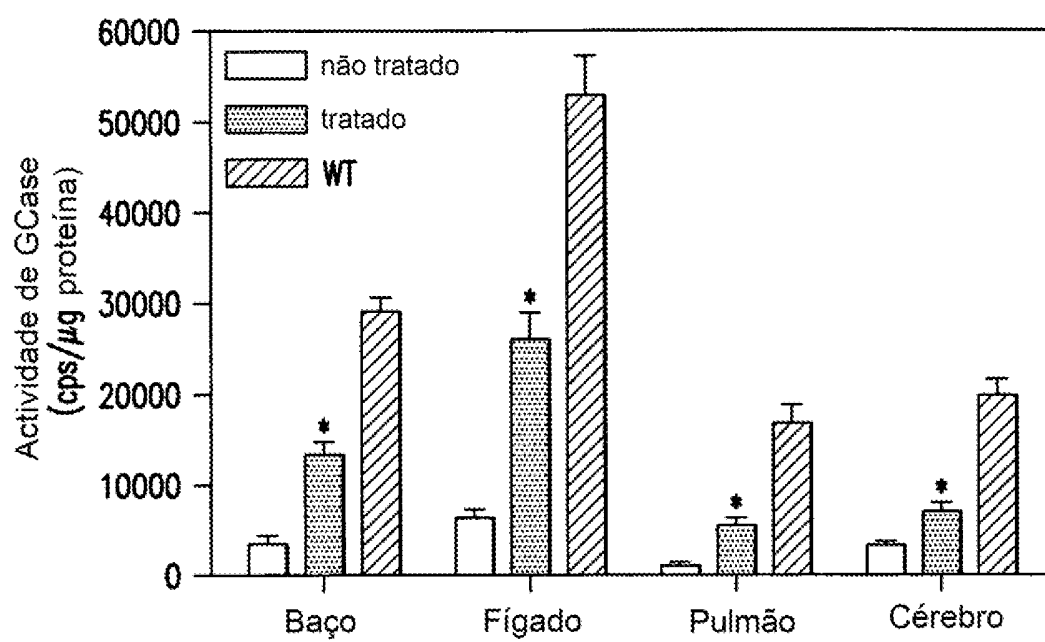
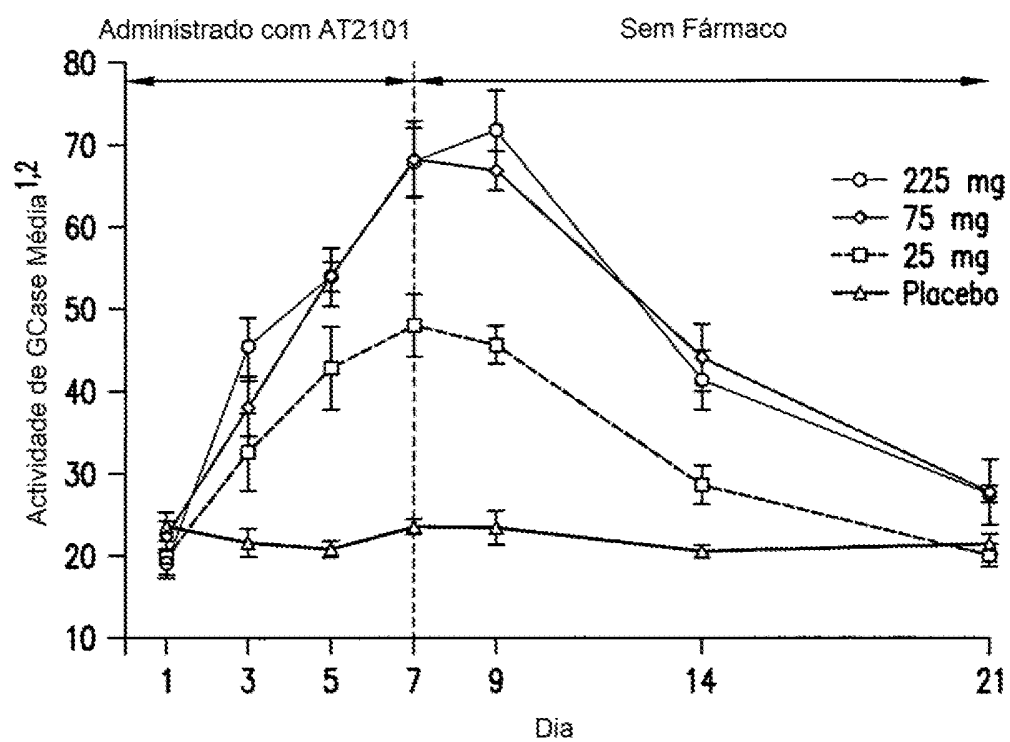


FIG.1



1. Unidades em nmole 4MU/mg de proteína por hora
2. Valores indicados com o erro padrão

FIG.2

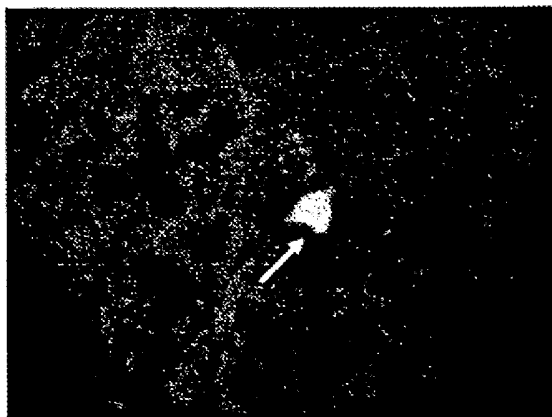


FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 3C

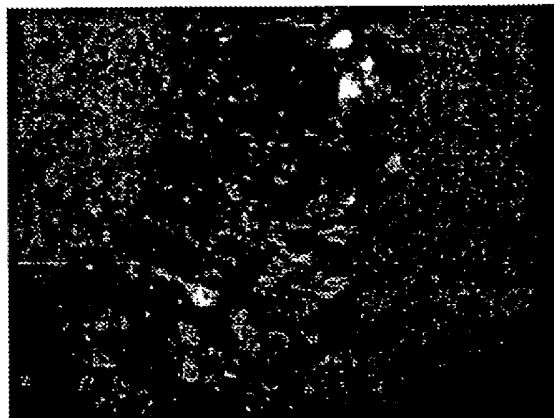


FIG.4A



FIG.4B



FIG.4C



FIG.5A



FIG.5B



FIG.5C

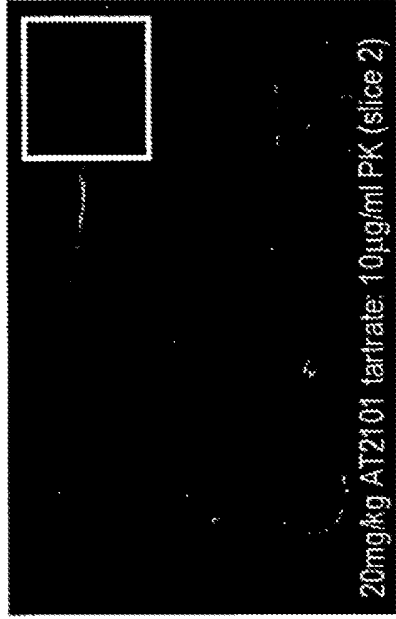


FIG.5D

FIG.6B

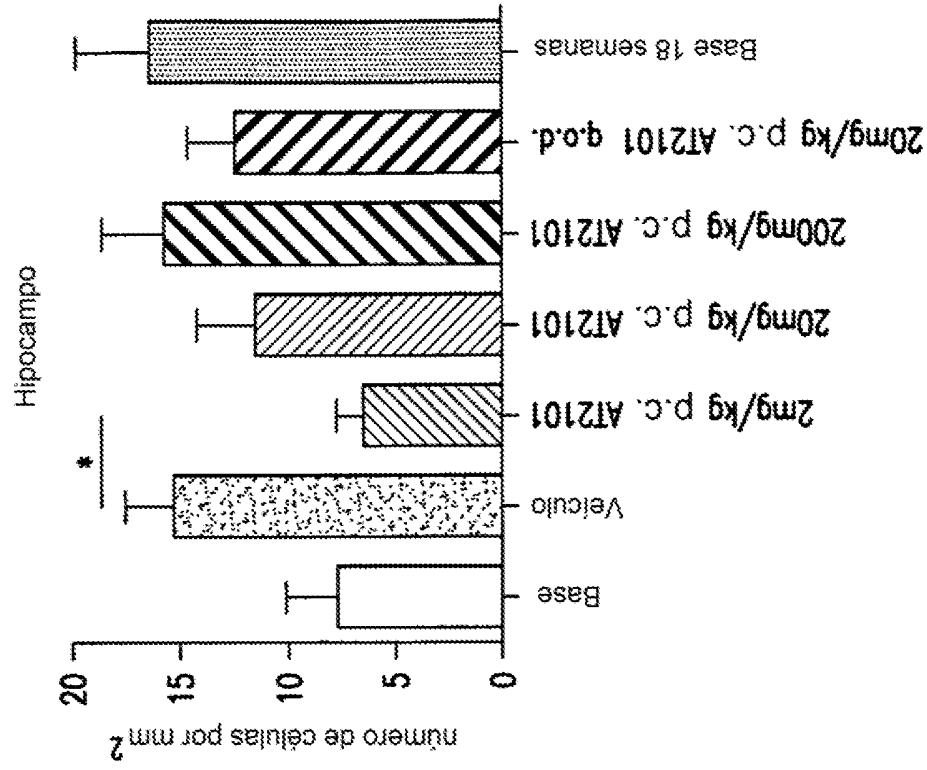


FIG.6A

