

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 872 326**

51 Int. Cl.:

C07D 453/00 (2006.01)

A61K 31/439 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014** **PCT/US2014/027081**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14152215**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014** **E 14718854 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021** **EP 2970250**

54 Título: **Formas de sal de (2-(2-(4-fluorofenil)thiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791706 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.11.2021

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

72 Inventor/es:

SIEGEL, CRAIG y
ZHAO, JIN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 872 326 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formas de sal de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

La presente invención se refiere a novedosas formas de sal de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo útiles como un inhibidor de glucosilceramida sintasa (GCS) y para el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como enfermedades de almacenamiento lisosómico, tanto solas como en combinación con terapia de reemplazo enzimático, y para el tratamiento del cáncer.

La glucosilceramida sintasa (GCS) es una enzima principal que cataliza la etapa de glucosilación inicial en la biosíntesis de glucoesfingolípidos de base de glucosilceramida (GSL), concretamente mediante la transferencia central de glucosa de UDP-glucosa (UDP-Glc) a ceramida para formar glucosilceramida. La GCS es una proteína esencial transmembranaria de tipo III localizada en el Golgi cis/medio. Se cree que los glucoesfingolípidos (GSL) son esenciales para la dinámica de muchos acontecimientos de la membrana celular, que incluyen interacciones celulares, señalización y tráfico. Se ha mostrado que la síntesis de estructuras de GSL (véase Yamashita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96(16), 9142-9147) es esencial para el desarrollo embrionario y para la diferenciación de algunos tejidos. La ceramida desempeña una función primordial en el metabolismo de los esfingolípidos y se ha mostrado que la regulación por disminución de la actividad de GCS tiene efectos notables en el patrón de esfingolípidos con expresión reducida de glucoesfingolípidos. Los esfingolípidos (SL) tienen una función biomoduladora en afecciones fisiológicas, así como cardiovasculares patológicas. En particular, los esfingolípidos y sus enzimas reguladoras parecen desempeñar una función en respuestas adaptativas a hipoxia crónica en el corazón de ratas neonatales (véase, El Alwanit et al., Prostaglandins & Other Lipid Mediators 2005, 78(1-4), 249-263).

Se han propuesto inhibidores de GCS para el tratamiento de una variedad de enfermedades (véase, por ejemplo, el documento de patente WO2005068426). Dichos tratamientos incluyen el tratamiento de enfermedades de almacenamiento de glucolípidos (por ejemplo, Tay Sachs, Sandhoffs, deficiencia del activador de GM2, gangliosidosis de GM1 y enfermedades de Fabry), enfermedades asociadas a la acumulación de glucolípidos (por ejemplo, enfermedad de Gaucher; Miglustat (Zavesca), un inhibidor de GCS, ha sido autorizado para terapia en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1, véase, Treiber et al., Xenobiotica 2007, 37(3), 298-314), enfermedades que provocan hipertrofia o hiperplasia renal, tales como nefropatía diabética; enfermedades que provocan hiperglucemia o hiperinsulinemia; cánceres en los que la síntesis de glucolípidos es anómala, enfermedades infecciosas provocadas por organismos que usan glucolípidos de la superficie celular como receptores, enfermedades infecciosas en las que la síntesis de glucosilceramida es esencial o importante, enfermedades en las que la síntesis de glucosilceramida es esencial o importante, enfermedades en las que se produce la excesiva síntesis de glucolípidos (por ejemplo, aterosclerosis, enfermedad poliquística renal e hipertrofia renal), trastornos neuronales, lesión neuronal, enfermedades inflamatorias o trastornos asociados con el reclutamiento y la activación de macrófagos (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, asma y septicemia) y diabetes mellitus y obesidad (véase el documento de patente WO 2006053043).

En particular, se ha mostrado que la expresión en exceso de GCS participa en multirresistencia a fármacos y altera la apoptosis inducida por ceramida. Por ejemplo, Turzanski et al., (Experimental Hematology 2005, 33 (1), 62-72) han mostrado que la ceramida induce la apoptosis en células de leucemia mieloide aguda (AML) y que P-glucoproteína (p-gp) confiere resistencia a la apoptosis inducida por ceramida, haciendo la modulación de la ruta ceramida-glucosilceramida una contribución notable a esta resistencia en células TF-1. Así, los inhibidores de GCS pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos proliferativos que inducen apoptosis en células enfermas.

La presente invención se refiere a una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de CuK α : 18,095.

La presente invención se refiere además a una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α : 18,095 y 17,493.

La presente invención se refiere además a una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α : 18,095 y 19,516.

La presente invención se refiere además a una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α : 18,095, 17,493, y 19,516.

La presente invención se refiere además a una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α : 18,095, 17,493, 19,516 y 20,088.

La presente invención se refiere además a una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 18,095, 17,493, 19,516 y 20,088 y 17,125.

5 También se desvela una forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 24,355.

También se desvela una forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 24,355 y 21,167.

10 También se desvela una forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 24,355, 21,167 y 27,343.

15 También se desvela una forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 24,355, 21,167, 27,343 y 16,111.

También se desvela una forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 24,355, 21,167, 27,343, 16,111 y 17,185.

20 También se desvela una forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 24,355, 21,167, 27,343, 16,111, 17,185 y 20,243.

También se desvela una forma cristalina de sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 17,162.

25 También se desvela una forma cristalina A de sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 17,162 y 18,028.

30 También se desvela una forma cristalina A de sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 17,162 y 14,280.

También se desvela una forma cristalina A de sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 17,162, 18,028 y 14,280.

35 También se desvela una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (S)-2-hidroxisuccinato sal, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 17,162, 18,028, 14,280 y 18,153.

También se desvela una forma cristalina A de sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 17,162, 18,028, 14,280, 18,153 y 23,422.

40 También se desvela una forma cristalina de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 18,087.

45 También se desvela una forma cristalina A de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 12,818.

También se desvela una forma cristalina A de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 25,722.

50 También se desvela una forma cristalina A de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de $\text{CuK}\alpha$: 12,818 y 25,722.

También se desvela una forma cristalina A de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α : 12,818, 25,722 y 13,040.

5 También se desvela una forma cristalina A de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α : 12,818, 25,722, 13,040 y 28,910.

FIG. 1 Difractograma de la forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo realizado en un difractómetro D8-Advance de Bruker.

10 FIG. 2 Difractograma de la forma cristalina B de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo realizado en un difractómetro D8-Advance de Bruker.

FIG. 3 Difractograma de la sal cristalina de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo realizado en un difractómetro D8-Advance de Bruker.

FIG. 4 Difractograma de la forma cristalina de sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo realizado en un difractómetro D8-Advance de Bruker.

15 Las mediciones se realizaron del siguiente modo: Aparato: difractómetro D8-Advance de Bruker, tipo: Bragg-Brentano; fuente CuK α 1, longitud de onda = 1,5406Å; generador: 35 kV - 40 mA; detector: PSD/Vantec; cámara Anton Paar TTK 450; portamuestras de Si; intervalo de ángulo: 2° a 40° en 2-theta Bragg; ranura de divergencia variable: 4 mm (V4); tamaño de etapa: 0,033°; tiempo de etapa: 1 s.

20 Se están usando o se persiguen varios enfoques para el tratamiento de LSD, la mayoría de los cuales se centran en la terapia de reemplazo enzimático para su uso solamente en el tratamiento de la enfermedad. Están disponibles en el mercado numerosas terapias de reemplazo enzimático aprobadas para tratar LSD (por ejemplo, Myozyme® para enfermedad de Pompe, Aldurazyme® para mucopolisacaridosis I, Cerezyme® para enfermedad de Gaucher y Fabrazyme® para enfermedad de Fabry). Además, los inventores han identificado varias moléculas pequeñas para su uso solamente en el tratamiento de LSD. Los métodos terapéuticos descritos en el presente documento proporcionaron
25 opciones de tratamiento para el médico que se enfrenta al tratamiento de diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico, como se describe en detalle a continuación.

El compuesto de la presente invención se puede usar para tratar una enfermedad metabólica, tal como una enfermedad de almacenamiento lisosómico (LSD), ya sea solo o como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático. En otros aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para inhibir
30 o reducir la actividad de GCS en un sujeto diagnosticado con una enfermedad metabólica, tal como una LSD, ya sea solos o como una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático. En otros aspectos, los compuestos de la presente divulgación se pueden usar para reducir y/o inhibir la acumulación de un material almacenado (por ejemplo, sustrato lisosómico) en un sujeto diagnosticado con una enfermedad metabólica, tal como una LSD. En ciertas realizaciones y casos de los aspectos anteriores, la LSD es Gaucher (tipo 1, tipo 2 o tipo 3), Fabry, gangliosidosis de GM1 o gangliosidosis de GM2 (por ejemplo, deficiencia del activador GM2, Tay-Sachs y Sandhoff). La
35 Tabla 1 enumera numerosas LSD e identifica la enzima deficiente correspondiente que se puede usar con una ERT en los anteriores aspectos.

En otros escenarios puede ser necesario proporcionar SMT a un paciente cuya afección requiere la reducción de sustratos en el cerebro y así no es tratable por administración sistémica de ERT. Mientras que la administración
40 intracerebroventricular o intratecal directa puede reducir los niveles de sustrato en el cerebro, la administración sistémica de ERT no es responsable de LSD con participación del sistema nervioso central (SNC) debido a su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y SMT puede demostrar ser beneficiosa en pacientes que tienen actividades enzimáticas residuales en el SNC.

Según la presente divulgación, se proporciona SMT a un paciente para tratar un cáncer y/o enfermedad metabólica, tal como una enfermedad de almacenamiento lisosómico. La SMT puede incluir una o más moléculas pequeñas. La SMT incluye administrar al paciente (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo según
45 la presente invención.

En ciertas realizaciones, se puede usar el compuesto de la invención para el tratamiento de prácticamente cualquier enfermedad de almacenamiento resultante de un defecto en la vía de glucoesfingolípidos (por ejemplo, Gaucher (es decir, tipo 1, tipo 2 tipo 3), Fabry, gangliosidosis de GM1, gangliosidosis de GM2 (por ejemplo, deficiencia del activador GM2, Tay-Sachs y Sandhoff)). En una realización particularmente preferida, el compuesto de la invención se usa para
50 inhibir y/o reducir la acumulación de Gb3 y/o liso-Gb3 en un paciente con enfermedad de Fabry, ya sea solo o como una terapia de combinación con terapia de reemplazo enzimático. En una realización preferida, la terapia de reemplazo enzimático incluye administrar alfa-galactosidasa A al paciente con Fabry. De hecho, un inhibidor de GCS de la divulgación reduce eficazmente el almacenamiento de Gb3 y liso-Gb3 en un modelo de ratón de enfermedad de Fabry, soportando así su uso como un enfoque viable para el tratamiento de enfermedad de Fabry. Además, los datos de
55

terapia de combinación *in vivo* sugieren fuertemente que un enfoque terapéutico combinado podría ser tanto aditivo como complementario.

En ciertos casos, se pueden usar los compuestos de la divulgación, tales como, por ejemplo, (2-(2-(4-fluorofenil)thiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo y (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo para reducir el nivel de GluCer y GluSph en el cerebro de un sujeto diagnosticado con enfermedad neuropática de Gaucher, tanto solo como en combinación con ERT (por ejemplo, administración de glucocerebrosidasa).

Las pautas posológicas para un componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación son determinadas, en general, por el profesional clínico experto y se espera que varíen significativamente dependiendo de la enfermedad de almacenamiento particular que está tratándose y del estado clínico del individuo afectado particular. Los principios generales para determinar una pauta posológica para una SMT dada para el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento se conocen bien por el experto. Se puede obtener orientación para pautas posológicas de cualquiera de las muchas referencias bien conocidas en la técnica sobre este tema. Está disponible orientación adicional, entre otros, de una revisión de las referencias específicas citadas en el presente documento. En ciertas realizaciones, dichas dosis pueden variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg, preferentemente desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg (por ejemplo, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg y 60 mg/kg) por administración intraperitoneal, oral o equivalente de una a cinco veces al día. Dichas dosis pueden variar desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 5 g/kg, preferentemente desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg por administración oral, intraperitoneal o equivalente desde una hasta cinco veces al día. En una realización, la dosis oscila desde aproximadamente aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día (por ejemplo, 10 mg/día, 20 mg/día, 30 mg/día, 40 mg/día, 50 mg/día, 60 mg/día, 70 mg/día, 80 mg/día, 90 mg/día, 100 mg/día, 110 mg/día, 120 mg/día, 130 mg/día, 140 mg/día, 150 mg/día, 160 mg/día, 170 mg/día, 180 mg/día, 190 mg/día, 200 mg/día, 210 mg/día, 220 mg/día, 230 mg/día, 240 mg/día, 250 mg/día, 260 mg/día, 270 mg/día, 280 mg/día, 290 mg/día, 300 mg/día). Un intervalo de dosis oral particularmente preferido es desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 100 mg, en donde la dosis se administra dos veces al día. Un intervalo de dosis oral particular para un compuesto de la presente invención es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 600 mg/kg/día. Un intervalo de dosis oral particular para un compuesto de la presente divulgación es desde aproximadamente 1 mg/kg/día hasta aproximadamente 120 mg/kg/día, por ejemplo, 1 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, 45 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, 55 mg/kg/día o 60 mg/kg/día, 65 mg/kg/día, 70 mg/kg/día, 75 mg/kg/día, 80 mg/kg/día, 85 mg/kg/día, 90 mg/kg/día, 95 mg/kg/día, 100 mg/kg/día, 105 mg/kg/día, 110 mg/kg/día, 115 mg/kg/día o 120 mg/kg/día.

En ciertas realizaciones, la invención se refiere a terapias de combinación de SMT que usan el compuesto de la invención y terapia ERT para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Una lista parcial de enfermedades de almacenamiento lisosómico conocidas que se pueden tratar según la invención se expone en la Tabla 1, que incluye nombre de la enfermedad común, material almacenado y deficiencia enzimática correspondiente (adaptado de la Tabla 38-4 de Kolodny et al., 1998, *Idem*).

TABLA 1

Enfermedades de almacenamiento lisosómico		
Enfermedad	Material almacenado	Deficiencia de enzima
<u>Esfingolipidosis</u>		
Gaucher	Glucocerebrósido, glucosilesfingosina	Glucocerebrosidasa
Niemann-Pick	Esfingomielina	Esfingomielinasa
Niemann-Pick B	Esfingomielina	Esfingomielinasa
Farber	Ceramida	Ceramidasa
Gangliosidosis de G _{M1}	Gangliósido G _{M1} , glucoproteína	Gangliósido G _{M1} -β-galactosidasa
Gangliosidosis de G _{M1} (Sandhoff)	Gangliósido G _{M2} , globósido	Hexosaminidasa A y B
Tay-Sachs	Gangliósido G _{M2}	Hexosaminidasa A
Krabbe	Galactosilceramida	β-Galactocerebrosidasa

<u>Mucopolisacaridosis</u>		
Hurler-Scheie (MPS I)	Sulfato de dermatano, sulfato de heparina	α -L-iduronidasa
Hunter (MPS II)	Sulfato de dermatano, sulfato de heparina	Iduronato sulfatasa
<u>Sanfilippo (MPS III)</u>		
Tipo A	Sulfato de heparano	Heparan-N-sulfatasa
Tipo B	Sulfato de heparano	N-acetil- α -glucosaminidasa
Tipo C	Sulfato de heparano	Acetil CoA: α -glucosaminida acetil-transferasa
Tipo D	Sulfato de heparano	N-acetil- α -glucosamina-6-sulfatasa
<u>Morquio (MPS IV)</u>		
Tipo A	Sulfato de queratano	Galactosamina-6-sulfatasa
Tipo B	Sulfato de queratano	β -galactosidasa
Maroteaux-Lamy (MPS VI)	Sulfato de dermatano	Galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B)
Sly (MPS VII)	Sulfato de dermatano, sulfato de heparano	β -glucuronidasa
Mucosulfatidosis	Sulfatidas, mucopolisacáridos	Arilsulfatasa A, B y C, otras sulfatasas
<u>Mucolipidosis</u>		
Sialidosis	Sialiloligosacáridos, glucoproteínas	α -neuraminidasa
Mucolipidosis II	Sialiloligosacáridos, glucoproteínas, glucolípidos	Suero alto, enzimas de alto fibroblasto; N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa
Mucolipidosis III	Glucoproteínas, glucolípidos	Mismo que antes
Mucolipidosis IV	Glucolípidos, glucoproteínas	Proteína transm Mcoln 1
<u>Otras enfermedades del metabolismo complejo de los hidratos de carbono</u>		
Fabry	Globotriaosilceramida (Gb3), liso-Gb3	α -galactosidasa A
Schindler	Glucopéptidos unidos a O	α -N-acetilgalactosaminidasa
Pompe	Glucógeno	α -glucosidasa
Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico	Ácido siálico libre	Desconocido
Fucosidosis	Fucoglucolípidos, fucosiloligosacáridos	α -fucosidasa
Manosidosis aspartilglucosaminuria amidasa	Manosiloligosacáridos Aspartilglucosamina	α -manosidasa Aspartilglucosamina
Wolman	Ésteres de colesterilo, triglicéridos	Lipasa ácida
<u>Lipofuscinosis ceroides neuronal (NCL)*</u>		
NCL infantil	Depósitos osmófilos granulares, saposinas A y D	Palmitoil-proteína tioesterasa (PPT1)

Infantil tardía	Perfiles curvilíneos, ATP sintasa subunidad c	Tripeptidil proteasa 1 (TPP1)
Variante finlandesa	Perfiles huella / rectilíneos, ATP sintasa subunidad c	CLN5
Variante	Perfiles huella / rectilíneos, ATP sintasa subunidad c	CLN6
Juvenil	Perfil huella, ATP sintasa subunidad c	CLN3
Adulto	Variable	Desconocido
Epilepsia del Norte	Perfil rectilíneo, ATP sintasa subunidad c	CLN8
Variante turca	Perfiles huella / rectilíneos - constituyentes desconocidos	Desconocido

Enfermedades lisosomales de transporte y metabolismo del colesterol

Niemann-Pick tipo C	Colesterol no esterificado	NPC1 o NPC2
---------------------	----------------------------	-------------

* Davidson et al., The Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Clinical Features and Molecular Basis of Disease. En Barranger JA y Cabrera-Salazar MA (Eds) Lysosomal Storage Disorders. 2007. pp. 371-388. Springer, New York, EE. UU.

- Se puede usar cualquier método conocido por el experto para monitorizar el estado de enfermedad y la eficacia de una terapia de combinación. Los monitores clínicos del estado de enfermedad pueden incluir, pero no se limitan a, volumen del órgano (por ejemplo, hígado, bazo), hemoglobina, cifra de eritrocitos, hematocrito, trombocitopenia, caquexia (debilitamiento) y niveles de quitinasa en plasma (por ejemplo, quitotriosidasa). Se conoce que la quitotriosidasa, una enzima de la familia de las quitinasas, es producida por los macrófagos en altos niveles en sujetos con enfermedades de almacenamiento lisosómico (véase Guo et al., 1995, J. Inherit. Metab. Dis. 18, 717-722; den Tandt et al., 1996, J. Inherit. Metab. Dis. 19, 344-350; Dodelson de Kremer et al., 1997, Medicina (Buenos Aires) 57, 677-684; Czartoryska et al., 2000, Clin. Biochem. 33, 147-149; Czartoryska et al., 1998, Clin. Biochem. 31, 417-420; Mistry et al., 1997, Baillieres Clin. Haematol. 10, 817-838; Young et al., 1997, J. Inherit. Metab. Dis. 20, 595-602; Hollak et al., 1994, J. Clin. Invest. 93, 1288-1292). La quitotriosidasa se mide preferentemente junto con la enzima convertidora de angiotensina y fosfatasa ácida no resistente a tartrato para monitorizar la respuesta al tratamiento de pacientes con Gaucher.
- Los métodos y formulaciones para administrar las terapias de combinación incluyen todos métodos y formulaciones bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1980 y años posteriores, 16^a ed. y ediciones posteriores, A. Oslo editor, Easton Pa.; Controlled Drug Delivery, 1987, 2^a rev., Joseph R. Robinson & Vincent H. L. Lee, eds., Marcel Dekker, ISBN: 0824775880; Encyclopedia of Controlled Drug Delivery, 1999, Edith Mathiowitz, John Wiley & Sons, ISBN: 0471148288; patente de EE. UU. N° 6.066.626 y referencias citadas en su interior; véanse, por tanto, las referencias citadas en secciones posteriores).
- Se proporcionan los siguientes enfoques generales para la terapia de combinación en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico. Cada enfoque general implica combinar la terapia de reemplazo enzimático con la terapia de moléculas pequeñas de un modo de acuerdo con la optimización del beneficio clínico mientras que se minimizan las desventajas asociadas al uso de cada terapia sola.
- En una realización, se administra terapia de reemplazo enzimático (sola o en combinación con la terapia de moléculas pequeñas) para iniciar el tratamiento (es decir, citorreducir el sujeto) y la terapia de moléculas pequeñas después de la fase citorreductora para lograr y mantener un efecto terapéutico estable a largo plazo sin la necesidad de inyecciones intravenosas frecuentes para ERT. Por ejemplo, la terapia de reemplazo enzimático se puede administrar por vía intravenosa (por ejemplo, durante un periodo de una a dos horas) una vez, semanalmente, una vez cada dos semanas, o una vez cada dos meses, durante varias semanas o meses, o más (por ejemplo, hasta que un órgano indicador implicado tal como el bazo o el hígado muestre una disminución en el tamaño). Además, la fase de ERT de tratamiento citorreductor inicial se puede realizar sola o en combinación con una terapia de moléculas pequeñas. Es particularmente preferido un componente terapéutico de moléculas pequeñas donde la molécula pequeña es compatible con la administración por vía oral, proporcionando así alivio adicional de la frecuente intervención intravenosa.

Alternar entre ERT y SMT, o complementar SMT con ERT según se necesite, proporciona una estrategia para aprovechar simultáneamente las fortalezas y trata las debilidades asociadas a cada terapia cuando se usa sola. Una ventaja de ERT, si se usa para la citorreducción y/o para cuidado a más largo plazo, es la experiencia clínica mucho más amplia disponible para informar las decisiones del médico. Además, un sujeto se puede valorar eficazmente con ERT durante la fase de citorreducción, por ejemplo, monitorizando metabolitos bioquímicos en la orina u otras muestras del cuerpo, o midiendo el volumen de órgano afectado. Una desventaja de ERT, sin embargo, es la frecuencia de la administración requerida, que normalmente implica inyección intravenosa semanalmente o cada dos semanas debido a la constante re-acumulación del sustrato. El uso de terapia de moléculas pequeñas para reducir la cantidad o inhibir la acumulación de sustrato en un paciente puede reducir a su vez la frecuencia de administración de ERT. Por ejemplo, en una pauta posológica de terapia de reemplazo enzimático cada dos semanas se puede ofrecer un "descanso de ERT" (por ejemplo, usando una SMT) de manera que las inyecciones enzimáticas frecuentes no sean terapia requerida. Además, tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico con terapia de combinación puede proporcionar enfoques terapéuticos complementarios. De hecho, una terapia de combinación de SMT y ERT puede proporcionar mejoras significativas con respecto a cualquier plataforma terapéutica sola. Los datos sugieren que la terapia de combinación usando SMT y ERT puede ser tanto aditiva como complementaria. En una realización, se puede usar ERT como una estrategia citorreductora (es decir, para iniciar el tratamiento), seguida por o complementada simultáneamente con SMT usando el compuesto de la presente invención. En otra realización, un paciente se trata primero con SMT usando el compuesto de la presente invención, seguida por o complementada simultáneamente con ERT. En otras realizaciones, se usa una SMT para inhibir o reducir la acumulación adicional de sustrato (o re-acumulación de sustrato si se usa después de la citorreducción con ERT) en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, y opcionalmente se proporciona ERT según se necesite para reducir cualquier acumulación adicional de sustrato. En una realización, un método de terapia de combinación para el tratamiento de un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico comprende alternar entre administración de una terapia de reemplazo enzimático y una terapia de moléculas pequeñas. En otra realización, un método de terapia de combinación para el tratamiento de un sujeto diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico comprende administrar simultáneamente una terapia de reemplazo enzimático y una terapia de moléculas pequeñas. En las diversas terapias de combinación, se entenderá que la administración de la terapia de moléculas pequeñas puede ocurrir antes de, simultáneamente con, o después, de la administración de la terapia de reemplazo enzimático. Similarmente, la administración de terapia de reemplazo enzimático puede ocurrir antes de, simultáneamente con, o después de, la administración de la terapia de moléculas pequeñas.

En cualquiera de las realizaciones de la invención, la enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en Gaucher (tipos 1, 2 y 3), Niemann-Pick, Farber, gangliosidosis de GM_1 , gangliosidosis de GM_2 (por ejemplo, deficiencia del activador GM_2 , Tay-Sachs y Sandhoff), Krabbe, Hurler-Scheie (MPS I), Hunter (MPS II), Sanfilippo (MPS III) Tipo A, Sanfilippo (MPS III) Tipo B, Sanfilippo (MPS III) Tipo C, Sanfilippo (MPS III) Tipo D, Morquio (MPS IV) Tipo A, Morquio (MPS IV) Tipo B, Maroteaux-Lamy (MPS VI), Sly (MPS VII), mucosulfatidosis, sialidosis, mucopolisacáridosis II, mucopolisacáridosis III, mucopolisacáridosis IV, Fabry, Schindler, Pompe, enfermedad de almacenamiento de ácido siálico, fucosidosis, mannosidosis, aspartilglucosaminuria, Wolman y lipofuscinosis ceroides neuronal.

Además, la ERT proporciona una cantidad eficaz de al menos una de las siguientes enzimas: glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, ceramidasa, gangliósido GM_1 -beta-galactosidasa, hexosaminidasa A, hexosaminidasa B, beta-galactocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, N-acetil-alfa-glucosaminidasa, acetil CoA:alfa-glucosaminidasa acetil-transferasa, N-acetil-alfa-glucosamina-6-sulfatasa, galactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B), beta-glucuronidasa, arilsulfatasa A, arilsulfatasa C, alfa-neuraminidasa, N-acetil-glucosamina-1-fosfato transferasa, alfa-galactosidasa A, alfa-N-acetilgalactosaminidasa, alfa-glucosidasa, alfa-fucosidasa, alfa-manosidasa, aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, palmitoil-proteína tioesterasa (CLN-1), PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, NPC1 o NPC2.

La SMT y/o ERT producen una disminución en al menos uno de los siguientes materiales almacenados: glucocerebrósido, esfingomielina, ceramida, gangliósido GM_1 , gangliósido GM_2 , globósido, galactosilceramida, sulfato de dermatano, sulfato de heparano, sulfato de queratano, sulfatidas, mucopolisacáridos, sialiloligosacáridos, glucoproteínas, sialiloligosacáridos, glucolípidos, globotriaosilceramida, glucopéptidos unidos a O, glucógeno, ácido siálico libre, fucoglucolípidos, fucosiloligosacáridos, mannosiloligosacáridos, aspartilglucosamina, ésteres de colesterol, triglicéridos, depósitos osmófilos granulares - Saposinas A y D, ATP sintasa subunidad c, NPC1 o NPC2.

La terapia de moléculas pequeñas puede incluir administrar a un sujeto uno o más compuestos.

La terapia de reemplazo enzimático puede provocar respuestas inmunitarias no deseadas. Por consiguiente, se pueden usar agentes inmunosupresores junto con un componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación. Dichos agentes también se pueden usar con un componente de terapia de moléculas pequeñas, pero la necesidad de intervención es aquí, en general, menos probable. Se puede emplear cualquier agente inmunosupresor conocido para el experto junto con una terapia de combinación. Dichos agentes inmunosupresores incluyen, pero no se limitan a, ciclosporina, FK506, rapamicina, CTLA4-Ig, y agentes anti-TNF tales como etanercept (véase, por ejemplo, Moder, 2000, Ann. Allergy Asthma Immunol. 84, 280-284; Nevins, 2000, Curr. Opin. Pediatr. 12, 146-150; Kurlberg et al., 2000, Scand. J. Immunol. 51, 224-230; Ideguchi et al., 2000, Neuroscience 95, 217-226; Potter et al., 1999, Ann. N.Y. Acad. Sci. 875, 159-174; Slavik et al., 1999, Immunol. Res. 19, 1-24; Gaziev et al., 1999, Bone Marrow Transplant. 25, 689-696; Henry, 1999, Clin. Transplant. 13, 209-220; Gummert et al., 1999, J. Am. Soc.

Nephrol. 10, 1366-1380; Qi et al., 2000, Transplantation 69, 1275-1283). El anticuerpo anti-receptor de IL2 (subunidad alfa) daclizumab (por ejemplo, Zenapax.TM.), que se ha demostrado eficaz en pacientes con trasplante, también se puede usar como un agente inmunosupresor (véanse, por ejemplo, Wiseman et al., 1999, Drugs 58, 1029-1042; Beniaminovitz et al., 2000, N. Engl. J. Med. 342, 613-619; Ponticelli et al., 1999, Drugs R. D. 1, 55-60; Berard et al., 1999, Pharmacotherapy 19, 1127-1137; Eckhoff et al., 2000, Transplantation 69, 1867-1872; Ekberg et al., 2000, Transpl. Int. 13, 151-159). Los agentes inmunosupresores adicionales incluyen, pero no se limitan a, anti-CD2 (Branco et al., 1999, Transplantation 68, 1588-1596; Przepiorka et al., 1998, Blood 92, 4066-4071), anti-CD4 (Marinova-Mutafchieva et al., 2000, Arthritis Rheum. 43, 638-644; Fishwild et al., 1999, Clin. Immunol. 92, 138-152) y ligando anti-CD40 (Hong et al., 2000, Semin. Nephrol. 20, 108-125; Chirmule et al., 2000, J. Virol. 74, 3345-3352; Ito et al., 2000, J. Immunol. 164, 1230-1235).

Se puede usar cualquier combinación de agentes inmunosupresores conocidos por el experto junto con una terapia de combinación. Una combinación de agente inmunosupresor de particular utilidad es tacrolimus (FK506) más sirolimus (rapamicina) más daclizumab (anticuerpo anti-receptor de IL2 - subunidad alfa). Se ha demostrado que esta combinación es eficaz como una alternativa a esteroides y ciclosporina, y cuando se dirige específicamente al hígado. Además, se ha mostrado recientemente que esta combinación permite trasplantes de células de los islotes pancreáticos satisfactorios. Véase Denise Grady, The New York Times, sábado, 27 de mayo de 2000, páginas A1 y A11. Véase también A. M. Shapiro et al., 27 de Julio de 2000, "Islet Transplantation In Seven Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Using A Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen", N. Engl. J. Med. 343, 230-238; Ryan et al., 2001, Diabetes 50, 710-719. También se puede usar plasmáferesis por cualquier método conocido en la técnica para retirar o empobrecer los anticuerpos que se pueden desarrollar contra diversos componentes de una terapia de combinación.

Los indicadores del estado inmunitario de uso incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y cualquiera de las citocinas conocidas por el experto, por ejemplo, las interleucinas, CSF e interferones (véanse, en general, Leonard et al., 2000, J. Allergy Clin. Immunol. 105, 877-888; Oberholzer et al., 2000, Crit. Care Med. 28 (4 Suppl.), N3-N12; Rubinstein et al., 1998, Cytokine Growth Factor Rev. 9, 175-181). Por ejemplo, se pueden monitorizar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con la enzima de reemplazo para determinar el estado inmunitario del sujeto. Entre las aproximadamente dos docenas de interleucinas conocidas, son indicadores del estado inmunitario particularmente preferidos IL-1 alfa, IL-2, IL-4, IL-8 e IL-10. Entre los factores estimulantes de colonias (CSF), son indicadores de estado inmunitario particularmente preferidos G-CSF, GM-CSF y M-CSF. Entre los interferones, se prefieren uno o más interferones alfa, beta o gamma como indicadores del estado inmunitario.

En las secciones a continuación se proporcionan diversos componentes que se pueden usar para ocho enfermedades de almacenamiento lisosómico específicas (es decir, Gaucher (incluyendo tipos 1, 2 y 3), Fabry, Niemann-Pick B, Hunter, Morquio, Maroteaux-Lamy, Pompe y Hurler-Scheie). En secciones posteriores, se proporciona divulgación habilitante adicional para los componentes de la terapia de reemplazo enzimático y de la terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación.

Gaucher

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de Gaucher está provocada por la deficiencia de la enzima glucocerebrosidasa (beta-D-glucosil-N-acilsefingosina glucohidrolasa, EC 3.2.1.45) y la acumulación de glucocerebrósido (glucosilceramida). Para un componente de la terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación para el tratamiento de enfermedad de Gaucher, están disponibles varias referencias que exponen pautas posológicas satisfactorias y otra información útil referente al tratamiento (véanse Morales, 1996, Gaucher's Disease: A Review, The Annals of Pharmacotherapy 30, 381-388; Rosenthal et al., 1995, Enzyme Replacement Therapy for Gaucher Disease: Skeletal Responses to Macrophage-targeted Glucocerebrosidase, Pediatrics 96, 629-637; Barton et al., 1991, Replacement Therapy for Inherited Enzyme Deficiency--Macrophage-targeted Glucocerebrosidase for Gaucher's Disease, New England Journal of Medicine 324, 1464-1470; Grabowski et al., 1995, Enzyme Therapy in Type 1 Gaucher Disease: Comparative Efficacy of Mannose-terminated Glucocerebrosidase from Natural and Recombinant Sources, Annals of Internal Medicine 122, 33-39; Pastores et al., 1993, Enzyme Therapy in Gaucher Disease Type 1: Dosage Efficacy and Adverse Effects in 33 Patients treated for 6 to 24 Months, Blood 82, 408-416); y Weinreb et al., Am. J. Med.;113(2): 112-9 (2002).

En una realización, se proporciona una pauta posológica de ERT de desde 2,5 unidades por kilogramo (U/kg) tres veces a la semana hasta 60 U/kg una vez cada dos semanas, donde la enzima se administra por infusión intravenosa durante 1-2 horas. Una unidad de glucocerebrosidasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de un micromol del sustrato sintético para-nitrofenil-p-D-glucopiranosido por minuto a 37 °C. En otra realización, se proporciona una pauta posológica de desde 1 U/kg tres veces a la semana hasta 120 U/kg una vez cada dos semanas. En otra realización más, se proporciona una pauta posológica de desde 0,25 U/kg al día o tres veces a la semana hasta 600 U/kg una vez cada dos a seis semanas.

Desde 1991, ha estado disponible alglucerasa (Ceredase®) de Genzyme Corporation. La alglucerasa es una forma de glucocerebrosidasa modificada derivada de placenta. En 1994, también se puso a disposición imiglucerasa (Cerezyme®) de Genzyme Corporation. Imiglucerasa es una forma modificada de glucocerebrosidasa derivada de la expresión de ADN recombinante en un sistema de cultivo celular de mamífero (células de ovario de hámster chino).

La imiglucerasa es una glicoproteína monomérica de 497 aminoácidos que contiene cuatro sitios de glucosilación unido a N. La imiglucerasa tiene las ventajas de un aporte teóricamente ilimitado y una probabilidad reducida de contaminantes biológicos con respecto a la aglucerasa derivada de placenta. Estas enzimas están modificadas en sus sitios de glucosilación para exponer restos de manosa, una maniobra que mejora el direccionamiento lisosómico mediante el receptor de manosa-6-fosfato. La imiglucerasa se diferencia de la glucocerebrosidasa placentaria por un aminoácido en la posición 495 donde la histidina se sustituye por arginina. Se conocen varias pautas posológicas de estos productos por ser eficaces (véase Morales, 1996, Id.; Rosenthal et al., 1995, Id.; Barton et al., 1991, Id.; Grabowski et al., 1995, Id.; Pastores et al., 1993, Id.). Por ejemplo, una pauta posológica de 60 U/kg una vez cada dos semanas es de beneficio clínico en sujetos con enfermedad de moderada a grave. Las referencias citadas anteriormente y los prospectos para estos productos deben ser consultados por el médico habitual para información adicional de la pauta posológica y administración. Véanse también las patentes de EE. UU. Nº 5.236.838 y 5.549.892 cedidas a Genzyme Corporation.

Como se mencionó anteriormente, la enfermedad de Gaucher resulta de una deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa (GC). En el fenotipo más común de enfermedad de Gaucher (tipo 1), la patología se limita a los sistemas reticuloendotelial y esquelético y no existen síntomas neuropáticos. Véase Barranger, Glucosylceramide lipidosis: Gaucher disease. En: Scriver CR BA, Sly WS, Valle D, editor. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill. pp. 3635-3668 (2001). En enfermedad de Gaucher neuropática (nGD), subdividida en enfermedad de Gaucher tipo 2 y tipo 3, la deficiencia de glucocerebrosidasa (GC) provoca que se acumulen glucosilceramida (GluCer; GL-1) y glucosilesfingosina (GluSph) en el cerebro, que conducen a alteración neurológica. La enfermedad de Gaucher tipo 2 se caracteriza por aparición temprana, progresión rápida, patología extensiva en las vísceras y el sistema nervioso central, y muerte normalmente a los 2 años de edad. La enfermedad de Gaucher tipo 3, también conocida como nGD subaguda, es un fenotipo intermedio con edad de aparición variable y diferentes grados de gravedad y velocidades de progresión. Goker-Alpan et al., *The Journal of Pediatrics* 143: 273- 276 (2003). Un avance reciente ha producido el modelo de ratón K14 Inl/Inl de enfermedad de Gaucher tipo 2 (en lo sucesivo, el "ratón K14 ratón"); este modelo de ratón sintetiza estrechamente la enfermedad humana que muestra ataxia, convulsiones, espasticidad y una mediana de esperanza de vida reducida de solo 14 días. Enquist et al., *PNAS* 104: 17483-17488 (2007).

Como en los pacientes con nGD, varios modelos de ratón de la enfermedad tienen niveles aumentados de GluCer y GluEsf en el cerebro debido a la deficiencia en la actividad de GC. Liu et al., *PNAS* 95: 2503-2508 (1998) y Nilsson, J. *Neurochem* 39: 709-718 (1982). Los ratones "K14" muestran un fenotipo neuropático que comparte muchas características patológicas con enfermedad de Gaucher tipo 2, tal como neurodegeneración, astrogliosis, proliferación de la microglía y niveles aumentados de GluCer y GluEsf en regiones cerebrales específicas. Enquist et al. (2007).

El tratamiento clínico de pacientes afectados por nGD plantea un reto para los médicos prácticos tanto debido a la gravedad de la enfermedad tipo 2 como a la incapacidad de las terapias actuales para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB). El tratamiento actual de no nGD se basa en la administración intravenosa de glucocerebrosidasa humana recombinante (Imiglucerasa; Cerezyme™) para reemplazar la enzima ausente o la administración de inhibidores de la glucosilceramida sintasa para atenuar la producción de sustrato (GL-1). Sin embargo, estos fármacos no atraviesan la barrera hematoencefálica, y así no se espera que proporcionen beneficio terapéutico para pacientes con nGD. No es probable que los actuales inhibidores de la glucosilceramida sintasa de molécula pequeña en la clínica traten los fenotipos neuropáticos de nGD. Una evaluación de (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo (en lo sucesivo, "Gz161") en el modelo de ratón K14 de enfermedad de Gaucher tipo 2 demostró que de hecho podría reducir GluCer y GluEsf cerebrales.

También redujo la neuropatología cerebral y prolongó la esperanza de vida de este modelo. Además, un enfoque combinado usando tanto reemplazo enzimático como reducción de sustrato de molécula pequeña puede representar una terapia superior para enfermedad de Gaucher tipo 2.

Fabry

Como se mencionó previamente, la enfermedad de Fabry está provocada por la deficiencia de la enzima lisosómica alfa-galactosidasa A. El defecto enzimático conduce a la deposición sistémica de glucoesfingolípidos que tienen restos alfa-galactosilo terminales, predominantemente globotriaosilceramida (GL3 o Gb3) y, a un menor grado, galabiosilceramida y glucoesfingolípidos del grupo sanguíneo B.

Están disponibles varios ensayos para monitorizar la progresión de la enfermedad y para determinar cuándo cambiar de una modalidad de tratamiento a otra. En una realización, se puede usar un ensayo para determinar la actividad específica de la alfa-galactosidasa A en una muestra de tejido. En otra realización, se puede usar un ensayo para determinar la acumulación de Gb3. En otra realización, el médico puede ensayar la deposición de sustratos de glucoesfingolípidos en líquidos corporales y en lisosomas de células vasculares endoteliales, periteliales y de músculo liso de vasos sanguíneos. Otras manifestaciones clínicas que pueden ser indicadores útiles del manejo de la enfermedad incluyen proteinuria, u otros signos de insuficiencia renal tales como glóbulos rojos o glóbulos lipídicos en la orina, y elevada tasa de sedimentación eritrocítica. También se pueden monitorizar anemia, disminución de la concentración sérica de hierro, alta concentración de beta-tromboglobulina, y elevado recuento de reticulocitos o agregación plaquetaria. De hecho, se puede usar cualquier enfoque para monitorizar la progresión de la enfermedad

que sea conocido por el experto (véase, en general, Desnick RJ et al., 1995, .alpha.-Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease, en: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, N.Y., 7ª ed., páginas 2741-2784). Un marcador sustituto preferido es el dolor para la monitorización del manejo de la enfermedad de Fabry. Otros métodos preferidos incluyen la medición de la eliminación total de la enzima y/o sustrato de un líquido corporal o espécimen de biopsia. Una pauta posológica preferida para la terapia de reemplazo enzimático en la enfermedad de Fabry es 1-10 mg/kg i.v. cada dos días. Se puede usar una pauta posológica desde 0,1 hasta 100 mg/kg i.v. a una frecuencia de desde cada dos días hasta una vez a la semana o cada dos semanas.

Niemann-Pick B

Como se mencionó previamente, la enfermedad de Niemann-Pick B está provocada por la reducida actividad de la enzima lisosómica esfingomielinasa ácida y la acumulación de lípido de membrana, principalmente esfingomielina. Una dosis eficaz de esfingomielinasa ácida de reemplazo a administrar puede variar desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a una frecuencia de desde cada dos días hasta semanalmente, una vez cada dos semanas, o una vez cada dos meses. En otras realizaciones, una dosis eficaz puede variar desde aproximadamente 0,03 mg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg; desde aproximadamente 0,03 mg/kg hasta aproximadamente 0,1 mg/kg; y/o desde aproximadamente 0,3 mg/kg hasta aproximadamente 0,6 mg/kg. En una realización particular, un paciente se administra con esfingomielinasa ácida en una pauta posológica creciente a las siguientes dosis secuenciales: 0,1 mg/kg; 0,3 mg/kg; 0,6 mg/kg; y 1,0 mg/kg, en donde cada dosis de esfingomielinasa ácida se administra al menos dos veces, y cada dosis se administra a intervalos de dos semanas, y en donde el paciente se monitoriza para efectos secundarios tóxicos antes de elevar la dosis hasta el siguiente nivel (véase la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N° 2011/0052559).

Hurler-Scheie (MPS I)

La enfermedad de Hurler, Scheie y Hurler-Scheie, también conocida como MPS I, está provocada por la inactivación de alfa-iduronidasa y la acumulación de sulfato de dermatano y sulfato de heparano. Están disponibles varios ensayos para monitorizar la progresión de la enfermedad MPS I. Por ejemplo, se puede monitorizar la actividad enzimática de alfa-iduronidasa en biopsia de especímenes de tejido o células cultivadas obtenidas de sangre periférica. Además, una medida conveniente de progresión de la enfermedad en MPS I y otras mucopolisacaridoses es la eliminación urinaria de los glucosaminoglicanos sulfato de dermatano y sulfato de heparano (véase Neufeld et al., 1995, Ídem). En una realización particular, se administra la enzima alfa-iduronidasa una vez a la semana como una infusión intravenosa a una dosis de 0,58 mg/kg de peso corporal.

Hunter (MPS II)

La enfermedad de Hunter (también conocida como MPS II) está provocada por la inactivación de iduronato sulfatasa y la acumulación de sulfato de dermatano y sulfato de heparano. La enfermedad de Hunter se presenta clínicamente en formas graves y leves. Se prefiere una pauta posológica de enzima terapéutica desde 1,5 mg/kg cada dos semanas hasta 50 mg/kg cada semana.

Morquio (MPS IV)

El síndrome de Morquio (también conocido como MPS IV) resulta de la acumulación de sulfato de queratano debido a la inactivación de cualquiera de dos enzimas. En MPS IVA, la enzima inactivada es galactosamina-6-sulfatasa y en MPS IVB la enzima inactivada es beta-galactosidasa. Se prefiere una pauta posológica de enzima terapéutica desde 1,5 mg/kg cada dos semanas hasta 50 mg/kg cada semana.

Maroteaux-Lamy (MPS VI)

El síndrome de Maroteaux-Lamy (también conocido como MPS VI) está provocado por la inactivación de alactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B) y la acumulación de sulfato de dermatano. Una pauta posológica de desde 1,5 mg/kg cada dos semanas hasta 50 mg/kg cada semana es un intervalo preferido de enzima terapéutica eficaz proporcionada por ERT. Óptimamente, la dosis empleada es inferior o igual a 10 mg/kg por semana. Un marcador sustituto preferido para la progresión de la enfermedad MPS VI es los niveles de proteoglicanos.

Pompe

La enfermedad de Pompe está provocada por la inactivación de la enzima alfa-glucosidasa ácida y la acumulación de glucógeno. El gen de la alfa-glucosidasa ácida reside en el cromosoma 17 humano y se designa GAA. H. G. Hers propuso por primera vez el concepto de enfermedad lisosómica congénita basándose en sus estudios de esta enfermedad, a la que denominó enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSD II) y que ahora también se denomina de deficiencia maltasa ácida (AMD) (véase Hers, 1965, Gastroenterology 48, 625). En una realización particular, GAA se administra cada 2 semanas como una infusión intravenosa a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal.

Están disponibles varios ensayos para monitorizar la progresión de la enfermedad de Pompe. Se puede usar cualquier ensayo conocido por el experto. Por ejemplo, se puede ensayar la acumulación intralisosómica de gránulos de

glucógeno, particularmente en miocardio, hígado y fibras musculares esqueléticas obtenidas de biopsia. También se puede monitorizar la actividad enzimática de alfa-glucosidasa en especímenes de biopsia o células cultivadas obtenidas de sangre periférica. Se puede monitorizar la elevación sérica de creatina cinasa (CK) como una indicación de la progresión de la enfermedad. La CK sérica se puede elevar hasta diez veces en pacientes de aparición en la infancia y normalmente se eleva hasta un menor grado en pacientes de aparición en la edad adulta. Véase Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid alpha-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency. En: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, N.Y., 7ª ed., páginas 2443-2464.

Terapia de reemplazo enzimático

Las siguientes secciones exponen la divulgación específica y realizaciones alternativas disponibles para el componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación.

En general, las pautas posológicas para un componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación se determinan, en general, por el profesional clínico experto. Se proporcionan anteriormente varios ejemplos de pautas posológicas para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher con glucocerebrosidasa. Los principios generales para determinar una pauta posológica para cualquier componente de ERT dado de una terapia de combinación para el tratamiento de cualquier LSD serán evidentes para el experto a partir de información públicamente disponible, tal como, por ejemplo, una revisión de las referencias específicas citadas en las secciones para cada LSD específica. Se puede administrar una ERT a un paciente por infusión intravenosa. Se pueden usar infusión intracerebroventricular y/o intratecal (por ejemplo, además de infusión intravenosa) administrando ERT a un paciente diagnosticado con una enfermedad de almacenamiento lisosómico que tiene manifestaciones del SNC.

Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de las enzimas que se van a usar en un componente de terapia de reemplazo enzimático de una terapia de combinación.

Muchos de dichos métodos se conocen e incluyen, pero no se limitan a la tecnología de activación de genes desarrollada por Shire plc (véanse las patentes de EE. UU. N° 5.968.502 y 5.272.071).

Terapia de moléculas pequeñas

La siguiente sección también expone divulgaciones específicas y realizaciones alternativas disponibles para el componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación. Las pautas posológicas para un componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación se determinan, en general, por el profesional clínico experto y se espera que varíen significativamente dependiendo de la enfermedad de almacenamiento particular que está tratándose y el estado clínico del individuo afectado particular. Se conocen bien por el experto los principios generales para determinar una pauta posológica para un componente de SMT dado de cualquier terapia de combinación para el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento. Se puede obtener orientación para pautas posológicas de cualquiera de las muchas referencias bien conocidas en la técnica sobre este tema. Está disponible orientación adicional, entre otros, de una revisión de las referencias específicas citadas en el presente documento.

En general, se pueden usar compuestos tales como, por ejemplo, (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo y (2-(4'-fluoro-[1,1'-bifenil]-3-il)propan-2-il)carbamato de quinuclidin-3-ilo en las terapias de combinación para el tratamiento de prácticamente cualquier enfermedad de almacenamiento resultante de una lesión en la vía de los glucoesfingolípidos (por ejemplo, Gaucher, Fabry, gangliosidosis de GM₁ y gangliosidosis de GM₂ (por ejemplo, deficiencia del activador GM2, Tay-Sachs y Sandhoff)). Asimismo, se pueden usar aminoglucósidos (por ejemplo, gentamicina, G418) en terapias de combinación para cualquier enfermedad de almacenamiento individual que tenga una mutación del codón de parada prematuro (es decir, mutación terminadora). Dichas mutaciones son particularmente predominantes en el síndrome de Hurler. Se prefiere particularmente un componente de terapia de moléculas pequeñas de una terapia de combinación donde existe una manifestación del sistema nervioso central a la enfermedad de almacenamiento que está tratándose (por ejemplo, Sandhoff, Tay-Sachs, Niemann-Pick Tipo A, y Gaucher tipos 2 y 3), puesto que las moléculas pequeñas pueden, en general, atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad cuando se compara con otras terapias.

Las dosis preferidas de inhibidores de sustrato usadas en una terapia de combinación se determinan fácilmente por el experto. En ciertas realizaciones, dichas dosis pueden variar desde aproximadamente 0,5 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg, preferentemente desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg (por ejemplo, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 55 mg/kg y 60 mg/kg) por administración intraperitoneal, oral o equivalente desde una hasta cinco veces al día. Dichas dosis pueden variar desde aproximadamente 5 mg/kg hasta aproximadamente 5 g/kg, preferentemente desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg por administración oral, intraperitoneal o equivalente de una a cinco veces al día. En una realización, las dosis varían desde aproximadamente aproximadamente 10 mg/día hasta aproximadamente 500 mg/día (por ejemplo, 10 mg/día, 20 mg/día, 30 mg/día, 40 mg/día, 50 mg/día, 60 mg/día, 70 mg/día, 80 mg/día, 90 mg/día, 100 mg/día, 110 mg/día, 120 mg/día, 130 mg/día, 140 mg/día, 150 mg/día, 160 mg/día, 170 mg/día, 180 mg/día, 190 mg/día, 200 mg/día, 210 mg/día, 220 mg/día, 230 mg/día, 240 mg/día, 250 mg/día, 260 mg/día, 270 mg/día, 280 mg/día, 290 mg/día, 300 mg/día). Un intervalo de dosis oral particularmente

preferido es desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 100 mg, en donde la dosis se administra dos veces al día. Un intervalo de dosis oral particular para el compuesto de la presente invención es desde aproximadamente 5 mg/kg/día hasta aproximadamente 600 mg/kg/día. Un intervalo de dosis oral particular para el compuesto de la presente invención es desde aproximadamente 1 mg/kg/día hasta aproximadamente 100 mg/kg/día, por ejemplo, 1 mg/kg/día, 5 mg/kg/día, 10 mg/kg/día, 15 mg/kg/día, 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 35 mg/kg/día, 40 mg/kg/día, 45 mg/kg/día, 50 mg/kg/día, 55 mg/kg/día o 60 mg/kg/día, 65 mg/kg/día, 70 mg/kg/día, 75 mg/kg/día, 80 mg/kg/día, 85 mg/kg/día, 90 mg/kg/día, 95 mg/kg/día o 100 mg/kg/día.

Se prefiere una combinación en rotación de plataformas terapéuticas (es decir, terapia de reemplazo enzimático y de moléculas pequeñas). Sin embargo, los sujetos también se pueden tratar por solapamiento de ambos enfoques según se necesite, como se ha determinado por el profesional clínico experto. Los ejemplos de programas de tratamiento pueden incluir, pero no se limitan a: (1) SMT seguido por ERT; (2) ERT seguido por SMT; y (3) ERT y SMT proporcionados a aproximadamente la misma vez. Como se mencionó previamente, también se puede realizar el solapamiento temporal de plataformas terapéuticas, según se necesite, dependiendo de la evolución clínica de una enfermedad de almacenamiento dada en un sujeto dado.

Los intervalos de tratamiento para diversas terapias de combinación pueden variar ampliamente y pueden ser, en general, diferentes entre diferentes enfermedades de almacenamiento y diferentes individuos dependiendo de cómo de agresivamente se acumulen los productos de almacenamiento. Por ejemplo, la acumulación de productos de almacenamiento de Fabry puede ser lenta en comparación con la rápida acumulación de productos de rápido almacenamiento en Pompe. La valoración de una enfermedad de almacenamiento particular en un individuo particular se lleva a cabo por el experto monitorizando los signos clínicos de progresión de la enfermedad y el éxito del tratamiento.

Las diversas macromoléculas que se acumulan en enfermedades de almacenamiento lisosómico no se distribuyen uniformemente, sino que en su lugar se depositan en ciertos sitios anatómicos preferidos para cada enfermedad. Sin embargo, una enzima exógenamente suministrada es, en general, absorbida por células del sistema reticuloendotelial y se clasifican en el compartimento lisosómico donde actúa para hidrolizar el sustrato acumulado. Además, la absorción celular de enzima terapéutica puede ser aumentada por ciertas maniobras para aumentar el direccionamiento lisosómico (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 5.549.892 por Friedman et al., cedida a Genzyme Corporation, que describe glucocerebrosidasa recombinante que tiene farmacocinética mejorada en virtud de cadenas laterales remodeladas de oligosacáridos reconocidas por receptores de manosa de la superficie celular que son endocitadas y transportadas a los lisosomas).

Algunas modalidades de tratamiento se dirigen a algunos órganos afectados mejor que otras. En Fabry, por ejemplo, si ERT no llega al riñón suficientemente bien para un desenlace clínico satisfactorio, se puede usar SMT para reducir los niveles de sustrato en el riñón.

La SMT puede reducir eficazmente los niveles de Gb3 (es decir, el sustrato acumulado en pacientes con Fabry) en la orina de un modelo de ratón con Fabry a un mayor grado que la ERT. Se cree que los riñones son la principal fuente de Gb3 en la orina.

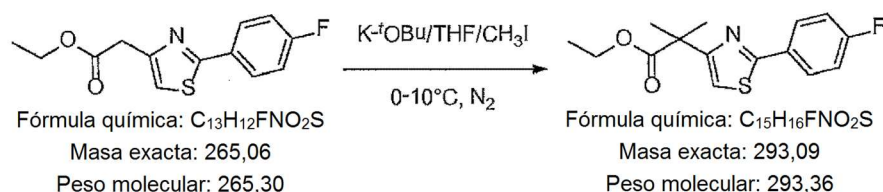
La ERT puede reducir eficazmente los niveles de Gb3 en el plasma hasta un mayor grado que SMT. Una terapia de combinación de ERT y SMT puede proporcionar una estrategia terapéutica complementaria que se aprovecha de las fortalezas y trata las debilidades asociadas a cada terapia empleada sola. SMT es capaz de atravesar la BBB, proporcionando un poderoso enfoque, cuando se combina con ERT, para tratar LSDs que tienen manifestaciones del CNS, tales como Niemann Pick Tipo A y enfermedad de Gaucher neuropática (nGD). Además, la reducción de sustrato por SMT combinada con el reemplazo enzimático tratan el problema del almacenamiento en puntos de intervención separados y distintos que pueden potenciar el desenlace clínico.

Se entenderá que la referencia a administración simultánea o concurrente de dos o más terapias no requiere que se administren al mismo tiempo, solo que están actuando en el sujeto al mismo tiempo.

Ejemplo 1

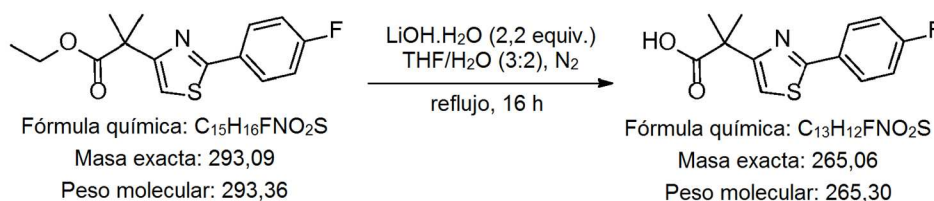
(2-(2-(4-Fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

Etapas 1: Dimetilación con yoduro de metilo



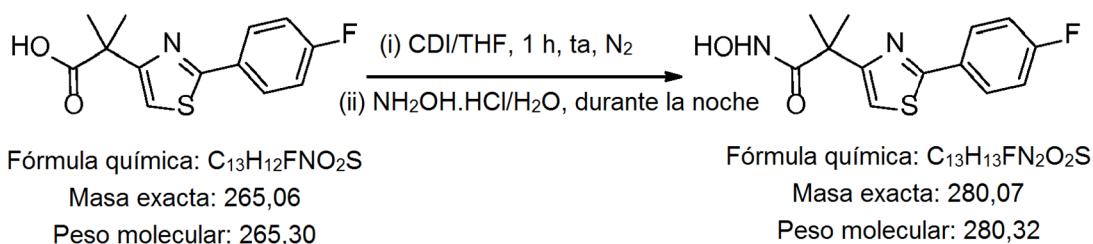
Procedimiento: Se equipó un matraz redondo de 3 bocas con un termómetro, un embudo de adición y una entrada de nitrógeno. El matraz se lavó con nitrógeno y se pesó terc-butoxido de potasio (MW 112,21, 75,4 mmoles, 8,46 g, 4,0 equiv., polvo blanco) y se añadió al matraz mediante un embudo de polvo, seguido por la adición de THF (60 mL). Se disolvió la mayoría del terc-butoxido de potasio dando una disolución turbia. Esta mezcla se enfrió en un baño de agua con hielo hasta 0-2 °C (temperatura interna). En un matraz separado, se disolvió el éster de partida (MW 265,3, 18,85 mmoles, 5,0 g, 1,0 equiv.) en THF (18 mL + 2 mL como aclarado) y se transfirió al embudo de adición. Esta disolución se añadió gota a gota a la mezcla enfriada durante un periodo de 25-30 min, manteniéndose la temperatura interna por debajo de 5 °C durante la adición. Se enfrió la mezcla de reacción de nuevo hasta 0-2 °C. En un matraz separado, se preparó una disolución de yoduro de metilo (MW 141,94, 47,13 mmoles, 6,7 g, 2,5 equiv.) en THF (6 mL) y se transfirió al embudo de adición. Entonces se aclaró con THF (1,5 mL) el matraz que contenía la disolución de yoduro de metilo, que luego se transfirió al embudo de adición que ya contenía la disolución incolora clara de yoduro de metilo en THF. Esta disolución se añadió cuidadosamente gota a gota a la mezcla de reacción marrón oscura durante un periodo de 30-40 min, manteniéndose la temperatura interna por debajo de 10 °C en todo momento durante la adición. Después de completarse la adición, se agitó la mezcla ligeramente turbia durante 1 h adicional, tiempo durante el cual la temperatura interna disminuyó hasta 0-5 °C. Después de agitar durante una hora a 0-5 °C, la mezcla de reacción se inactivó con la adición lenta gota a gota de HCl acuoso 5,0 M (8 mL) durante un periodo de 5-7 min. La temperatura interna se debe mantener por debajo de 20 °C durante esta adición. Después de la adición, se añadió agua (14 mL) y la mezcla se agitó durante 2-3 min. Se detuvo la agitación y se dejó que se separaran las 2 capas. Entonces se transfieren las 2 capas a un matraz redondo de 250 mL de 1 boca y el THF se evaporó a vacío en la medida de lo posible para obtener una capa bifásica de THF/producto y agua. Se deja que se separen 2 capas. En la siguiente reacción se usó una disolución de THF del producto de la etapa 1.

Etapas 2: Hidrólisis del éster etílico con monohidrato de LiOH



Procedimiento: Se añadió el éster en bruto en THF al matraz de reacción. Por separado, se pesó LiOH.H₂O (MW 41,96, 75,0 mmoles, 3,15 gramos, 2,2 equiv.) en un vaso de precipitados de 100 mL al que se añadió una barra de agitación. Se añadió agua (40 mL) y la mezcla se agitó hasta que todo el sólido se disolvió, dando una disolución incolora clara. Entonces se añadió la disolución acuosa al matraz redondo de 250 mL que contenía la disolución del éster en tetrahidrofurano (THF). Se conectó un condensador a la boca del matraz y se conectó una entrada de nitrógeno en la parte superior del condensador. La mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. Después de 16 horas, se detuvo el calentamiento y la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente. Se evaporó a vacío el THF obteniéndose una disolución marrón. Se analizó por HPLC y EM/CL una alícuota de la disolución acuosa marrón para la hidrólisis completa del éster etílico. Se añadió agua (15 mL) y esta disolución básica acuosa se extrajo con TBME (2 x 40 mL) para retirar el éster t-butílico. Se enfrió la capa básica acuosa en un baño de agua con hielo hasta 0-10 °C y se acidificó con la adición gota a gota de HCl concentrado hasta pH ~ 1 con agitación. A este sólido gomoso en la disolución ácida acuosa se añadió TBME (60 mL) y se agitó la mezcla y luego se agitó vigorosamente para disolver todo el ácido en la capa de TBME. Las 2 capas se transfirieron a un embudo de decantación y se separó la capa de TBME. Se reextrajo con TBME (40 mL) la disolución ácida acuosa de color amarillo pálido y se separó la capa de TBME y se combinó con la capa de TBME previa. Se desechó la capa ácida acuosa. Se secaron las capas de TBME combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío para retirar el TBME y obtener el ácido en bruto como aceite naranja/amarillo oscuro que solidificó a alto vacío dando un sólido de color amarillo sucio. Se pesó el ácido en bruto y cristalizó calentándolo en heptano/TBME (3:1, 5 mL/g de producto en bruto) dando el ácido como un sólido amarillo.

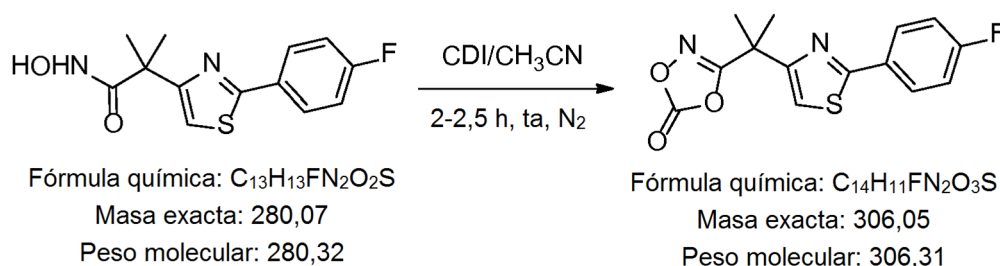
Etapas 3: Formación de ácido hidroxámico con NH₂OH.HCl



Procedimiento: Se pesó el ácido carboxílico (MW 265,3, 18,85 mmoles, 5,0 g, 1,0 equiv.) y se transfirió a un matraz redondo de 1 boca de 25 mL bajo nitrógeno. Se añadió THF (5,0 mL) y se disolvió fácilmente el ácido dando una disolución clara de color amarillo oscuro a marrón. La disolución se enfrió hasta 0-2 °C (temperatura del baño) en un baño de hielo y se añadió lentamente N,N'-carbonildiimidazol (CDI; MW 162,15, 20,74 mmoles, 3,36 g, 1,1 equiv.) en

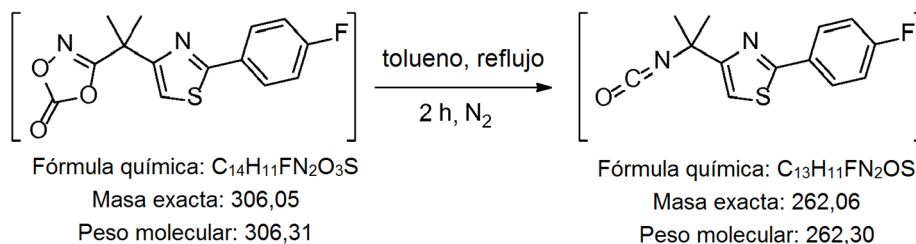
porciones pequeñas durante un periodo de 10-15 min. Se retiró el baño de hielo y la disolución se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después de 1 h de agitación, la disolución se enfrió nuevamente en un baño de agua con hielo hasta 0-2 °C (temperatura del baño). Se añadió lentamente clorhidrato de hidroxilamina (NH₂OH.HCl; MW 69,49, 37,7 mmoles, 2,62 g, 2,0 equiv.) en porciones pequeñas como un sólido durante un periodo de 3-5 min ya que esta adición era exotérmica. Después de completarse la adición, se añadió agua (1,0 mL) a la mezcla heterogénea gota a gota durante un periodo de 2 min y la mezcla de reacción se agitó a 0-10 °C en el baño de agua con hielo durante 5 min. Se retiró el baño de refrigeración y la mezcla de reacción se agitó bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche durante 20-22 h. La disolución se volvió clara a medida que se disolvió todo el NH₂OH.HCl. Después de 20-22 h, se analizó una alícuota de la mezcla de reacción por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Entonces se evaporó a vacío el THF y el residuo se recogió en diclorometano (120 mL) y agua (60 mL). La mezcla se transfirió a un embudo de decantación donde se agitó y se dejó que se separaran las 2 capas. Se desechó la capa acuosa y se lavó la capa de diclorometano con clorhidrato 1 N (HCl; 60 mL). Se desechó la capa de ácido. Se secó la capa de diclorometano sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío obteniéndose el ácido hidroxámico en bruto como un sólido amarillo pálido que se secó a alto vacío durante la noche.

Etapa 3 continuación: Conversión de ácido hidroxámico en producto intermedio cíclico (no se aisló)

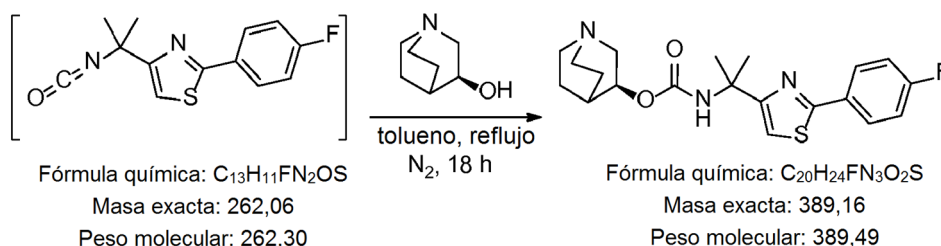


Procedimiento: Se transfirió el ácido hidroxámico en bruto (MW 280,32, 5,1 g) a un matraz redondo de 250 mL de 1 boca con una entrada de nitrógeno. Se añadió una barra de agitación, seguido por la adición de acetonitrilo (50 mL). El sólido fue insoluble en acetonitrilo. Se agitó la mezcla heterogénea amarilla durante 2-3 min bajo nitrógeno y se añadió CDI (MW 162,15, 20,74 mmoles, 3,36 g, 1,1 equiv.) en una única porción a temperatura ambiente. No se observó exotermia. Se agitó el sólido inmediatamente y se agitó la disolución amarilla clara a temperatura ambiente durante 2-2,5 h. Después de 2-2,5 h, se analizó una alícuota por HPLC y EM/CL que mostró la conversión del ácido hidroxámico en el producto intermedio cíclico deseado.

Entonces se evaporó a vacío el acetonitrilo dando el producto intermedio cíclico en bruto como un aceite denso rojizo. El aceite se recogió en tolueno (60 mL) y la mezcla rojiza se calentó hasta reflujo durante 2 horas, tiempo durante el cual el producto intermedio cíclico liberó el CO₂ y se reorganizó dando el isocianato (véase a continuación).



Etapa 3 continuación: Conversión del isocianato en la base libre



Se enfrió la mezcla de reacción hasta 50-60 °C y se añadió (S)-(+)-quinuclidinol (MW 127,18, 28,28 mmoles, 3,6 g, 1,5 equiv.) a la mezcla como un sólido en una única porción. La mezcla se recalentó a reflujo durante 18 h. Después de 18 h, se analizó por HPLC y EM/CL una alícuota que mostró conversión completa del isocianato en el producto deseado. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación y se añadió tolueno (25 mL). Se lavó la mezcla con agua (2 x 40 mL) y se separaron las capas acuosas. Se reextrajeron las capas acuosas combinadas con tolueno (30 mL) y se desechó la capa acuosa. Se extrajeron las capas de tolueno combinadas con HCl 1 N (2 x 60 mL)

y se desechó la capa de tolueno (que contenía la impureza de O-acilo). Se transfirieron las capas de HCl combinadas a un matraz Erlenmeyer de 500 mL equipado con una barra de agitación. Esta disolución de color amarillo/naranja rojizo con agitación se basificó hasta pH 10-12 por la adición gota a gota de 50 % p/p de NaOH acuoso. La base libre deseada precipita en la disolución como un sólido gomoso de color amarillo que podría atrapar la barra de agitación.

A esta mezcla se añadió acetato de isopropilo (100 mL) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 5 min cuando el sólido gomoso pasó a acetato de isopropilo. Se detuvo la agitación y se dejó que se separaran las 2 capas. Se separó la capa de acetato de isopropilo de color amarillo y se reextrajo la capa acuosa básica con acetato de isopropilo (30 mL). Se desechó la capa acuosa básica y se secaron las capas de acetato de isopropilo combinadas sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron en un matraz redondo previamente pesado y el disolvente se evaporó a vacío obteniéndose la base libre en bruto como un sólido de color beige a tostado que se secó a alto vacío durante la noche.

Etapas 3 continuación: Recristalización de la base libre en bruto

Se pesó la base libre en bruto de color beige a tostado y se recristalizó en heptano/acetato de isopropilo (3 : 1, 9,0 mL de disolvente/g de base libre en bruto). Se añadió la cantidad apropiada de heptano/acetato de isopropilo a la base libre en bruto junto con una barra de agitación y la mezcla (la base libre era inicialmente parcialmente soluble, pero se disolvió dando una disolución clara de color naranja rojizo cuando se calentó a reflujo) se calentó a reflujo durante 10 min. Se retiró la fuente de calor y se dejó que la mezcla se enfriara hasta temperatura ambiente con agitación cuando se formó un precipitado blanco. Después de agitar a temperatura ambiente durante 3-4 h, el precipitado se separó por filtración bajo vacío de tubo usando un embudo Buchner, se lavó con heptano (20 mL) y se secó bajo vacío de tubo en el embudo Buchner durante la noche. Se transfirió el precipitado a una placa de cristalización y se secó a 55 °C durante la noche en una estufa de vacío. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,04 - 7,83 (m, 2H), 7,20 - 6,99 (m, 3H), 5,53 (s, 1H), 4,73 - 4,55 (m, 1H), 3,18 (dd, J= 14,5, 8,4 Hz, 1H), 3,05 - 2,19 (m, 5H), 2,0 - 1,76 (m, 11H). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 166,38, 165,02, 162,54, 162,8-155,0 (d, C-F), 130,06, 128,43, 128,34, 116,01, 115,79, 112,46, 71,18, 55,70, 54,13, 47,42, 46,52, 27,94, 25,41, 24,67, 19,58.

Ejemplo 2

Forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo

Se disolvió la base libre de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (20 g) en IPA (140 mL) a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se añadió a un matraz redondo de 1 L que se equipó con un agitador superior y entrada/salida de nitrógeno. Se disolvió ácido L-málico (6,89 g) en IPA (100 + 30 mL) a temperatura ambiente y se filtró. El filtrado se añadió al matraz de 1 L anterior. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente (con o sin siembra) bajo nitrógeno durante 4 - 24 horas. Durante este periodo de tiempo se formó un cristal. El producto se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de IPA (30 mL). El sólido se secó en una estufa de vacío a 55 °C durante 72 horas (23 g, rendimiento:).

RMN ¹H CDCl₃

δ (ppm)	escisión	Integral	asignación
7,9	m	2	Ha
7,1	m	3	Hb, Hc
5,9	s a	1	NH
4,9	m	1	Hd
4,2	m	1	Ha'
3,1-3,6	m	6	He
2,7	m	2	Hb'
1,6-2,4	m	11	Hf, (CH ₃) ₂

Ejemplo 3

Sal de HCl de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo

Se agitó (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (0,78 g, 2 mmoles) en IPA (8 mL) a temperatura ambiente y se añadió HCl (2 M en IPA, 1 mL). Se sembró la disolución y se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. El producto se recogió por filtración y se secó a vacío dando el producto (0,7 g). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 12 (s a, 1H), 7,9 - 8,0 (m, 2H), 7,1 - 7,2 (m, 3H), 5,9 (s a, 1H), 4,9 - 5,0 (m, 1H), 3,2 - 3,6 (m, 6H), 1,7 - 2,4 (m, 11H).

Ejemplo 3**Sal de (S)-2-hidroxisuccinato de (2-(2-(4-fluorofenil)thiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo**

5 Se disolvió ácido succínico (0,15 g) en IPA (5 mL) y se agitó a 50 °C. Se añadió (2-(2-(4-fluorofenil)thiazol-4-il)propan-2-il)carbamato de (S)-quinuclidin-3-ilo (0,5 g) en IPA (8 mL). Se sembró la disolución y se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. El producto se recogió por filtración y se secó a vacío dando el producto (0,4 g). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 7,9 (m, 2H), 7,1 - 7,2 (m, 3H), 5,8 (s a, 1H), 4,9 (m, 1H), 3,1 - 3,5 (m, 6H), 2,6 (s, 4H), 1,7 - 2,4 (m, 11H).

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene el siguiente pico 2-theta medido usando radiación de CuK α :
 5 18,095.
2. La forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo de la reivindicación 1, en donde dicha difracción de rayos X de polvo contiene los siguientes picos 2-theta medidos usando radiación de CuK α :
 18,095 y 17,493;
 10 18,095 y 19,516;
 18,095, 17,493 y 19,516;
 18,095, 17,493, 19,516 y 20,088; o
 18,095, 17,493, 19,516, 20,088 y 17,125.
3. La forma cristalina A de (2-(2-(4-fluorofenil)tiazol-4-il)propan-2-il)carbamato-malato de (S)-quinuclidin-3-ilo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada por el difractograma de la FIG. 1.
4. La forma cristalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en terapia.
5. La forma cristalina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, tanto sola como en una terapia de combinación con una terapia de reemplazo enzimático.
6. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Gaucher, Fabry, gangliosidosis de G_{M1}, deficiencia del activador GM2, Tay-Sachs o Sandhoff.
7. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 6, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Gaucher.
8. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 6, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Fabry.
9. La forma cristalina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicha forma cristalina es para administración en una dosis de desde 0,5 mg/kg hasta 300 mg/kg.
10. La forma cristalina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicha forma cristalina es para administración por vía oral en una dosis de dos veces al día de desde 50 mg hasta 100 mg.
11. La forma cristalina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde dicha forma cristalina es para su uso en combinación con una enzima seleccionada de glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, ceramidasa, gangliósido G_{M1}-beta-galactosidasa, hexosaminidasa A, hexosaminidasa B, beta-galactocerebrosidasa, alfa-L-iduronidasa, iduronato sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, N-acetil-alfa-glucosaminidasa, acetil CoA:alfa-glucosaminida acetil-transferasa, N-acetil-alfa-glucosamina-6-sulfatasa, galactosamina-6-sulfatasa, beta-galactosidasa, galactosamina-4-sulfatasa (arilsulfatasa B), beta-glucuronidasa, arilsulfatasa A, arilsulfatasa C, alfa-neuraminidasa, N-acetil-glucosamina-1-fosfato transferasa, alfa-galactosidasa A, alfa-N-acetilgalactosaminidasa, alfa-glucosidasa, alfa-fucosidasa, alfa-mannosidasa, aspartilglucosamina amidasa, lipasa ácida, palmitoil-proteína tioesterasa (CLN-1), PPT1, TPP1, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, NPC1 y NPC2.
12. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Gaucher tipo 2 o tipo 3, y en donde la forma cristalina es para su uso en combinación con glucocerebrosidasa.
13. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 12, en donde la glucocerebrosidasa es para administración en una pauta posológica de desde 1 U/kg tres veces a la semana hasta 120 U/kg una vez cada dos semanas.
14. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad de almacenamiento lisosómico es Fabry, y en donde la forma cristalina es para su uso en combinación con alfa-galactosidasa A.
15. La forma cristalina para su uso según la reivindicación 14, en donde la alfa-galactosidasa A es para administración en una pauta posológica de desde 0,1 hasta 100 mg/kg i.v. a una frecuencia de desde cada dos días hasta una vez a la semana o cada dos semanas.

16. La forma cristalina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, en donde dicha forma cristalina es para administración antes de, simultáneamente con, o después de, dicha terapia de reemplazo enzimático.

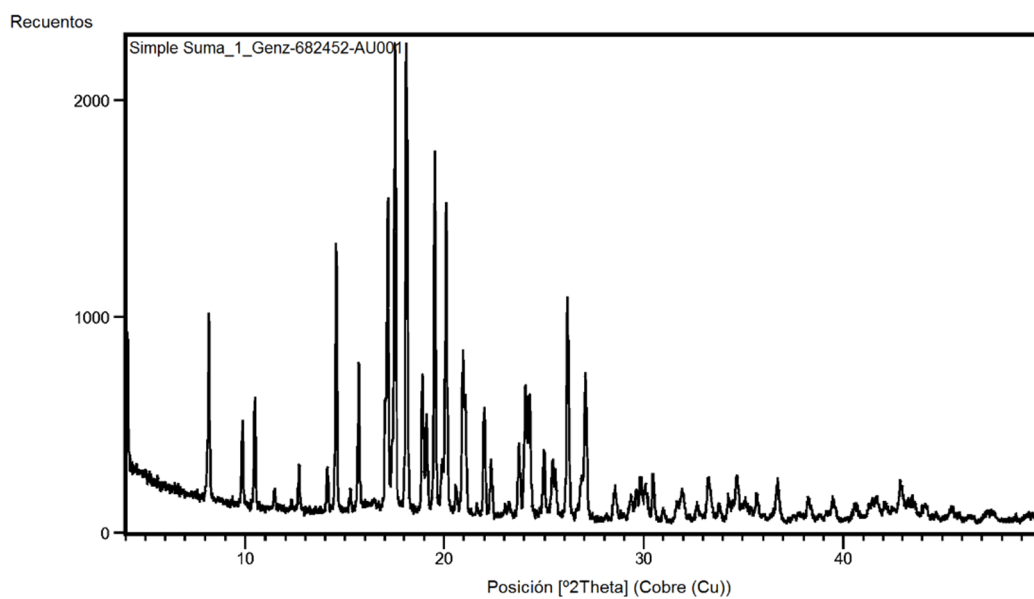


Figura 1 de 4

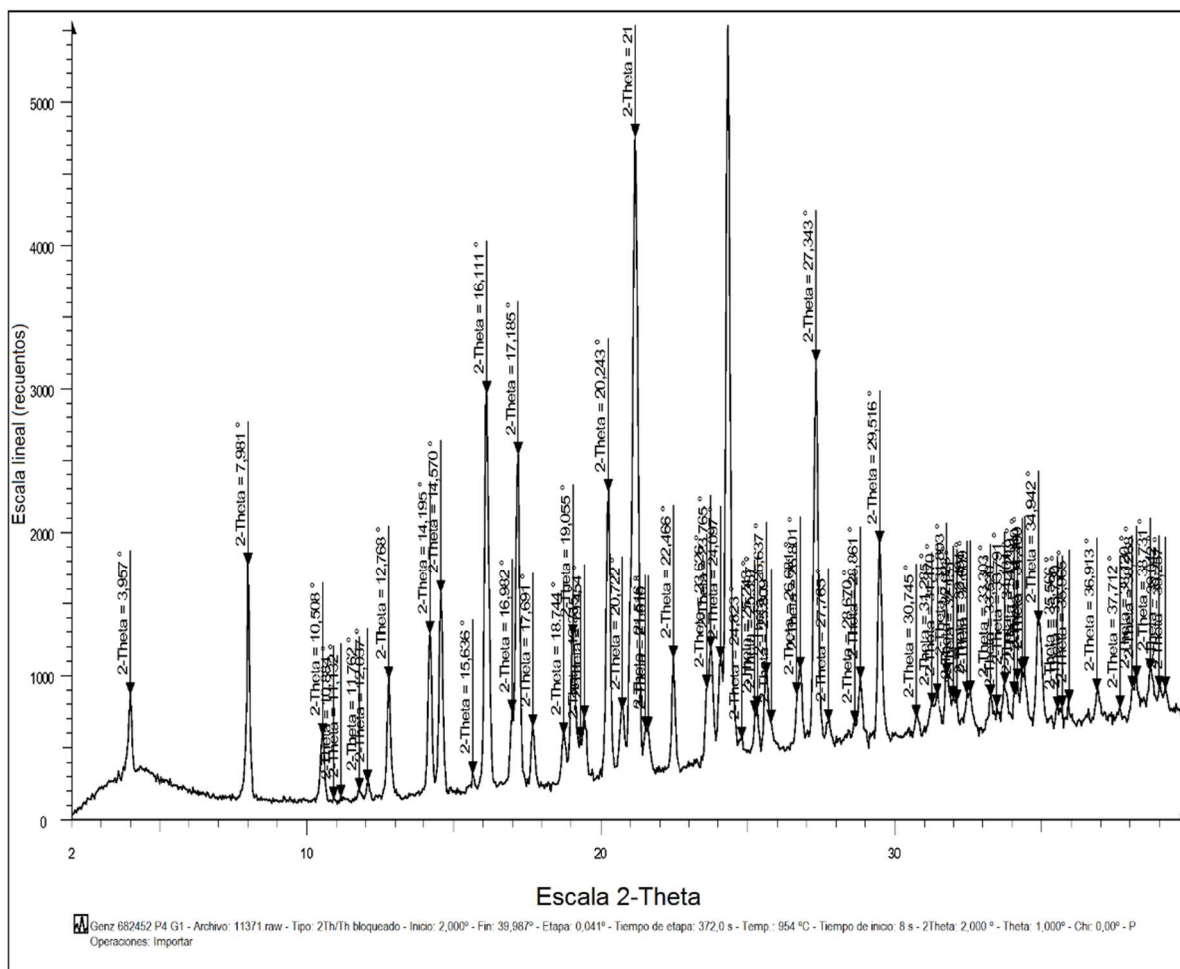


Figura 2 de 4

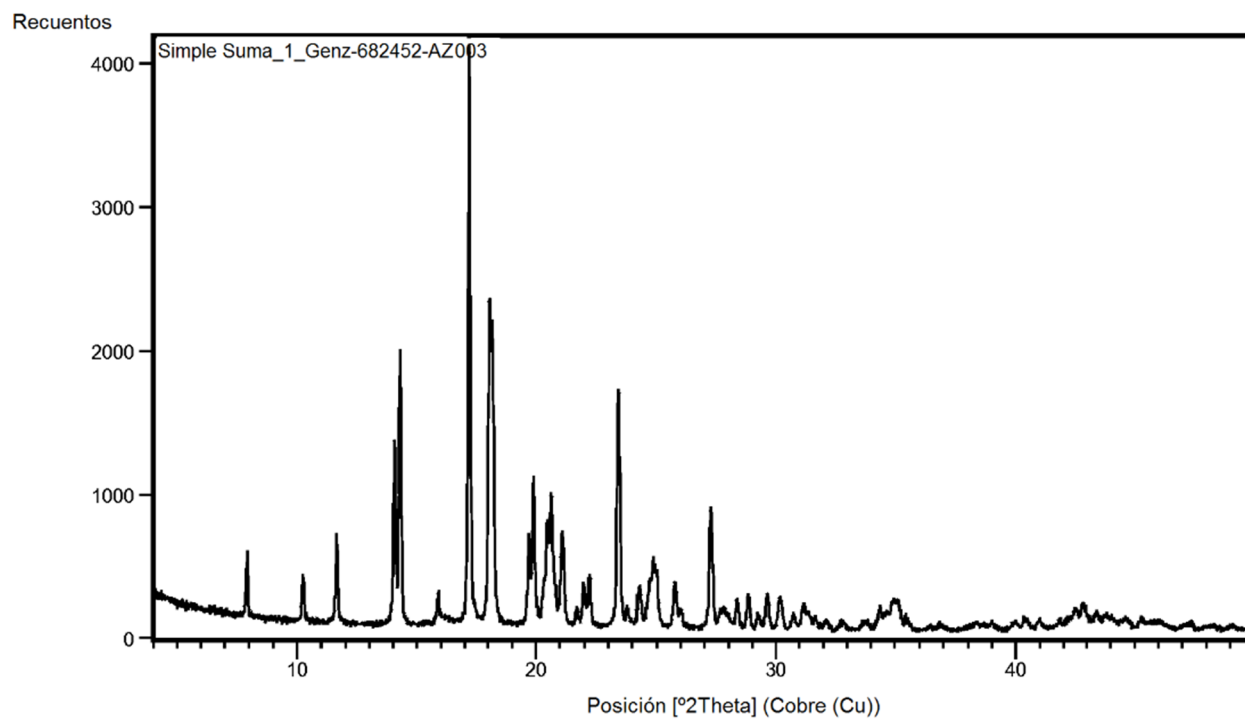


Figura 3 de 4

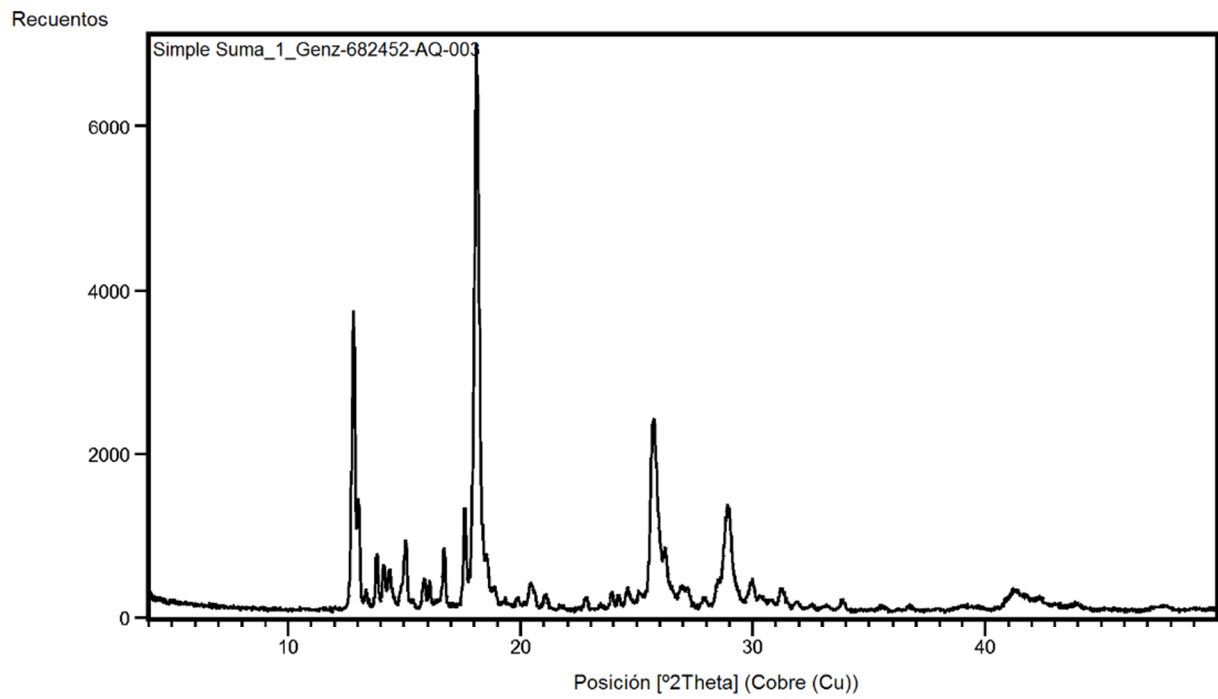


Figura 4 de 4