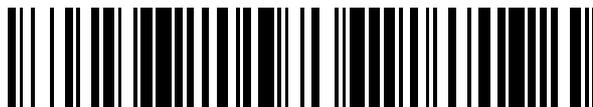


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 597 728**

21 Número de solicitud: 201530475

51 Int. Cl.:

**A61K 31/122** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.04.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**20.01.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070244**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (33.3%)**

**Avda. María Luisa, s/n - Pabellón de Perú  
41013 Sevilla ES;**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (33.3%) y  
UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA FERNÁNDEZ, José Manuel;  
ORTIZ MELLET, Carmen;  
SÁNCHEZ ALCÁZAR, José Antonio y  
DE LA MATA FERNÁNDEZ, Mario**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A  
TRASTORNOS LISOSOMALES**

57 Resumen:

Composición para el tratamiento de enfermedades asociadas a trastornos lisosomales.

Composición farmacéutica que comprende una chaperona farmacológica (CF) y Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ) y su uso para el tratamiento de una enfermedad causada por mutaciones en el gen GBA1, particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

**ES 2 597 728 A1**

**Composición para el tratamiento de enfermedades asociadas a trastornos  
lisosomales**

**DESCRIPCIÓN**

5

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una chaperona farmacológica (CF) y coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ). Asimismo, la presente invención se refiere al procedimiento de preparación de dicha composición y a su uso para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosomal asociada a la mutación de la  $\beta$ -glucocerebrosidasa ácida lisosómica (gen GBA1), particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, y más particularmente para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher con fenotipo neuronopático (enfermedad de Gaucher tipo II o tipo III).

10

15

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Los trastornos de almacenamiento lisosomal describen un heterogéneo grupo de enfermedades raras hereditarias con pérdida de función de enzimas lisosomales. Como resultado se genera un metabolismo anormal de varios sustratos que no se degradan y se acumulan progresivamente en los lisosomas, afectando a su función y a la de otros orgánulos como la mitocondria, desequilibrio autofágico e inflamación, y que deriva en fenotipos que incluyen visceromegalia, patologías neurológicas, lesiones esqueléticas y muerte prematura.

20

25

En la actualidad algunas de estas patologías solo disponen de terapias sintomáticas que siguen dos estrategias terapéuticas: terapia de reducción de sustrato (TRS), que inhibe las enzimas implicadas en la producción del sustrato que se acumula, y terapia de reemplazo enzimático (TER), que administra de forma exógena la enzima recombinante activa que se encuentra defectuosa.

30

La enfermedad de Gaucher es el trastorno de almacenamiento lisosomal más predominante. Está causado por mutaciones en el gen GBA1 que resultan en una enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa defectuosa o de insuficiente actividad. Muchas de estas mutaciones conducen a defectos significativos en el plegamiento de la proteína durante la traducción en el retículo endoplasmático (RE), dando como resultado una reducción del transporte de la enzima al lisosoma (degradación mediada por la

35

maquinaria celular de control de calidad). La disminución de su actividad catalítica provoca la acumulación de glucosilceramida y glucosil-esfingolípidos en los lisosomas de macrófagos y órganos viscerales. La enfermedad de Gaucher se subdivide en 3 tipos basados en la edad que comienza a manifestarse la enfermedad y la afectación del sistema nervioso central (SNC). Los pacientes de Gaucher sin manifestaciones del SNC son clasificados como tipo I, más común; mientras que aquellos pacientes con manifestaciones neurológicas se clasifican en los tipos II y III (Grabowski, G.A., *Gaucher disease: gene frequencies and genotype/phenotype correlations*. Genet Test, 1997. 1(1): p. 5-12)

10

Para el trastorno lisosómico de la enfermedad de Gaucher, la TER supone un alto coste económico y no es muy eficaz para los casos que muestran implicación del sistema nervioso central ya que las enzimas recombinantes no atraviesan la barrera hematoencefálica. De este modo, existe un gran número de pacientes para los cuales no existe tratamiento o la efectividad del mismo es muy baja.

15

Los fármacos de aplicación TRS tienen mayor potencial para penetrar hasta el SNC y producir beneficios a nivel neuronal. Es el caso de N-butyl-1-deoxynojirimycin (NB-DNJ, Miglustat, Zavesca®), que actúa como un inhibidor débil de la glucosilceramida sintasa, reduciendo la biosíntesis de glucosilceramida. Miglustat ha sido aprobado únicamente para el uso en pacientes Gaucher tipo I, de gravedad leve a moderada, pero no para el caso de pacientes de los tipos II y III. Además, muchos pacientes tratados con Miglustat han experimentado efectos secundarios que incluyen diarrea, pérdida de peso y temblores.

25

Algunos inhibidores de las enzimas glicosidasas implicadas en enfermedades de almacenamiento lisosomal son capaces de unirse al sitio activo y estabilizar el plegamiento apropiado, pudiendo actuar como “chaperonas farmacológicas” (CF) que facilitan el transporte de la forma catalíticamente activa a los lisosomas. De este modo, el desarrollo de compuestos con actividad de chaperona farmacológica se ha postulado como una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosomal, de particular interés para aquellas manifestaciones clínicas de la enfermedad que involucran al sistema nervioso central. Para ello, es imprescindible que se alcancen incrementos en la actividad de la enzima mutada, en el origen de la enfermedad, suficientemente elevados, que difícilmente pueden lograrse con el uso de chaperonas farmacológicas en monoterapia.

35

Una de las mutaciones más prevalentes en la enfermedad de Gaucher es la variante L444P, que resulta en un incorrecto plegamiento en el RE y fallos en su transporte al lisosoma. Pacientes en homocigosis para la mutación L444P presentan formas neurológicas severas de la enfermedad. La mutación es un cambio de base 1448T>C en el gen GBA1 que da lugar a la sustitución del aminoácido lisina por prolina en la posición 444 en la cadena polipeptídica, localizada en uno de los dominios no catalíticos de la enzima glucocerebrosidasa (GBA). Esta mutación es especialmente refractaria a los tratamientos disponibles, incluida la TCF, por lo que existe la necesidad urgente de desarrollar estrategias terapéuticas que sean útiles, en particular, en enfermos con este genotipo. Recientemente, se ha descrito que los iminoazúcares sp2 bicíclicos derivados de L-idonojirimicina se comportan como CFs en fibroblastos humanos de Gaucher homocigotos para la mutación L444P, aumentando la actividad glucocerebrosidasa y el tráfico de la enzima a los lisosomas. Uno de los candidatos más prometedores dentro de esta familia de CFs es la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (NAdBT-AIJ) (Alfonso, P., et al., *Bicyclic derivatives of L-idonojirimycin as pharmacological chaperones for neuronopathic forms of Gaucher disease*. *ChemBiochem*, 2013. 14(8): p. 943-9).

Un menor coste de producción, la posibilidad de administración oral y la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica son ventajas que presenta esta terapia para la enfermedad de Gaucher, en especial para los tipos II y III.

A pesar de su potencial, la investigación en terapia con chaperonas farmacológicas (TCF) no ha conducido aún a nuevos fármacos. Este objetivo último se facilitaría enormemente con el desarrollo de estrategias que potenciasen la acción de las chaperonas farmacológicas, por ejemplo mediante la coformulación con otros compuestos activos.

Existe por tanto la necesidad de identificar moléculas que permitan corregir o mejorar las patologías asociadas a las enfermedades de almacenamiento lisosomal, en particular a la enfermedad de Gaucher, y que actúen en sinergia con las chaperonas farmacológicas, de manera que formulaciones que contengan ambos componentes produzcan un beneficio terapéutico superior.

35

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En la presente invención se describe que la combinación de una chaperona farmacológica y la coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ) produce un beneficio en células de pacientes de Gaucher superior a la suma de los que producirían los tratamientos individuales, representando una opción terapéutica mejorada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, especialmente para los tipos neuronopáticos de la misma.

Así, un aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una chaperona farmacológica (CF) y Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ).

A lo largo de la presente invención, el término “chaperona farmacológica” se refiere a un compuesto capaz de unirse a la enzima β-glucocerebrosidasa humana, que se encuentra mutada y es disfuncional en los enfermos que padecen la enfermedad de Gaucher, y conducir a un aumento de su actividad médicamente relevante. Como ejemplos de chaperonas farmacológicas actualmente en estudio se pueden citar los derivados de iminoazúcares como la 1-desoxinojirimicina, la isofagomina, los derivados de iminoazúcares sp<sup>2</sup> como la NAdB–AIJ y otros compuestos no relacionados con los iminoazúcares como el trans-4-(2-amino-3,5-dibromobencilamino)ciclohexanol (ambroxol).

La coenzima Q<sub>10</sub>, también conocida como ubiquinona, ubidecarenona o coenzima Q, es una 1,4-benzoquinona que puede existir en tres estados redox: totalmente oxidado (ubiquinona), semiquinona (ubisemiquinona), y totalmente reducida (ubiquinol). En lo que sigue, el término coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ) se refiere a cualquiera de estas formas o estados redox. La CoQ es un antioxidante y transportador energético considerado como potencial tratamiento para enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson (Ebadi, M., et al., *Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease*. Biol Signals Recept, 2001. **10**(3-4): p. 224-53) o la enfermedad de Sanfilippo (Matalonga, L., et al., *Treatment effect of coenzyme Q and an antioxidant cocktail in fibroblasts of patients with Sanfilippo disease*. J Inherit Metab Dis, 2014). La coenzima Q<sub>10</sub> actúa sobre la disfunción mitocondrial y el desequilibrio autofágico.

En la composición farmacéutica de la invención, la chaperona farmacológica y la coenzima Q<sub>10</sub> pueden combinarse en cualquier proporción relativa.

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1.

5 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, y preferiblemente el iminioazúcar sp<sup>2</sup> es un derivado de L-idonojirimicina.

10 Los iminoazúcares sp<sup>2</sup> derivados de L-idonojirimicina a los que se refiere esta invención se caracterizan por presentar una elevada selectividad hacia la β-glucocerebrosidasa.

15 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente donde la CF es la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (NAdBT-AIJ).

20 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende uno o más principios activos adicionales, y preferiblemente que además comprende uno o más principios activos adicionales seleccionados de entre una enzima β-glucocerebrosidasa recombinante, una segunda CF, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa y/o un regulador de la proteostasis.

25 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende una enzima β-glucocerebrosidasa recombinante, y preferiblemente donde la enzima β-glucocerebrosidasa recombinante se selecciona de entre la imiglucerasa, la velaglucerasa alfa o la taliglucerasa alfa.

30 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende una segunda CF, preferiblemente donde la segunda CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimina, la isofagomina o el ambroxol.

35 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende un inhibidor de la glucosilceramida

sintasa, y preferiblemente donde el inhibidor de la glucosilceramida sintasa se selecciona de entre (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-1-butil-2-(hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol y *N*-[(1*R*,2*R*)-1-(2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1-hidroxi-3-(1-pirrolidinil)-2-propanil]octanamida.

5

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende un regulador de la proteostasis, y preferiblemente donde el regulador de la proteostasis se selecciona de entre el ácido 4-fenilbutírico o el celastrol.

10

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, que además comprende uno o más vehículos transportadores de fármacos, preferiblemente que comprende uno o más vehículos transportadores de fármacos seleccionados de derivados de ciclodextrinas, liposomas, micelas o nanocápsulas, más preferiblemente donde los vehículos transportadores de fármacos se seleccionan de derivados de ciclodextrina, y más preferiblemente donde los derivados de ciclodextrina se seleccionan de  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD),  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina per(2,3,6-tri-O-metilada) (TRIMEB),  $\beta$ -ciclodextrina per(2,6,-di-O-metilada) (DIMEB),  $\beta$ -ciclodextrina aleatoriamente polimetilada (RAMEB),  $\beta$ -ciclodextrina hidroxipropilada (HP- $\beta$ CD) y  $\beta$ -ciclodextrina sulfobutilada.

15

20

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

25

la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonójirimicina; y más preferiblemente la *N*-[*N'*-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonójirimicina ( NAdBT-AIJ);

30

y que además comprende uno o más principios activos, preferiblemente seleccionados de entre: una enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa recombinante, una segunda CF, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa y/o un regulador de la proteostasis.

35

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimicina; y más preferiblemente la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina ( NAdBT-AIJ);

y que además comprende una enzima β-glucocerebrosidasa recombinante, y preferiblemente donde la enzima β-glucocerebrosidasa recombinante se selecciona de entre la imiglucerasa, la velaglucerasa alfa o la taliglucerasa alfa.

10 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimicina; y más preferiblemente la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina ( NAdBT-AIJ);

y que además comprende una segunda CF, preferiblemente donde la segunda CF se selecciona de entre un iminoazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idojirimina, la isofagomina o el ambroxol.

20

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

25 la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimicina; y más preferiblemente la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina ( NAdBT-AIJ);

y que además comprende un inhibidor de la glucosilceramida sintasa, y preferiblemente donde el inhibidor de la glucosilceramida sintasa se selecciona de entre (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-1-butil-2-(hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol y *N*-[(1*R*,2*R*)-1-(2,3-Dihidro-1,4-benzodioxin-6-il)-1-hidroxi-3-(1-pirrolidinil)-2-propanil]octanamida.

30

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

35 la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimicina; y más preferiblemente la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina ( NAdBT-AIJ);  
y que además comprende un regulador de la proteostasis, y preferiblemente donde el  
5 regulador de la proteostasis se selecciona de entre el ácido 4-fenilbutírico o el celastrol.

En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

10 la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimicina; y más preferiblemente la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina ( NAdBT-AIJ);

15 que además comprende otro principio activo, preferiblemente seleccionado de entre una enzima β-glucocerebrosidasa recombinante, una segunda CF, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa y de un regulador de la proteostasis;  
y que además comprende uno o más vehículos transportadores de fármacos.

20 En otra realización la invención se refiere a la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, donde:

la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1, y preferiblemente donde la relación molar CF:CoQ es de 1:1;

25 la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>, preferiblemente un iminioazúcar sp<sup>2</sup> derivado de L-idonojirimicina; y más preferiblemente la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina ( NAdBT-AIJ);

que además comprende uno o más principios activos, preferiblemente seleccionados de entre una enzima β-glucocerebrosidasa recombinante, una segunda CF, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa y de un regulador de la proteostasis;

30 y que además comprende uno o más vehículos transportadores de fármacos seleccionados de derivados de ciclodextrinas.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente para la fabricación de un  
35 medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a trastornos lisosomales, preferiblemente para el tratamiento de una enfermedad causada por

mutaciones en el gen GBA1, más preferiblemente para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, y aún más preferiblemente para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher de tipo II o el tratamiento de la enfermedad de Gaucher de tipo III.

5

En otra realización la invención se refiere al uso de la composición tal y como se ha mencionado anteriormente caracterizado porque el paciente presenta al menos una mutación que provoque la patología de Gaucher con implicaciones del sistema nervioso central, y preferiblemente donde el paciente presenta una mutación L444P/L444P.

10

Así pues, la presente invención describe que, sorprendentemente, el tratamiento combinado de chaperonas farmacológicas para recuperar la actividad de la enzima y Coenzima Q<sub>10</sub>, en cualquiera de sus formas, para mejorar la función mitocondrial y disminuir el estrés autofágico, permite un beneficio terapéutico sinérgico, superior al que se estimaría por simple adición de los efectos de la chaperona y de la Coenzima Q<sub>10</sub>, en ensayos realizados con células de pacientes de Gaucher. Más aún, cuando la chaperona es activa en enfermos de Gaucher con la mutación L444P/L444P, como la NAdB-AIJ, la administración de formulaciones que combinan la chaperona y el Coenzima Q<sub>10</sub> igualmente producen un efecto sinérgico positivo.

15

20

Por tanto, la presente invención describe el uso de un compuesto con actividad como chaperona farmacológica frente a formas mutantes de la enzima  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana asociadas a la enfermedad de Gaucher en combinación con CoQ en cualquiera de sus formas, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher en un sujeto humano.

25

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende los componentes que se han definido anteriormente y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de la composición y de no ser perjudiciales para quién tome dicha composición.

30

Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados en forma de cualquier formulación farmacéutica, la naturaleza de la cual, como es bien sabido,

35

dependerá de la naturaleza del principio activo y de su vía de administración. En principio se puede utilizar cualquier vía de administración, por ejemplo oral, parenteral, o rectal.

5 Las composiciones sólidas para la administración oral incluyen comprimidos, granulados y cápsulas. En cualquier caso el método de fabricación está basado en una mezcla simple, granulación seca o granulación húmeda del principio activo con excipientes. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes tales como lactosa, celulosa microcristalina, manitol o hidrogenofosfato cálcico; agentes aglutinantes  
10 como por ejemplo almidón, gelatina o polivinilpirrolidona; disgregantes como carboximetilalmidón sódico o croscarmelosa sódica; y agentes lubricantes como por ejemplo estearato magnésico, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden ser además recubiertos con excipientes adecuados y mediante técnicas conocidas con el objeto de retrasar su disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y así  
15 conseguir una acción sostenida durante un mayor período de tiempo, o simplemente para mejorar sus propiedades organolépticas o su estabilidad. El principio activo puede también ser incorporado por recubrimiento sobre *pellets* inertes mediante el uso de polímeros filmógenos naturales o sintéticos. También es posible la realización de cápsulas de gelatina blanda, en las que el principio activo se mezcla con agua o con  
20 medio oleoso, por ejemplo aceite de coco, parafina líquida o aceite de oliva.

Se pueden obtener polvos y granulados para la preparación de suspensiones orales mediante la adición de agua, mezclando el principio activo con agentes dispersantes o humectantes; suspensantes y conservantes. También pueden añadirse otros  
25 excipientes, por ejemplo edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

Como formas líquidas para la administración oral se pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes comúnmente utilizados, tales como agua destilada, etanol, sorbitol, glicerol,  
30 polietilenglicoles (macrogoles) y propilénglicol. Dichas composiciones pueden también contener coadyuvantes como agentes humectantes, suspensantes, edulcorantes, aromatizantes, conservantes y reguladores de pH.

Preparaciones inyectables, de acuerdo con la presente invención, para la  
35 administración parenteral, comprenden soluciones, suspensiones o emulsiones estériles, en un solvente acuoso o no acuoso como propilénglicol, polietilénglicol o

aceites vegetales. Estas composiciones pueden también contener coadyuvantes, como humectantes, emulsionantes, dispersantes y conservantes. Podrían ser esterilizadas por cualquiera de los métodos conocidos o preparadas como composiciones sólidas estériles que serán disueltas en agua o cualquier otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de uso. También es posible partir de materias primas estériles y mantenerlas en estas condiciones durante todo el proceso de fabricación.

Para la administración rectal, el principio activo puede ser formulado preferentemente como supositorio en una base oleosa, como por ejemplo aceites vegetales o glicéridos semisintéticos sólidos, o en una base hidrófila como polietilenglicoles (macrogol).

La dosificación y la frecuencia de las dosis variarán en función de la naturaleza y gravedad de la enfermedad a tratar, la edad, la condición general y el peso del paciente, así como también del compuesto particular administrado y la vía de administración, entre otros factores. A título de ejemplo, un rango adecuado de dosificación oscila entre alrededor de 0,01 mg/Kg y alrededor de 100 mg/Kg por día, que pueden administrarse como dosis única o en varias tomas.

Las expresiones “uno o más principios activos adicionales” y “uno o más vehículos transportadores de fármacos” significan independientemente la posibilidad de que exista uno o más principios activos adicionales o transportadores de fármacos, preferiblemente uno, dos o tres principios activos adicionales o transportadores de fármacos, más preferiblemente uno o dos principios activos adicionales o transportadores de fármacos, y aún más preferiblemente un principio activo adicional o transportador de fármacos.

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

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**FIGURA 1.** La función mitocondrial en fibroblastos Gaucher es recuperada tras el tratamiento con Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ) y la chaperona farmacológica (CF) NAdBT-AIJ. Los fibroblastos dérmicos control y patológicos Gaucher portadores de la mutación L444P en homocigosis, fueron cultivados en la ausencia y presencia de CoQ (25µM), CF NAdBT-AIJ (25µM) o CoQ+CF (25µM+25µM) durante 96 h.

**(A)** Imagen representativa de la tinción con MitoTracker Red de cultivos de fibroblastos Gaucher. La magnificación permite observar la presencia de mitocondrias despolarizadas (a) y polarizadas (b).

**(B)** Cuantificación del número de mitocondrias despolarizadas por célula.

**(C)** El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en fibroblastos fue medido por citometría de flujo usando el marcador MitoTracker Red. El potencial disminuido en las células patológicas es recuperado con los tratamientos individuales pero de forma más significativa con el combinado.

**(D)** El estrés oxidativo derivado de la actividad mitocondrial medido por citometría de flujo usando el marcador MitoSox Red. El estrés es disminuido parcialmente por los tratamientos individuales pero de forma más significativa por el combinado. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. \*p<0.01 entre fibroblastos controles y Gaucher. <sup>a</sup>p<0.05 entre la presencia y ausencia de CoQ. <sup>b</sup>p<0.05 entre la presencia y ausencia de CF. <sup>c</sup>p<0.05 entre la presencia y ausencia de CoQ+CF. <sup>#</sup>p<0.05 entre tratamiento CoQ+ CF y CoQ o CF.

**FIGURA 2.** La actividad lisosomal y el flujo autofágico en fibroblastos Gaucher son mejorados tras el tratamiento con CoQ y CF NAdBT-AIJ. Los fibroblastos dérmicos control y patológicos Gaucher portadores de la mutación L444P en homocigosis, fueron cultivados en la ausencia y presencia de CoQ (25µM), CF NAdBT-AIJ (25µM) o CoQ+CF (25µM+25µM) durante 96 h.

**(A)** La actividad lisosomal en los fibroblastos fue medida por citometría de flujo usando el marcador LysoTracker Red. El aumento del contenido en lisosomas en las células patológicas es reducido con los tratamientos individuales pero de forma más significativa con el combinado.

**(B)** Magnificación de la tinción de marcador autofágico LC3 y mitocondrial Citocromo c que muestra la presencia de autofagosomas degradando mitocondrias en fibroblastos de pacientes. (a) Colocalización negativa autofagosoma/mitocondria: Coeficiente de

correlación de Pearson=0,0526; (b) Colocalización positiva autofagosoma/mitocondria: Coeficiente de correlación de Pearson=0,8929.

5 (C) Los “punctatas” son cuantificados, disminuyendo de forma significativa con los tratamientos individuales pero de forma más significativa con el combinado. Los datos son la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.01$  entre fibroblastos controles y Gaucher. <sup>a</sup> $p < 0.05$  entre la presencia y ausencia de CoQ. <sup>b</sup> $p < 0.05$  entre la presencia y ausencia de CF. <sup>c</sup> $p < 0.05$  entre la presencia y ausencia de CoQ+CF. <sup>#</sup> $p < 0.05$  entre tratamiento CoQ+ CF y CoQ o CF.

10

**FIGURA 3.** Aumento de la actividad enzimática asociado a un aumento en el nivel de proteína y a un correcto tráfico tras el tratamiento con CoQ y CF NAdBT-AIJ. Los fibroblastos dérmicos control y patológicos Gaucher portadores de la mutación L444P en homocigosis, fueron cultivados en la ausencia y presencia de CoQ (25 $\mu$ M), CF NAdBT-AIJ (25 $\mu$ M) o CoQ+CF (25 $\mu$ M+25 $\mu$ M) durante 96 h.

15

(A) Medida de la actividad glucocerebrosidasa (GBA) que se encuentra aumentada especialmente tras el tratamiento combinado. Los datos representan el % de actividad respecto a los fibroblastos control.

20

(B) Niveles de expresión proteica de glucocerebrosidasa (GBA) determinado por Western blot.  $\alpha$ -tubulina es usada como control de carga.

(C) Análisis densitométrico del resultado del Western blot. Los datos son media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. \* $p < 0.01$  entre fibroblastos controles y Gaucher. <sup>a</sup> $p < 0.05$  entre la presencia y ausencia de CoQ. <sup>b</sup> $p < 0.05$  entre la presencia y ausencia de CF. <sup>c</sup> $p < 0.05$  entre la presencia y ausencia de CoQ+CF. <sup>#</sup> $p < 0.05$  entre tratamiento

25

**FIGURA 4.** Imágenes de inmunofluorescencia con marcador lisosomal LAMP-2 y Glucocerebrosidasa (GBA) para comprobar el transporte de la enzima glucocerebrosidasa al lisosoma tras el tratamiento. La colocalización positiva del marcadore lisosomal LAMP-2 y la glucocerebrosidasa (GBA) indica el correcto tráfico del enzima. (a) Colocalización positiva: Coeficiente de correlación de Pearson=0,9535; (b) Colocalización negativa; (c) Colocalización positiva: Coeficiente de correlación de Pearson=0,9076. Los núcleos fueron teñidos con la tinción de Hoechst.

30

35

**FIGURA 5.** Aumento de la actividad enzimática Glucocerebrosidas (CBA) tras el tratamiento con CoQ y Ambroxol (ABX). Los fibroblastos dérmicos control y

patológicos Gaucher con heterocigosis para las mutaciones L444P y P415R, fueron cultivados en la ausencia y presencia de CoQ (25µM), Ambroxol (50µM) o CoQ+ABX (25µM+50µM) durante 96 h. La gráfica muestra la medida de la actividad glucocerebrosidasa (GBA) que se encuentra significativamente aumentada tras el tratamiento combinado. Datos representados como % de actividad respecto a los fibroblastos control. \*p<0.01 entre fibroblastos controles y Gaucher. <sup>a</sup>p<0.05 entre la presencia y ausencia de CoQ. <sup>b</sup>p<0.05 entre la presencia y ausencia de CF. <sup>c</sup>p<0.05 entre la presencia y ausencia de CoQ+CF. <sup>#</sup>p<0.05 entre tratamiento CoQ+ CF y CoQ o CF.

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

**Ejemplo 1. Efecto del tratamiento combinado CoQ y NAdBT-AIJ, en proporción molar relativa 1:1, *in vitro* en células Gaucher con la variante L444P en homocigosis sobre la disfunción mitocondrial.**

Los cultivos de fibroblastos dérmicos controles y de pacientes con la enfermedad de Gaucher portadores de la mutación L444P se analizaron para comprobar el estado y funcionamiento de la red mitocondrial.

En primer lugar se observó una reducción del 20% en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, en concreto en el complejo II+III, asociado con una deficiencia secundaria en los niveles de Coenzima Q<sub>10</sub>. Como consecuencia de estas anomalías se confirmó que el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) está disminuido en los fibroblastos Gaucher con una proporción elevada de mitocondrias despolarizadas aisladas de la red mitocondrial tubular (Figura 1A y 1B) observadas por microscopía de inmunofluorescencia tras tinción con MitoTracker red. Los ensayos de citometría de flujo, usando este mismo marcador (Figura 1C), permiten cuantificar la reducción del potencial de membrana mitocondrial. Los fibroblastos fueron cultivados en la ausencia y presencia de CoQ (25µM), CF NAdBT-AIJ (25µM) o CoQ+CF en proporción molar relativa 1:1 (25µM+25µM) durante 96 h. El potencial de membrana mitocondrial fue recuperado mediante los tratamientos individuales pero de forma más significativa con el tratamiento combinado.

Los niveles de producción de energía en forma de ATP también se encuentran reducidos por efecto de la reducción del potencial de membrana mitocondrial e igualmente los tratamientos consiguieron aumentarlos de forma proporcional al aumento del potencial mitocondrial.

5

La asociación de una disfunción mitocondrial con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) está bien demostrada. La figura 1D representa las medidas de estrés oxidativo mitocondrial en fibroblastos obtenidas mediante ensayos de citometría de flujo usando el marcador MitoSOX Red. La producción mitocondrial de superóxido está incrementada 1.5 veces confirmado el estrés oxidativo en fibroblastos Gaucher. La suplementación con CoQ, NAdBT-AIJ o una combinación de ambos en proporción molar relativa 1:1 induce una considerable reducción de estos niveles.

10

15

**Ejemplo 2. Efecto del tratamiento combinado CoQ y NAdBT-AIJ, en proporción molar relativa 1:1, *in vitro* en células Gaucher con variante L444P en homocigosis sobre el estrés autofágico.**

Existe una relación entre niveles altos de estrés oxidativo y activación de la autofagia. Para determinar si la autofagia está incrementada en los fibroblastos de Gaucher L444P, se cuantificó la cantidad de vacuolas ácidas mediante la tinción con LysoTracker y ensayos de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Mediante esta técnica se observó un aumento de 1.4 veces la tinción con LysoTracker en fibroblastos Gaucher comparados con fibroblastos control (Figura 2A).

20

25

Se cuantificó el número de lisosomas en los cultivos para dilucidar si la autofagia en estos fibroblastos disminuye como consecuencia de una mejora de la función mitocondrial por suplementación con CoQ y/o del plegamiento de glucocerebrosidasa mutante por tratamiento con chaperonas NAdBT-AIJ. La figura 2A indica que la actividad lisosomal está reducida por el tratamiento individual pero más significativamente por la combinación de ambas.

30

El análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato (SDS-PAGE)-Western blot sugiere un aumento de los marcadores autofágicos como Atg12-5, beclin1 y LC3B en los fibroblastos patológicos frente a controles. Esta autofagia se comprobó que es selectiva de las mitocondrias, observando la presencia de

35

“punctatas” de colocación en ensayos de inmunofluorescencia de marcadores autofágicos (LC3B) con marcadores mitocondriales (citocromo c) Figura 2B. La tinción de LC3B fue difícilmente detectable en fibroblastos control. En los fibroblastos Gaucher la población de mitocondrias pequeñas redondas muestra una alta colocación de citocromo c y LC3B ( $r=0.8929$ ), mientras que las mitocondrias tubulares no ( $r=0.0526$ ).

La suplementación con CoQ (25  $\mu$ M) o la CF NAdBT-AIJ (25  $\mu$ M) redujo parcialmente el número de “punctatas” LC3/Citocromo C. Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos en proporción mola relativa 1:1 fue altamente efectiva y redujo drásticamente estos elementos.

**Ejemplo 3. Efecto del tratamiento combinado CoQ y NAdBT-AIJ, en proporción molar relativa 1:1, *in vitro* en células Gaucher con la variante L444P en homocigosis sobre la actividad enzimática glucocerebrosidasa y su correcto tráfico hasta los lisosomas.**

La actividad glucocerebrosidasa en los fibroblastos de pacientes se encuentra reducida a niveles inferiores al 10% comparado con valores de células control. La Figura 3A muestra como la actividad enzimática es parcialmente restaurada tras la mejora de la función mitocondrial por CoQ (1,2 veces) así como por el correcto plegamiento inducido por el tratamiento con chaperonas NAdBT-AIJ (2.4 veces). El tratamiento combinado de ambos compuestos en proporción mola relativa 1:1 consigue una mayor mejora de los niveles de actividad (3.4 veces).

Las deficiencias en la actividad enzimática se asocian a niveles reducidos de expresión de la proteína que, al igual que ocurre con la actividad, son recuperados con el tratamiento con CoQ y CF. En la figura 3B se muestran los niveles de expresión proteica determinados por Western blot. La expresión de  $\alpha$ -tubulina es usada como control de carga. En la figura 3C se representa un análisis densitométrico del resultado de Western blot.

**Ejemplo 4. Efecto del tratamiento combinado CoQ y NAdBT-AIJ sobre el tráfico de la glucocerebrosidasa.**

El tráfico natural de la enzima glucocerebrosidasa hasta el lisosoma es también restablecido tras el cotratamiento de CoQ y CF, como muestra la figura 4. En ella se observa un ensayo de microscopía de fluorescencia con anticuerpos frente a la

5 proteína LAMP-1 lisosomal y la glucocerebrosidasa. La colocación de ambas proteínas confirma la presencia del enzima en el lisosoma. Los fibroblastos que fueron co-tratados con CoQ y la CF NAdBT-AIJ en proporción mola relativa 1:1 tienen un perfil de tinción contra la glucocerebrosidasa con mayor intensidad y colocación con la proteína LAMP-1 lisosomal. A su vez disminuye la señal de la glucocerebrosidasa que colocación con la proteína PDI del retículo endoplasmático, lo que sugiere que la proteína es transportada correctamente al aparato de Golgi y a los lisosomas.

10 **Ejemplo 5. Efecto del tratamiento combinado CoQ y ambroxol (ABX), en proporción molar relativa 1:1, *in vitro* de células Gaucher con la variante L444P/P415R en heterocigosis sobre la actividad enzimática glucocerebrosidasa.**

15 La actividad de la enzima glucocerebrosidasa en fibroblastos derivados de pacientes Gaucher portadores de las mutaciones L444P/P415R en heterocigosis también se encuentra disminuida comparada con fibroblastos controles saludables. El tratamiento con ambroxol (ABX), que actúa como chaperona farmacológica, a una concentración de 50 µM, recupera de forma parcial la actividad enzimática (1.6 veces más). En menor grado, pero de forma significativa, el tratamiento con la CoQ también permite  
 20 obtener mayor actividad glucocerebrosidasa en las células derivadas de los pacientes Gaucher (1.2 veces más). El tratamiento combinado de ambos compuestos en proporción mola relativa 1:1 consigue una mejora significativa de los niveles de actividad (2.8 veces).

**REIVINDICACIONES**

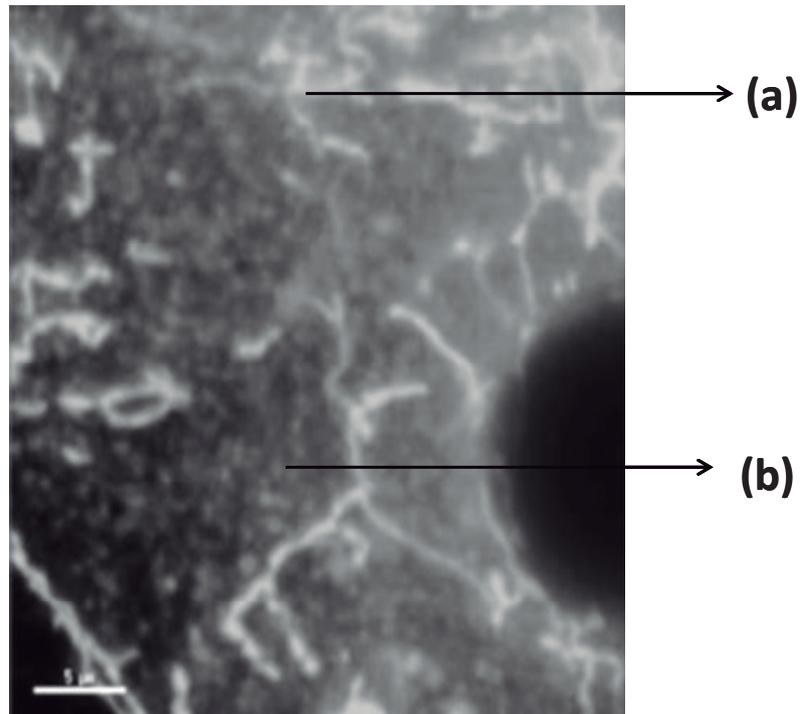
- 1.- Composición farmacéutica que comprende una chaperona farmacológica (CF) y Coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ).
- 5
- 2.- La composición farmacéutica según la reivindicación 1, donde la relación molar CF:CoQ es de entre 1:10 y 10:1.
- 3.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la CF es un iminoazúcar sp<sup>2</sup>.
- 10
- 4.- La composición farmacéutica según la reivindicación 3, donde el iminioazúcar sp<sup>2</sup> es un derivado de L-idonojirimicina.
- 15
- 5.- La composición farmacéutica según la reivindicación 4, donde la CF es la N-[N'-(4-adamantan-1-ilcarboxamidobutil)tiocarbamoilo]-1,6-anhidro-L-idonojirimicina (NAdBT-AIJ).
- 6.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende uno o más principios activos adicionales.
- 20
- 7.- La composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde el principio activo adicional se selecciona de entre una enzima β-glucocerebrosidasa recombinante, una segunda CF, un inhibidor de la glucosilceramida sintasa y/o un regulador de la proteostasis.
- 25
- 8.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que además comprende uno o más vehículos transportadores de fármacos.
- 30
- 9.- La composición farmacéutica según la reivindicación 8, donde el vehículo transportador de fármacos se selecciona de derivados de ciclodextrinas, liposomas, micelas o nanocápsulas.
- 35
- 10.- La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde el vehículo transportador de fármacos se selecciona de derivados de ciclodextrina.

11.- La composición farmacéutica según la reivindicación 10, donde la ciclodextrina se selecciona de entre la  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD),  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina per(2,3,6-tri-O-metilada) (TRIMEB),  $\beta$ -ciclodextrina per(2,6,-di-O-metilada) (DIMEB),  $\beta$ -ciclodextrina aleatoriamente polimetilada (RAMEB),  $\beta$ -ciclodextrina hidroxipropilada (HP- $\beta$ CD) y  $\beta$ -ciclodextrina sulfobutilada.

12.- Uso de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad causada por mutaciones en el gen GBA1.

13.- El uso según la reivindicación 12, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

14.- El uso según la reivindicación 13, para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher de tipo II o el tratamiento de la enfermedad de Gaucher de tipo III.



Gaucher-B

FIG 1A

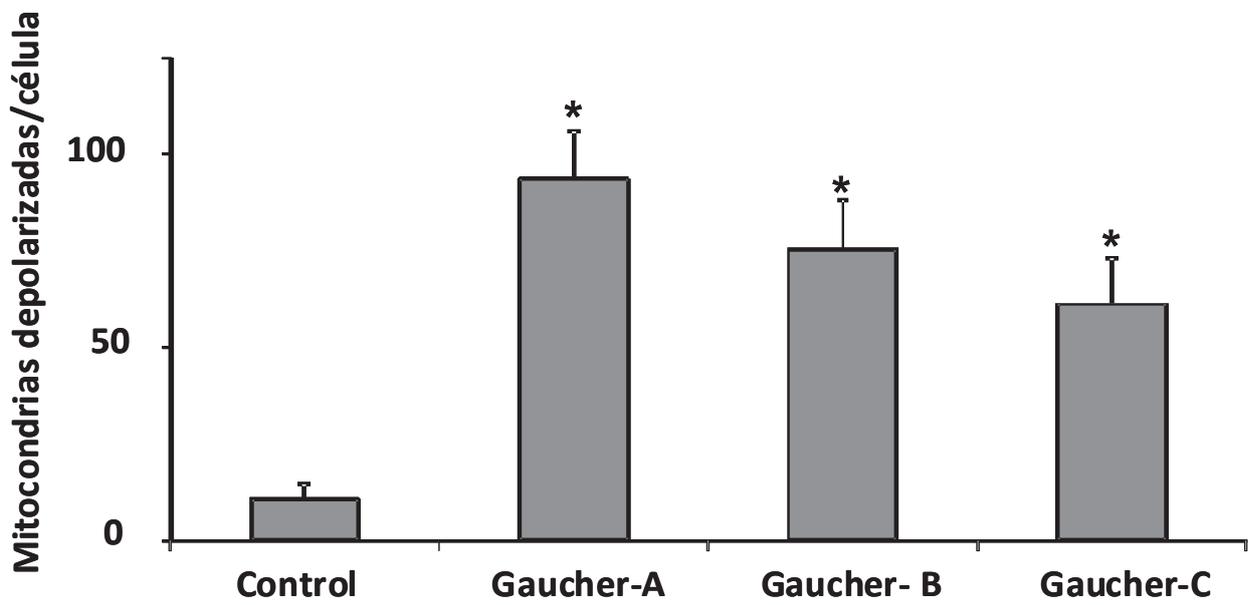


FIG 1B

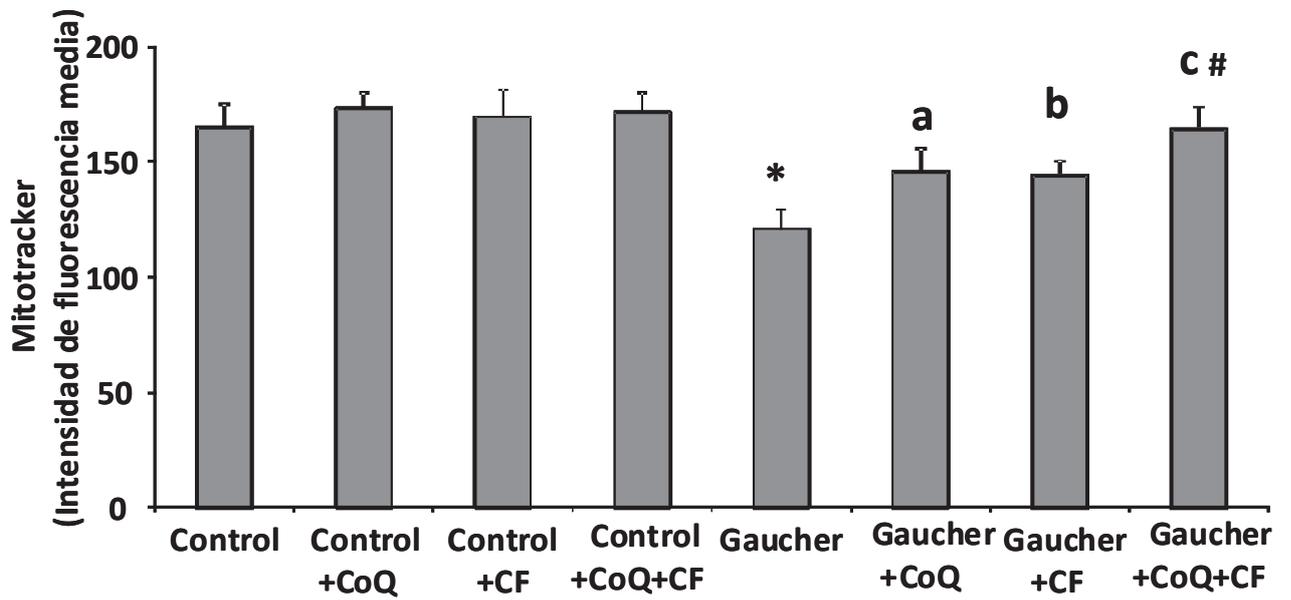


FIG 1C

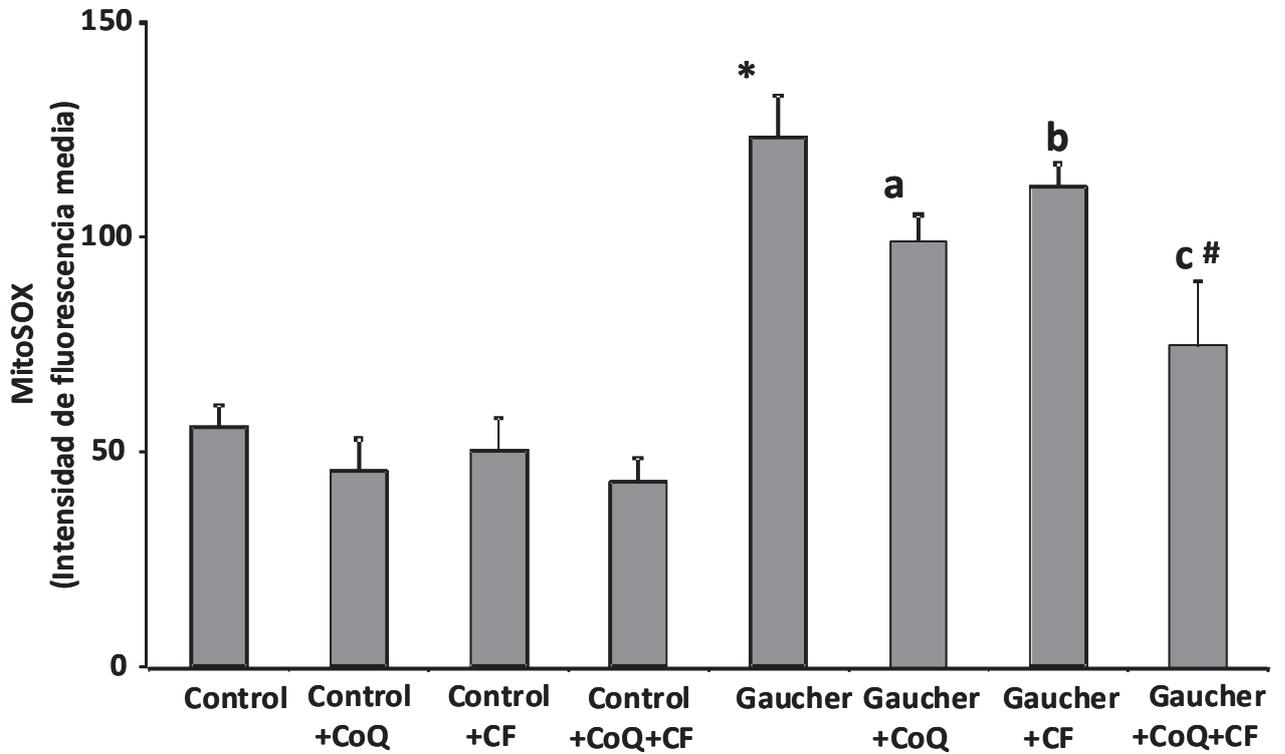


FIG 1D

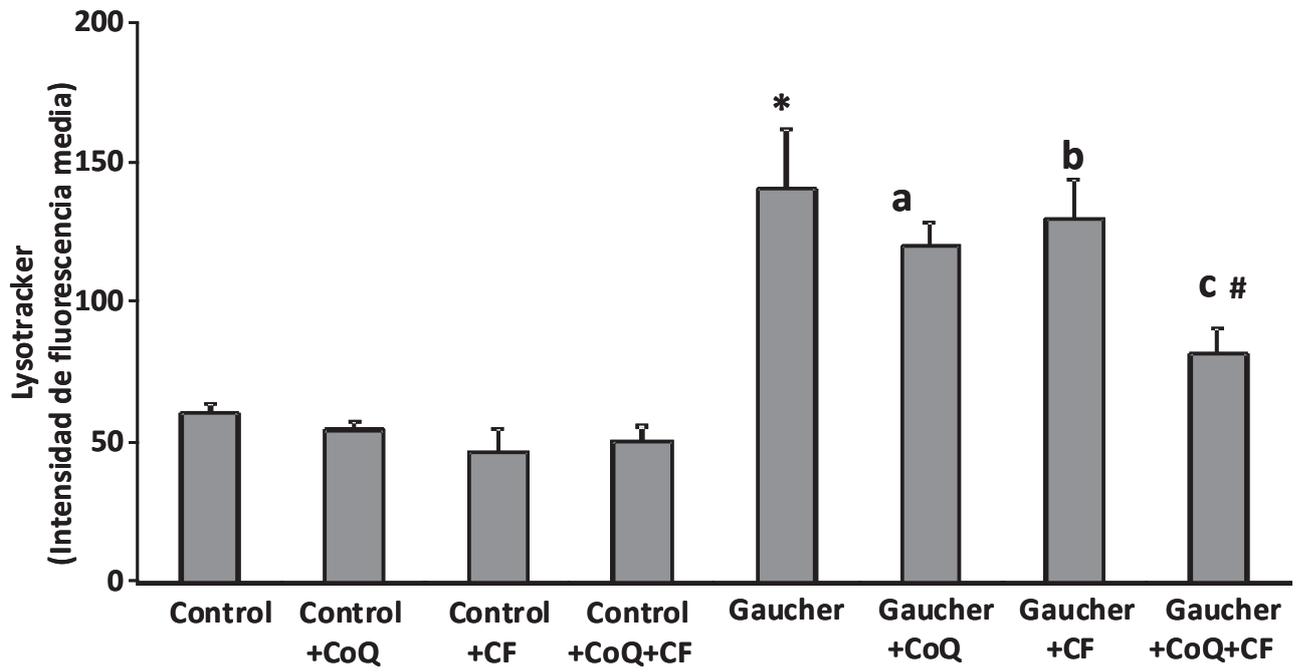


FIG 2A

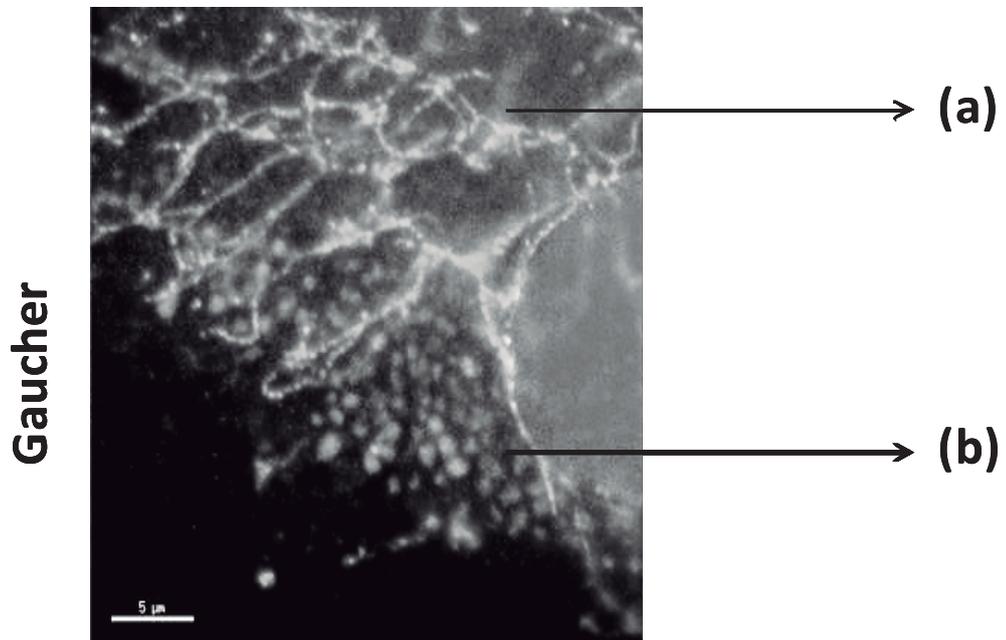


FIG 2B

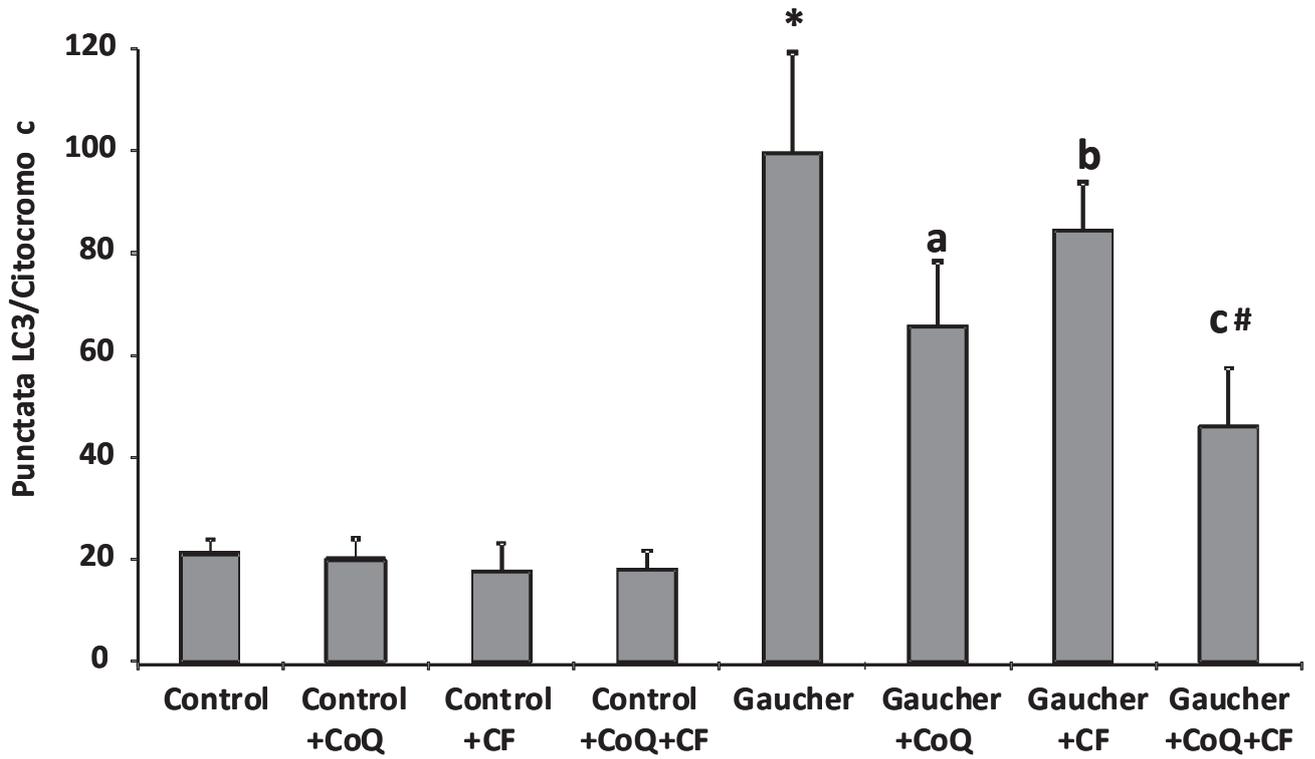


FIG 2C

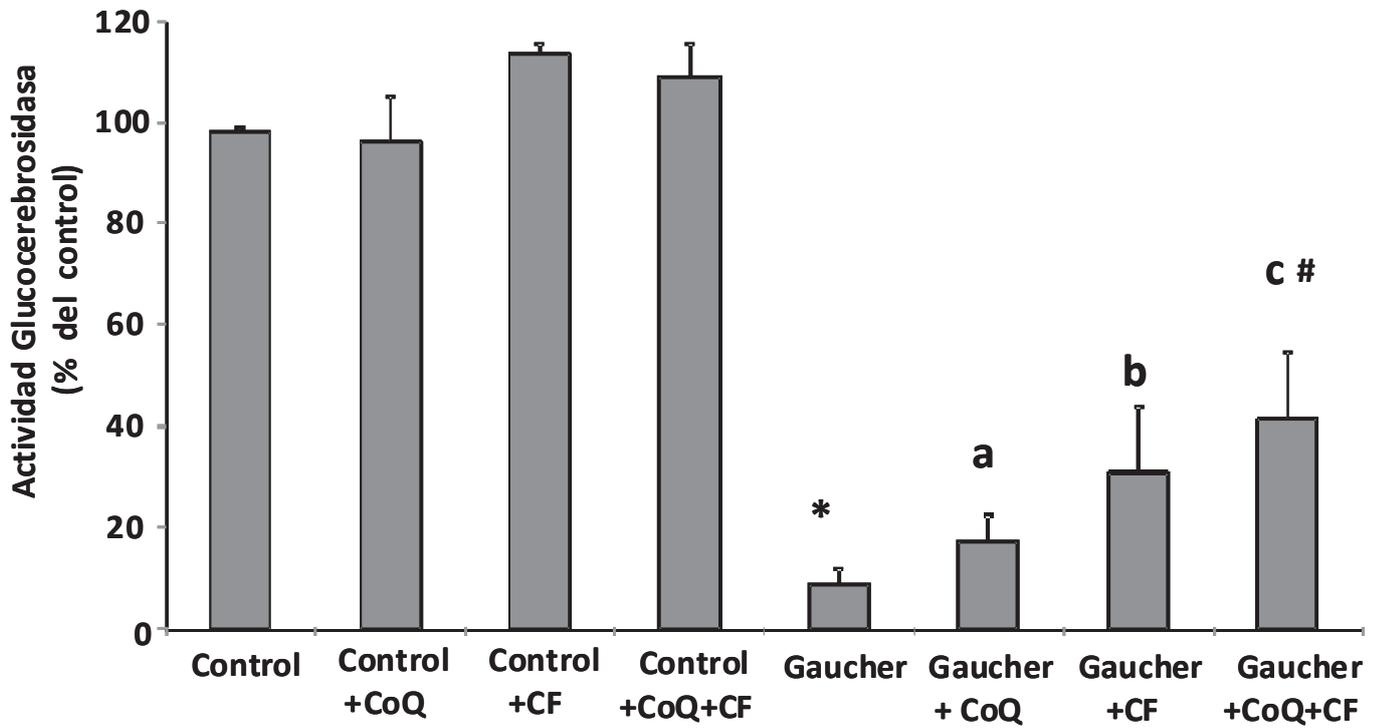


FIG 3A

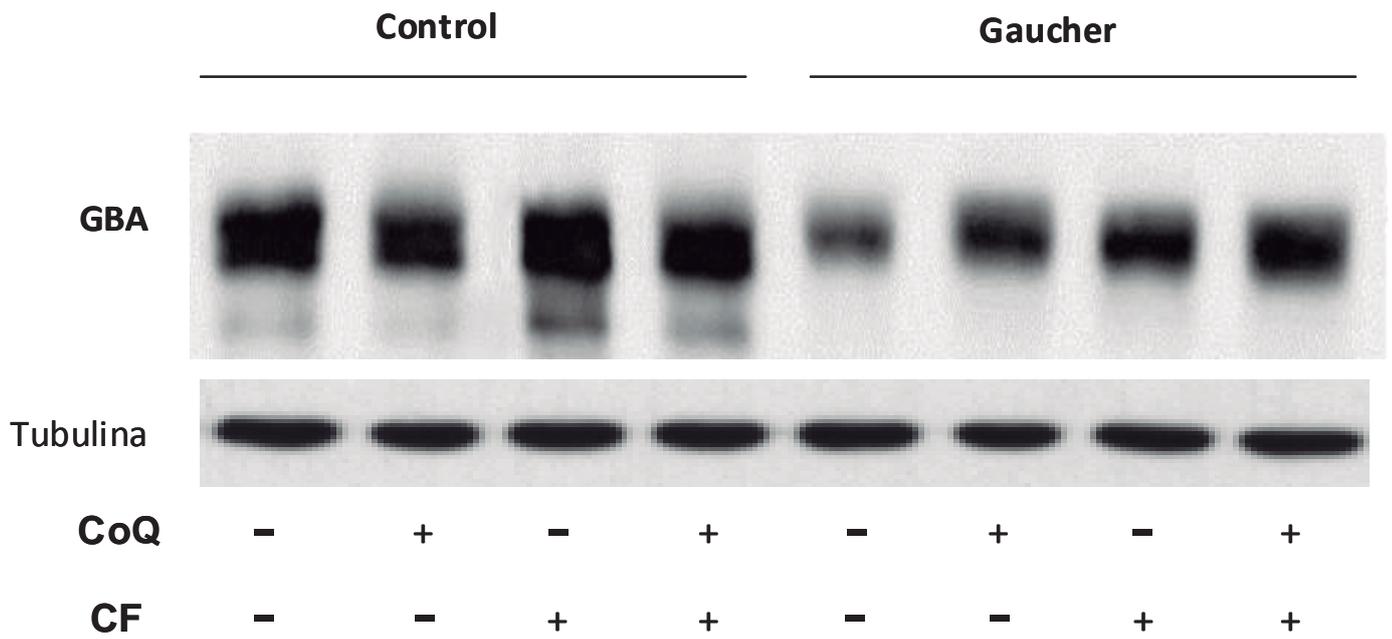


FIG 3B

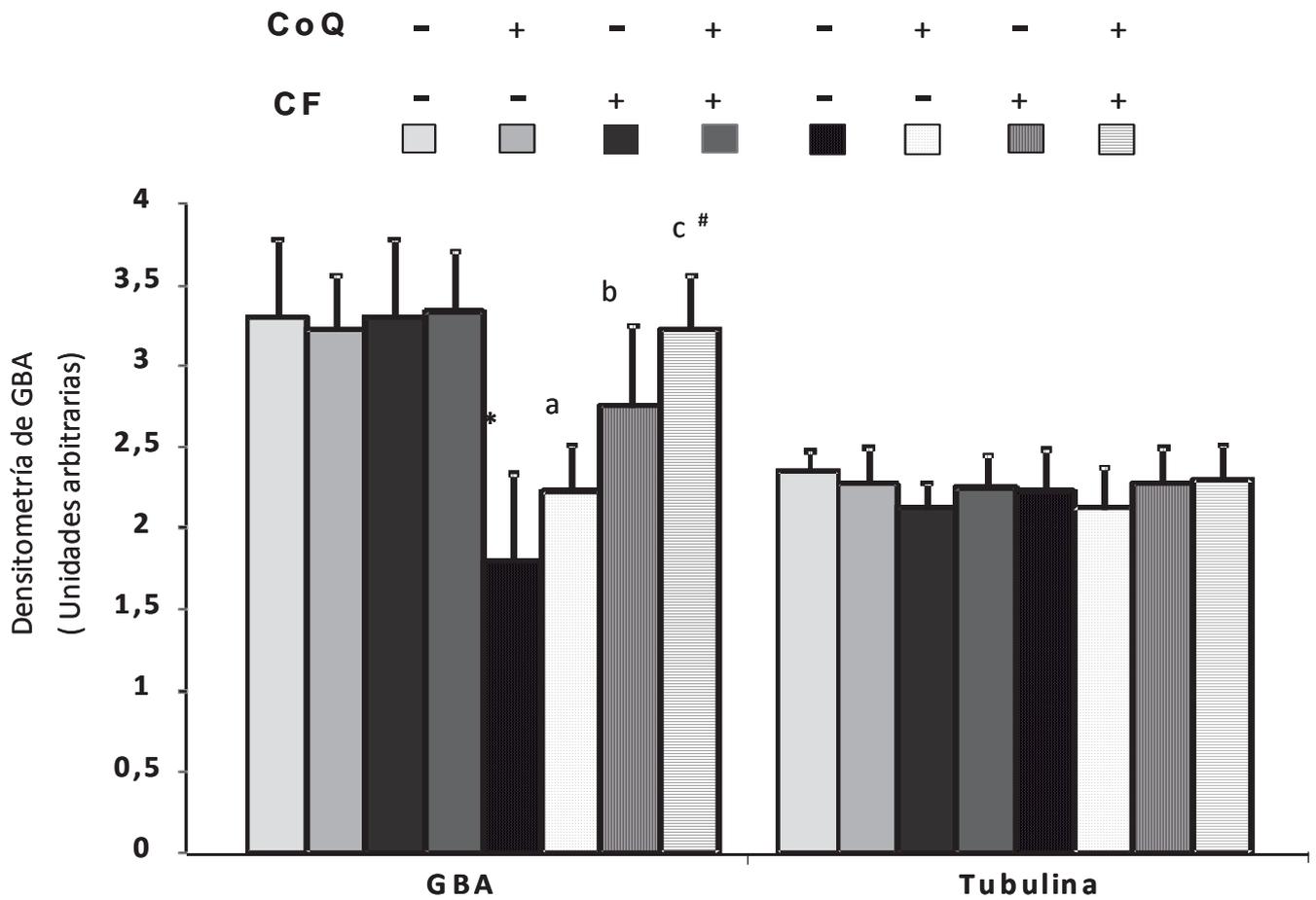


FIG 3C

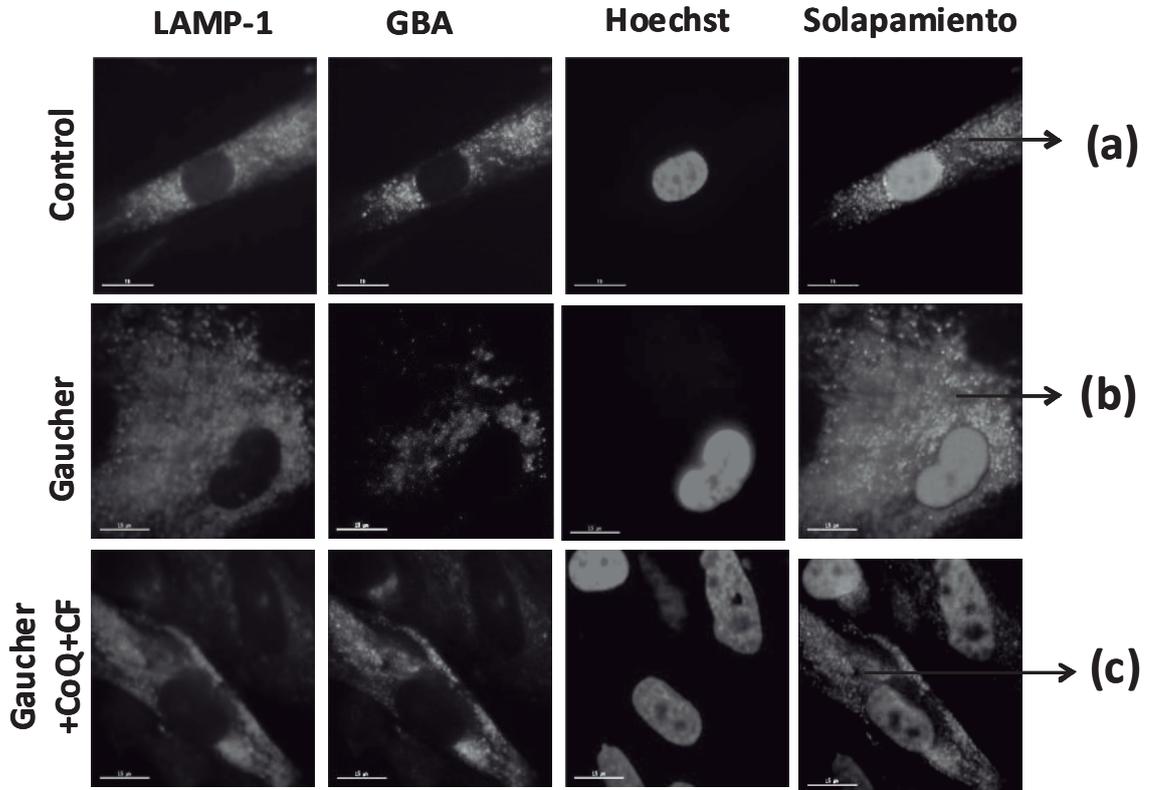


FIG 4

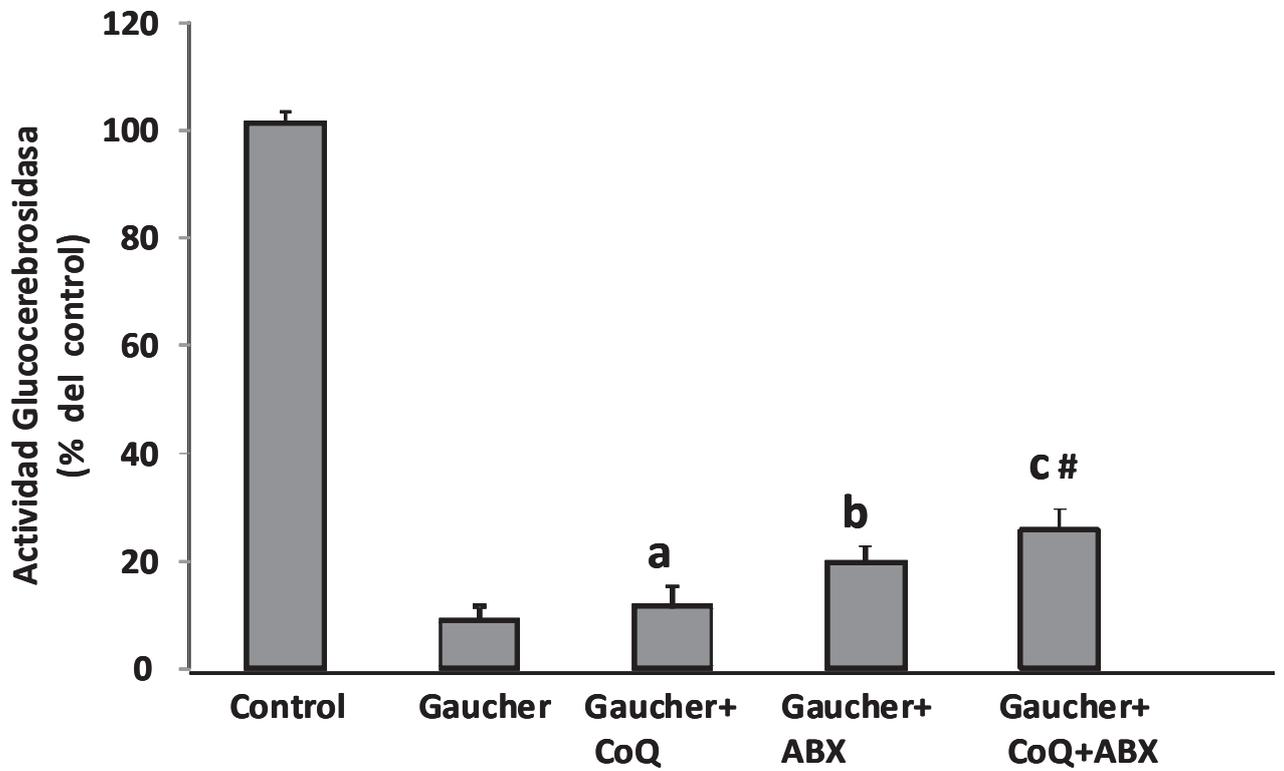


FIG 5