

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 335**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2006 E 15153174 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2932982**

54 Título: **Un método para el tratamiento de la enfermedad de Pompe usando 1-desoxinojirimicina y derivados**

30 Prioridad:

**17.05.2005 US 682241 P**

**21.10.2005 US 729329 P**

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

**22.03.2019**

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**1 Cedar Brook Drive  
Cranbury, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

**MUGRAGE, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 705 335 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

Un método para el tratamiento de la enfermedad de Pompe usando 1-desoxinojirimicina y derivados

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona una composición que comprende N-butil-1-desoxinojirimicina (NB-DNJ), o una sal del mismo para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, donde el reemplazo de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida se administra en combinación. Se ha mostrado inesperadamente que estos compuestos potencian la  $\alpha$ -glucosidasa ácida, la enzima responsable de la patología de la enfermedad de Pompe.

**Antecedentes de la invención**

Enfermedad de Pompe

10 La enfermedad de Pompe es uno de varios trastornos del almacenamiento lisosómico. Los trastornos del almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades recesivas autosómicas provocadas por la acumulación de glucoesfingolípidos celulares, glucógeno o mucopolisacáridos, debido a enzimas hidrolíticas defectuosas. Ejemplos de trastornos lisosómicos incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Gaucher (Beutler y cols., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª ed 2001 Scriver y cols., ed. pp. 3635-3668, McGraw-Hill, N.Y.), GM1-gangliosidosis (id. at pp 3775-3810), fucosidosis (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 1995. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. y Valle, D., ed pp. 2529-2561, McGraw-Hill, N.Y.), mucopolisacaridosis (id. en pp 3421-3452), enfermedad de Pompe (id. en pp. 3389-3420), enfermedad de Hurler-Scheie (Weismann y cols., *Science*. 1970; 169, 72-74), enfermedades de Niemann-Pick A y B, (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8ª ed 2001. Scriver y cols. Ed., pp 3589-3610, McGraw-Hill, N.Y.) y enfermedad de Fabry (Id. en pp. 3733-3774).

15 La enfermedad de Pompe está provocada por una deficiencia en la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida (Gaa). La Gaa metaboliza el glucógeno, una forma de almacenamiento de azúcar usada para la energía, en glucosa. Se cree que la acumulación de glucógeno conduce a miopatía muscular progresiva en todo el cuerpo que afecta a diversos tejidos corporales, particularmente el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso. Según the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, se estima que la enfermedad de Pompe se produce en alrededor de 1 de cada 40.000 nacimientos.

20 Hay tres tipos de enfermedad de Pompe reconocidos – de comienzo neonatal, infantil y en la edad adulta. La neonatal es la más grave y se presenta con síntomas que incluyen falta de tono muscular, debilidad, hepatomegalia y cardiomegalia, y cardiomiopatía. El tragado puede hacerse difícil y la lengua puede sobresalir y dilatarse. La mayoría de los niños mueren de complicaciones respiratorias o cardíacas antes de dos años de edad. La enfermedad de Pompe de comienzo infantil se presenta en primer lugar en la infancia de temprana a tardía e incluye debilidad progresiva de los músculos respiratorios del tronco, el diafragma y los miembros inferiores, así como intolerancia al ejercicio. La mayoría de los pacientes de Pompe de comienzo infantil no superan la segunda o tercera década de vida. Los síntomas de comienzo en la edad adulta implican debilidad muscular generalizada y atrofia de los músculos respiratorios del tronco, las extremidades inferiores y el diafragma. Algunos pacientes adultos carecen de síntomas importantes o limitaciones motrices.

Tratamiento actual

25 El tratamiento actual de la enfermedad de Pompe implica el tratamiento sintomático de los síntomas cardíacos y respiratorios. No hay un tratamiento aprobado para el defecto genético subyacente. Recientemente, el uso de Gaa reconstitutiva (Myozyme; Genzyme, Inc.) fue aprobado por la F.D.A. en los Estados Unidos. Sin embargo, las evaluaciones clínicas que usan terapia reconstitutiva de enzimas para restituir Gaa insuficiente en pacientes de Pompe lactantes solo fueron moderadamente satisfactorias para mejorar la función cardíaca y esquelética (Klinge y cols., *Neuropediatrics*. 2005; 36(1): 6-11). Se observó que la Gaa recombinante era más eficaz para resolver la cardiomiopatía que la miopatía de los músculos esqueléticos (Raben y cols., *Mol Ther*. 2005; 11(1): 48-56), principalmente debido a que la enzima recombinante no puede penetrar en el tejido conectivo. Un método para tratar la enfermedad de Pompe usando Gaa recombinante se describe específicamente en el documento U.S. 6.537.785 de Canfield.

30 Una de las principales complicaciones de la terapia reconstitutiva de enzimas (ERT, por sus siglas en inglés) es la obtención y el mantenimiento de cantidades terapéuticamente eficaces de enzima debido a la rápida degradación de la enzima infundida. Como resultado, la ERT requiere numerosas infusiones de alta dosis y es costosa y prolongada. La terapia ERT tiene varias advertencias adicionales, tales como dificultades con la generación a gran escala, la purificación y el almacenamiento de proteína plegada apropiadamente, la obtención de la proteína natural glucosilada y la generación de una respuesta inmunitaria antiproteínica e ineficacia de la proteína para cruzar la barrera hematoencefálica en cantidades suficientes para afectar a enfermedades que tienen una implicación significativa del sistema nervioso central. Además, la enzima recombinante no puede cruzar barreras que rodean a órganos tales como el riñón, ni puede penetrar en el tejido conectivo y así no es eficaz para restaurar la función de numerosos tejidos afectados.

La terapia génica usando vectores recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína funcional, o células humanas genéticamente modificadas que expresan una proteína funcional, también se está usando para tratar deficiencias proteínicas y otros trastornos que se benefician de la restitución proteínica. Aunque es prometedor, este enfoque también está limitado por dificultades técnicas, tales como la incapacidad de los vectores para infectar o transducir células que se dividen, baja expresión del gen buscado y regulación de la expresión una vez que se aporta el gen (p. ej., muchos vectores virales requieren que las células se dividan para la eficacia).

Un tercer enfoque relativamente reciente para tratar deficiencias enzimáticas implica el uso de inhibidores de molécula pequeña para reducir el sustrato natural de proteínas enzimáticas deficientes, mejorando de ese modo la patología observada. Este sistema de "carencia de sustrato" se ha descrito específicamente para el tratamiento de algunos trastornos del almacenamiento lisosómico que implican acumulación de glucolípidos (véanse las patentes de EE. UU. 5.798.366, 6.291.657 y 6.660.749). Los inhibidores de molécula pequeña propuestos para el uso como una terapia incluyen derivados de N-alquil-desoxinojirimicina (N-alquil-DNJ), y se presenta que son específicos para inhibir las enzimas implicadas en la síntesis de glucolípidos, reduciendo de ese modo la cantidad de glucolípido celular que se necesita que sea descompuesta por la enzima escasa. Este enfoque también es limitado porque los glucolípidos son necesarios para la función biológica, y una carencia excesiva puede provocar efectos adversos. Específicamente, los glucolípidos son usados por el cerebro para enviar señales desde los gangliosidos de una neurona a otra. Si hay demasiado pocos o demasiados glucolípidos, la capacidad de la neurona para enviar señales se deteriora.

Un cuarto enfoque, una estrategia de chaperonas específicas, rescata a proteínas mutadas de la degradación presumiblemente en el retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés) o en otros sistemas de degradación/eliminación de proteínas celulares. Patentes y publicaciones previas describen una estrategia terapéutica para rescatar proteínas enzimáticas endógenas, incluyendo enzimas lisosómicas mal plegadas, de la degradación por la maquinaria de control de calidad del ER. En realizaciones particulares, esta estrategia emplea chaperonas farmacológicas de molécula pequeña que se unen específicamente a una enzima lisosómica escasa asociada con un trastorno lisosómico particular. En ausencia de terapia, la proteína enzimática mutada es inestable en el ER (Ishii y cols., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), se retarda en su maduración hasta un producto final y posteriormente se degrada en el ER. La estrategia de las chaperonas implica el uso de un compuesto que facilita el plegamiento y mejora la estabilidad de una proteína mutada, para prevenir la degradación excesiva o anormal a partir del sistema de control de calidad del ER. Estas chaperonas específicas se designan chaperonas específicas del sitio activo o también se denominan chaperonas farmacológicas específicas.

La teoría original tras esta estrategia es como sigue: puesto que la proteína enzimática mutante se pliega inapropiadamente en el ER (Ishii y cols., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retarda en la ruta de transporte normal (ER → aparato de Golgi → endosoma → lisosoma) y se degrada rápidamente. Por lo tanto, un compuesto que facilite el plegamiento correcto de una proteína mutante servirá como una chaperona específica del sitio activo para que la proteína mutante promueva su escape uniforme del sistema de control de calidad del ER. Se sabe que algunos inhibidores de enzimas ocupan el centro catalítico, dando como resultado la estabilización de la conformación enzimática *in vitro*.

La estrategia de las chaperonas farmacológicas específicas se ha demostrado para numerosas enzimas implicadas en trastornos del almacenamiento lisosómico como en las Patentes de EE. UU. N° 6.274.597, 6.583.158, 6.589.964, 6.599.919 y 6.916.829 de Fan y cols. Por ejemplo, un derivado de molécula pequeña de galactosa, 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), un potente inhibidor competitivo de la enzima de Fabry mutante  $\alpha$ -galactosidasa A ( $\alpha$ -Gal A; Gla), incrementaba eficazmente la estabilidad *in vitro* de la  $\alpha$ -Gal A mutante humana (R301Q) a pH neutro, y mejoraba la actividad de la enzima mutante en linfoblastos establecidos a partir de pacientes con enfermedad de Fabry con mutaciones R301Q o Q279E. Por otra parte, la administración oral de DGJ a ratones transgénicos que sobreexpresan una  $\alpha$ -Gal A mutante (R301Q) elevaba sustancialmente la actividad enzimática en los órganos principales (Fan y cols., *Nature Med.* 1999; 5: 112-115). Un rescate similar de glucocerebrosidasa ( $\beta$ -glucosidasa ácida, Gba) de células de pacientes con enfermedad de Gaucher se ha descrito usando otro iminoazúcar, isofagomina (IFG), y sus derivados, descrito en la Patente de EE. UU. N° 6.916.829, y usando otros compuestos específicos para glucocerebrosidasa (descritos en las solicitudes de patente de EE. UU. en tramitación junto con la presente n° de serie 10/988.428 y 10/988.427, ambas presentadas el 12 de noviembre de 2004). La Patente de EE. UU. N° 6.583.158, descrita anteriormente, divulga varios compuestos de molécula pequeña que se esperaba que funcionaran para rescatar Gaa para el tratamiento de la enfermedad de Pompe, incluyendo 1-desoxinojirimicina (DNJ),  $[\alpha]$ -homonojirimicina y castanoespermina.

La presente invención se basa en los resultados inesperados obtenidos usando derivados de DNJ, tales como N-butil-DNJ, que se encontró que eran chaperonas farmacológicas eficaces para Gaa mutante.

### Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona una composición que comprende N-butil-1-desoxinojirimicina (NB-DNJ) o una sal de la misma para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, en donde la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (Gaa) restitutiva se administra en combinación y la NB-DNJ o la sal de la misma estabiliza la Gaa.

Preferiblemente, la Gaa reconstitutiva y la NB-DNJ o la sal de la misma se formulan en composiciones separadas.

Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma y la Gaa reconstitutiva se administran mediante la misma vía.

Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma y la Gaa reconstitutiva se administran mediante vías diferentes.

5 Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma se administra mediante administración oral y la Gaa reconstitutiva se administra mediante infusión intravenosa.

Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma y la Gaa reconstitutiva se administran simultáneamente.

Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma se administra antes o después que la Gaa reconstitutiva.

Preferiblemente, la Gaa reconstitutiva y la NB-DNJ o la sal de la misma se formulan en una sola composición.

10 Preferiblemente, la composición es adecuada para la administración parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea e intraperitoneal) o para la administración oral, intranasal o transdérmica.

Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma se administra en una cantidad de 5 mg a 75 mg al día.

Preferiblemente, la NB-DNJ o la sal de la misma se administra durante un período de 0 horas a 6 horas antes de la Gaa reconstitutiva.

### Breve descripción de los dibujos

15 El archivo de la patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. Copias de la publicación de patente o solicitud de patente con el dibujo o los dibujos en color serán proporcionadas por la Oficina bajo petición y pago de la cuota necesaria.

20 Figura 1. La Figura 1 representa los efectos de los derivados de iminoazúcar 1-DNJ, NB-DNJ y N-(ciclopropil)metil-DNJ sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en la línea celular de la enfermedad de Pompe PM-11.

Figuras 2A-D. La Figura 2 muestra el aumento de Gaa en el cerebro (2A), el hígado (2B), los gemelos (2C) y la lengua (2D) de ratones C57BL6 normales con diversas concentraciones de DNJ y NB-DNJ durante 2 semanas.

25 Figuras 3A-D. La Figura 3 muestra el aumento de Gaa en el riñón (3A), el diafragma (3B), el corazón (3C) y el sóleo (3D) de ratones C57BL6 normales tratados con diversas concentraciones de DNJ y NB-DNJ durante 2 semanas.

Figuras 4A-D. La Figura 4 muestra el aumento de Gaa en el cerebro (4A), el hígado (4B), los gemelos (4C) y la lengua (4D) de ratones C57BL6 normales tratados con diversas concentraciones de DNJ y NB-DNJ durante 4 semanas.

30 Figuras 5A-D. La Figura 5 muestra el aumento de Gaa en el riñón (5A), el diafragma (5B), el corazón (5C) y el sóleo (5D) de ratones C57BL6 normales tratados con diversas concentraciones de DNJ y NB-DNJ durante 4 semanas.

35 Figuras 6A-H. La Figura 6 representa la inmunotinción de Gaa en fibroblastos naturales (6C) y con enfermedad de Pompe PM8 (6A y 6F). Esta figura también representa la tinción lisosómica para el marcador lisosómico LAMP-1 en fibroblastos naturales (6D) y con enfermedad de Pompe PM8 (6B y 6E). También se muestra una superposición de la tinción de Gaa y LAMP-1 para fibroblastos naturales (6H) y PM8 (6G).

40 Figuras 7A-F. La Figura 7 representa la tinción inmunofluorescente para Gaa (7B y D) y LAMP-1 (7E) en fibroblastos con enfermedad de Pompe PM9. También se representan superposiciones de tinción de Gaa y LAMP-1 (7A, 7C y 7F).

Figura 8. La Figura 8 representa líneas de células con enfermedad de Pompe PM11 con tinción de Gaa, LAMP-1 y Gaa/LAMP-1 doble que se han tratado con DNJ o NB-DNJ.

### Descripción detallada

45 La presente divulgación describe el rescate de Gaa mutante y el tratamiento de la enfermedad de Pompe, usando el iminoazúcar de molécula pequeña DNJ y derivados de DNJ que tienen sustituciones en el nitrógeno del anillo o el carbono del anillo adyacente al nitrógeno como chaperonas farmacológicas específicas. Estas moléculas se pueden unir a proteínas mutadas de Gaa que son inestables y las inducen a plegarse en una conformación molecular estable. Como resultado, la Gaa avanza o circula hacia el lisosoma y tiene actividad hidrolítica contra glucógeno, reduciendo de ese modo la acumulación patológica en tejidos musculares asociada con esta enfermedad.

## Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se use cada término. Ciertos términos se analizan posteriormente, o en cualquier parte de la memoria descriptiva, para proporcionar directrices adicionales al profesional al describir las composiciones y los métodos de la invención y cómo hacer uso de ellos.

La "enfermedad de Pompe", también denominada deficiencia de maltasa ácida, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSDII, por sus siglas en inglés) y glucogenosis tipo II, es un trastorno del almacenamiento lisosómico genético caracterizado por mutaciones en el gen de Gaa que metaboliza glucógeno. Según se usa en la presente memoria, este término incluye los tipos de enfermedad de comienzo neonatal, infantil y en la edad adulta.

La " $\alpha$ -glucosidasa ácida (Gaa)" es una enzima lisosómica que hidroliza polímeros de D-glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 presentes en el glucógeno, la maltosa y la isomaltosa. Nombres alternativos son como sigue: glucoamilasa; 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolasa; amiloglucosidasa;  $\gamma$ -amilasa; y exo-1,4- $\alpha$ -glucosidasa y  $\gamma$ -amilasa. El gen de Gaa humano se ha cartografiado hasta el cromosoma 17q25,2-25,3 y tiene secuencias de nucleótidos y aminoácidos representadas en el N° de Registro del GenBank Y00839 (representadas en SEQ ID N°: 1 y SEQ ID N°: 2, respectivamente). Más de 70 mutaciones se han asociado con la enfermedad de Pompe. Mutaciones que dan como resultado un mal plegamiento o un mal procesamiento de la enzima Gaa incluyen T1064C (que cambia Leu en la posición 355 por Pro) y C2104T (que sustituye Arg 702 por Cys) (Montalvo y cols., *Mol Genet Metab.* 2004; 81(3): 203-8). Además, Hermans y cols. (*Human Mutation* 2004; 23: 47-56) describen una lista de mutaciones de Gaa que afectan a la maduración y el procesamiento de la enzima. Tales mutaciones incluyen Leu405Pro y Met519Thr. Se espera que el método de la presente invención sea útil para mutaciones que provocan un plegamiento inestable de  $\alpha$ -glucosidasa en el ER.

Según se usa en la presente memoria, el término "chaperona farmacológica" o a veces "chaperona farmacológica específica" ("SPC", por sus siglas en inglés) se refiere a una molécula que se une específicamente a Gaa y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) potenciar la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) potencia la circulación apropiada de la proteína desde el ER hasta otra zona celular, preferiblemente una zona celular natural, es decir, prevenir la degradación de la proteína asociada al ER; (iii) prevenir la agregación de proteínas de conformación inestable, es decir mal plegadas; (iv) restaurar y/o potenciar la función, la estabilidad y/o la actividad natural al menos parcial de la proteína; y/o (v) mejorar el fenotipo o la función de la célula que aloja Gaa. Así, una chaperona farmacológica para Gaa es una molécula que se une a Gaa, dando como resultado un plegamiento, una circulación, una falta de agregación y una actividad de Gaa apropiados. Según se usa en la presente memoria, este término no se refiere a chaperonas endógenas, tales como BiP, o a agentes no específicos que han demostrado una actividad de chaperona no específica contra diversas proteínas, tales como glicerol, DMSO o agua deuterada, es decir, chaperonas químicas (véase Welch y cols., *Cell Stress and Chaperones* 1996; 1(2):109-115; Welch y cols., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1997; 29(5):491-502; la Patente de EE. UU. N° 5.900.360; la Patente de EE. UU. N° 6.270.954 y la Patente de EE. UU. N° 6.541.195). Incluye moléculas de unión específicas, p. ej. chaperonas específicas del sitio activo (ASSC, por sus siglas en inglés), que se unen en el sitio activo de la enzima, inhibidores o antagonistas, y agonistas.

Según se usa en la presente memoria, el término "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con Gaa, específicamente una interacción con residuos de aminoácido de Gaa que participan directamente en la puesta en contacto con la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína elegida, p. ej., Gaa, para ejercer un efecto de chaperona sobre Gaa y no un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los residuos de aminoácido de Gaa que interactúan con cualquier chaperona farmacológica dada pueden estar o no dentro del "sitio activo" de la proteína. Según se describe posteriormente, el hexapéptido conservado WIDMNE en los residuos de aminoácido 512-520 se requiere para la actividad de la proteína Gaa (usando SEQ ID N°:2 como una secuencia de referencia). Además, Trp516 y Asp518 se requieren para la actividad catalítica de Gaa (Hermans y cols., *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 13507-12). La unión específica se puede evaluar a través de ensayos de unión habituales o a través de estudios estructurales, p. ej. cocrystalización, NMR y similares.

En una realización no limitativa, la chaperona farmacológica es un inhibidor o antagonista de Gaa. En otra realización no limitativa, la chaperona farmacológica es un agonista de Gaa. En otra realización más, la chaperona farmacológica es un agonista/antagonista mixto. Según se usa en la presente memoria, el término "antagonista" se refiere a cualquier molécula que se una a una proteína y bloquee, inhiba, reduzca o neutralice bien parcialmente o bien completamente una actividad de Gaa. El término "agonista" se refiere a cualquier molécula que se una a una proteína e incremente, potencie, restaure o imite al menos parcialmente una actividad de Gaa. Según se analiza posteriormente, tales moléculas son conocidas para Gaa.

Según se usa en la presente memoria, los términos "potenciar la estabilidad de conformación de Gaa" o "incrementar la estabilidad de conformación de Gaa" se refieren a incrementar la cantidad o proporción de Gaa que adopta una conformación funcional en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para Gaa, con relación a Gaa en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, p. ej. en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para Gaa. En una realización,

las células no expresan una Gaa mutante de conformación. En otra realización, las células sí expresan un polinucleótido de Gaa mutante que codifica un polipéptido, p. ej. una Gaa mutante de conformación.

Según se usa en la presente memoria, los términos "potenciar la circulación de Gaa" o "incrementar la circulación de Gaa" se refieren a incrementar la eficacia de transporte de Gaa al lisosoma en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para Gaa, con relación a la eficacia de transporte de Gaa en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, p. ej. en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para Gaa.

Según se usa en la presente memoria, los términos "potenciar la actividad de Gaa" o "incrementar la actividad de Gaa" se refieren a incrementar la actividad de Gaa, según se describe en la presente memoria, en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para Gaa, con relación a la actividad de Gaa en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, p. ej. en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para Gaa.

Según se usa en la presente memoria, los términos "potenciar el nivel de Gaa" o "incrementar el nivel de Gaa" se refieren a incrementar el nivel de Gaa en una célula puesta en contacto con una chaperona farmacológica específica para Gaa, con relación al nivel de Gaa en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, p. ej. en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para Gaa.

El término "estabilizar una conformación apropiada" se refiere a la capacidad de una chaperona farmacológica para Gaa para inducir o estabilizar una conformación de una proteína de Gaa mutada que es funcionalmente idéntica a la conformación de la proteína de Gaa natural. El término "funcionalmente idéntica" significa que aunque pueda haber variaciones menores en la conformación (casi todas las proteínas exhiben alguna flexibilidad de conformación en su estado fisiológico), la flexibilidad de conformación no da como resultado (1) agregación de proteínas, (2) eliminación a través de la ruta de degradación asociada al retículo endoplásmico, (3) deterioro de la función proteínica, p. ej., actividad de Gaa, y/o (4) transporte inapropiado dentro de la célula, p. ej., localización en el lisosoma, hasta un grado mayor o menor que el de la proteína natural.

El término "conformación molecular estable" se refiere a una conformación de una proteína, es decir, Gaa, inducida por una chaperona farmacológica, que proporciona la función natural al menos parcial en la célula. Por ejemplo, una conformación molecular estable de una Gaa mutante sería una en la que la Gaa escapara del ER y circulara hasta el lisosoma como para una Gaa natural, en lugar de plegarse mal y degradarse. Además, una conformación molecular estable de una Gaa mutada también puede poseer actividad de Gaa total o parcial, p. ej., hidrólisis de enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 en glucógeno, maltosa e isomaltosa. Sin embargo, no es necesario que la conformación molecular estable tenga todos los atributos funcionales de la proteína natural.

El término "actividad natural" se refiere a la función fisiológica normal de una Gaa en una célula. Por ejemplo, la actividad de Gaa incluye el plegamiento y la circulación desde el ER hasta el lisosoma, con la capacidad concomitante para hidrolizar polímeros de D-glucosa con enlaces  $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6 presentes en glucógeno, maltosa e isomaltosa.

El término "Gaa natural" se refiere a las secuencias nucleotídicas (SEQ ID N° 1) que codifican Gaa y secuencias polipeptídicas (SEQ ID N°: 2) codificadas por las susodichas secuencias nucleotídicas (N° de Registro del Gaa humano del GenBank Y00839, y cualquier otra secuencia nucleotídica que codifique polipéptido de Gaa (que tiene las mismas propiedades funcionales y afinidades de unión que las susodichas secuencias polipeptídicas), tales como variantes alélicas en individuos normales, que tienen la capacidad de alcanzar una conformación funcional en el ER, alcanzar la localización apropiada dentro de la célula y exhibir actividad natural (p. ej., hidrólisis de glucógeno).

Según se usa en la presente memoria, el término " $\alpha$ -glucosidasa mutante" o "Gaa mutante" se refiere a un polipéptido de  $\alpha$ -glucosidasa traducido de un gen que contiene una mutación genética que da como resultado una secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -glucosidasa alterada. En una realización, la mutación da como resultado una proteína de  $\alpha$ -glucosidasa que no alcanza una conformación natural bajo las condiciones normalmente presentes en el ER, cuando se compara con  $\alpha$ -glucosidasa natural, o exhibe una disminución de la estabilidad o actividad en comparación con  $\alpha$ -glucosidasa natural. Este tipo de mutación se denomina en la presente memoria una "mutación de conformación" y la proteína que tiene tal mutación se denomina "mutante de conformación". La incapacidad para alcanzar esta conformación da como resultado que la  $\alpha$ -glucosidasa se degrade o agregue, en lugar de transportarse a través de una ruta normal en el sistema de transporte de proteínas a su emplazamiento natural en la célula o en el ambiente extracelular. En algunas realizaciones, se puede producir una mutación en una parte no codificante del gen que codifica  $\alpha$ -glucosidasa que da como resultado una expresión menos eficaz de la proteína, p. ej., una mutación que afecta a la eficacia de transcripción, la eficacia de corte y empalme, la estabilidad del mRNA y similares. Al potenciar el nivel de expresión de variantes naturales así como mutantes de conformación de  $\alpha$ -glucosidasa, la administración de una chaperona farmacológica de  $\alpha$ -glucosidasa puede mejorar un déficit resultante de tal expresión de proteína ineficaz. Alternativamente, para mutantes de corte y empalme o mutantes de interrupción que se pueden acumular en el ER, la capacidad de la chaperona para unirse a y ayudar a los mutantes en la salida del ER, sin restaurar la actividad de hidrolasa lisosómica, puede ser suficiente para mejorar algunas

patologías celulares en pacientes con enfermedad de Pompe, mejorando de ese modo los síntomas.

5 Mutantes de conformación ejemplares de Gaa incluyen los siguientes: D645E (Lin y cols., *Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi*. 1996;37(2):115-21); D645H (Lin y cols., *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 17;208(2):886-93); R224W, S619R y R660H (New y cols. *Pediatr Neurol*. 2003;29(4):284-7); T1064C y C2104T (Montalvo y cols., *Mol Genet Metab*. 2004;81(3):203-8); D645N y L901Q (Kroos y cols., *Neuromuscul Disord*. 2004;14(6):371-4); G219R, E262K, M408V (Fernández-Hojas y cols., *Neuromuscul Disord*. 2002;12(2):159-66); G309R (Kroos y cols., *Clin Genet*. 1998;53(5):379-82); D645N, G448S, R672W y R672Q (Huie y cols., *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 27;244(3):921-7); P545L (Hermans y cols., *Hum Mol Genet*. 1994;3(12):2213-8); C647W (Huie y cols., Huie y cols., *Hum Mol Genet*. 1994;3(7):1081-7); G643R (Hermans y cols., *Hum Mutat*. 1993;2(4):268-73); M318T (Zhong y cols., *Am J Hum Genet*. 1991;49(3):635-45); E521K (Hermans y cols., *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179(2):919-26); W481R (Raben y cols., *Hum Mutat*. 1999;13(1):83-4); y L552P y G549R (datos no publicados).

Mutantes de corte y empalme incluyen IVS1AS, T>G, -13 y IVS8+1G>A).

15 Se han identificado y se conocen en la técnica mutantes de Gaa adicionales. Los mutantes de conformación son fácilmente identificables por un experto normal en la técnica.

20 Mutaciones que deterioran el plegamiento y, de ahí, la circulación de Gaa, se pueden determinar mediante ensayos habituales conocidos en la técnica, tales como marcaje metabólico con seguimiento pulsátil con y sin tratamiento con glucosidasa para determinar si la proteína entra en el aparato de Golgi, o inmunotinción fluorescente para la localización de Gaa dentro de la célula. Se secreta Gaa natural como un precursor de 110 kD que a continuación se convierte en la Gaa madura de 76 kD a través de un producto intermedio de 95 kD.

Tal funcionalidad se puede probar mediante cualquier medio conocidos para establecer la funcionalidad de tal proteína. Por ejemplo, se pueden usar ensayos que usan sustratos fluorescentes tales como 4- $\alpha$ -metilumbeliferil-D-glucopiranosido para determinar la actividad de Gaa. Tales ensayos son muy conocidos en la técnica (véase, p. ej., Hermans y cols., anteriormente).

25 Ciertas pruebas pueden evaluar atributos de una proteína que pueden corresponder o no a su actividad in vivo real, pero sin embargo son sustitutos apropiados de funcionalidad proteínica, y el comportamiento natural en tales pruebas demuestra evidencia para apoyar el rescate del plegamiento de la proteína o las técnicas de potenciación de la invención. Una actividad tal según la invención es el transporte apropiado de una Gaa funcional desde el retículo endoplásmico hasta el lisosoma.

30 In vitro, p. ej., en una formulación, el compuesto de chaperona también puede asegurar que una proteína natural o mutada se pueda mantener en su forma natural o apropiada. Este efecto se puede manifestar prácticamente a través de uno o más de (i) incremento del tiempo de conservación de la proteína (es decir, para ERT); (ii) actividad superior por unidad/cantidad de proteína; o (iii) mayor eficacia in vivo. Se puede observar experimentalmente a través de un incremento del rendimiento desde el ER durante la expresión; mayor resistencia al despliegue debido a incrementos de la temperatura, o la presencia de agentes caotrópicos, y por medios similares.

35 Los términos "expresión endógena" y "endógenamente expresado" se refieren a la expresión fisiológica normal de Gaa en células en un individuo que no tiene o se sospecha que tenga una enfermedad o trastorno asociados con deficiencia, sobreexpresión u otro defecto de Gaa, p. ej., la enfermedad de Pompe, tal como una mutación en la secuencia de ácido nucleico o polipéptido de Gaa que inhibe su expresión, actividad o estabilidad. Este término también se refiere a la expresión de Gaa en tipos de células en los que es normal que se exprese la Gaa y no incluye la expresión en células o tipos de células, p. ej., tumores, en los que no se expresa Gaa en individuos sanos

Según se usa en la presente memoria, el término "eficacia de transporte" se refiere a la capacidad de una proteína mutante para ser transportada fuera del retículo endoplásmico hasta su localización natural dentro de la célula, la membrana celular o en el ambiente extracelular.

45 Un "inhibidor competitivo" de una enzima se puede referir a un compuesto que se asemeja estructuralmente a la estructura química y la geometría molecular del sustrato para unirse a la enzima aproximadamente en la misma localización del sustrato. Así, el inhibidor compite por el mismo sitio activo que la molécula de sustrato, incrementando así la Km. Habitualmente, la inhibición competitiva es reversible si están disponibles suficientes moléculas de sustrato para desplazar al inhibidor, es decir, los inhibidores competitivos se pueden unir reversiblemente. Por lo tanto, la cantidad de inhibición de enzima depende de la concentración de inhibidor, la concentración de sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el sitio activo.

50 La inhibición competitiva no clásica se produce cuando el inhibidor se une remotamente al sitio activo, creando un cambio de conformación en la enzima de modo que el sustrato ya no se pueda unir a ella. En la inhibición competitiva no clásica, la unión del sustrato en el sitio activo impide la unión del inhibidor en un sitio separado y viceversa. Esto incluye la inhibición alostérica.

Un "inhibidor de tipo mixto lineal" de una enzima es un tipo de inhibidor competitivo que permite que el sustrato se

una, pero reduce su afinidad, de modo que la Km se incremente y la Vmáx se disminuya.

Un "inhibidor no competitivo" se refiere a un compuesto que forma uniones fuertes con una enzima y puede no ser desplazado por la adición de sustrato en exceso, es decir, los inhibidores no competitivos pueden ser irreversibles. Un inhibidor no competitivo se puede unir en, cerca de o lejos del sitio activo de una enzima o proteína, y en conexión con enzimas no tiene efecto sobre la Km pero disminuye la Vmáx. Inhibición no competitiva se refiere a una situación en la que el inhibidor se une solamente al complejo enzima-sustrato (ES). La enzima se vuelve inactiva cuando se une el inhibidor. Esto difiere de los inhibidores competitivos no clásicos que se pueden unir a la enzima en ausencia de sustrato.

El término "Vmáx" se refiere a la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por enzima, es decir, a niveles de sustrato saturantes. El término "Km" es la concentración de sustrato requerida para alcanzar ½ de Vmáx.

Un "potenciador" de enzima es un compuesto que se une a Gaa e incrementa la velocidad de la reacción enzimática.

Los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad suficiente para potenciar el procesamiento de proteínas en el ER (permitiendo una conformación funcional), sin inhibir la proteína ya expresada en la localización celular apropiada (en el caso de un antagonista), o sin inducir la internalización del receptor mediada por ligando de la proteína desde la localización celular apropiada (en el caso de un agonista), y potencian la actividad de la proteína elegida, dando como resultado así una respuesta terapéutica en un sujeto. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (p. ej., un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, incluyendo síntomas descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica y cualesquiera marcadores clínicos sustitutos. Así, una respuesta terapéutica será generalmente una mejora o inhibición de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, p. ej., la enfermedad de Pompe, tales como los conocidos en la técnica para la enfermedad o el trastorno, p. ej., disminución de la actividad de Gaa y debilidad muscular progresiva.

Se debe apuntar que una concentración del compuesto de chaperona que sea inhibidora durante la producción, el transporte o el almacenamiento in vitro de la proteína terapéutica purificada puede constituir todavía una "cantidad eficaz" para los propósitos de esta invención debido a la dilución (y el desplazamiento consiguiente en la unión debido al cambio en el equilibrio), la biodisponibilidad y el metabolismo de la chaperona durante la administración in vivo.

Un "paciente que responde" es un individuo diagnosticado con enfermedad de Pompe y tratado según el método actualmente reivindicado que exhibe un alivio, una mejora o una prevención de uno o más síntomas clínicos, o un alivio o una inversión de uno o más marcadores clínicos sustitutos que son indicadores de la patología de la enfermedad. Síntomas o marcadores de la enfermedad de Pompe incluyen, pero no se limitan a, disminución de la actividad tisular de Gaa; cardiomiopatía; cardiomegalia; deterioro muscular progresivo, especialmente en el tronco o los miembros inferiores; hipotonía profunda; macroglosia (y en algunos casos, protrusión de la lengua); dificultad para tragar, chupar y/o comer; insuficiencia respiratoria; hepatomegalia (moderada); laxitud de los músculos faciales; areflexia; intolerancia al ejercicio; disnea por esfuerzo; ortopnea; apnea del sueño; cefaleas matinales; somnolencia; lordosis y/o escoliosis; disminución de los reflejos osteotendinosos; lumbalgia; e incumplimiento de los progresos motores del desarrollo.

El término "terapia enzimática restitutiva" o "ERT" se refiere a la introducción de una enzima purificada no natural en un individuo que tiene una deficiencia de tal enzima. La proteína administrada se puede obtener de fuentes naturales o mediante expresión recombinante (según se describe con mayor detalle posteriormente). El término también se refiere a la introducción de una enzima purificada en un individuo que requiere o se beneficia de otro modo de la administración de una enzima purificada, p. ej., que sufre insuficiencia de la enzima. La enzima introducida puede ser una enzima recombinante purificada producida in vitro, o una proteína purificada de tejido o fluido aislado, tal como, p. ej., placenta o leche de animal, o de plantas.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, según se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o uno estatal o listado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. Se emplean preferiblemente como portadores agua o soluciones salinas acuosa y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin, 18ª Edición, u otras ediciones.

El término "purificado", según se usa en la presente memoria, se refiere a material, tal como un ácido nucleico o polipéptido de Gaa, que se ha aislado bajo condiciones que reducen o eliminan materiales no relacionados, es decir, contaminantes. Por ejemplo, una proteína purificada preferiblemente está sustancialmente libre de otras proteínas o



ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula. Según se usa en la presente memoria, el término "sustancialmente libre" se usa operativamente, en el contexto de la prueba analítica del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es puro al menos al 50%; más preferiblemente, puro al menos al 90% y, más preferiblemente aún, puro al menos al 99%. La pureza se puede evaluar por medios convencionales, p. ej., cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las medidas. Grados de error ejemplares típicos están dentro de 20 por ciento (%), preferiblemente dentro de 10% y más preferiblemente dentro de 5% de un valor o intervalo de valores dado. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente memoria son aproximadas a menos que se indique otra cosa, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se pueden inferir cuando no se indican expresamente.

### Definiciones químicas

El término 'alquilo' se refiere a un grupo hidrocarbonado C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> lineal o ramificado que consiste solamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, y que está ligado al resto de la molécula por un enlace sencillo, p. ej., metilo, etilo, *n*-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), *n*-butilo, *n*-pentilo, 1,1-dimetiletilo (*t*-butilo). Los alquilos usados en la presente memoria son preferiblemente alquilos C<sub>1</sub> - C<sub>8</sub>.

El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado alifático C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que puede ser una cadena lineal o ramificada, p. ej., etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), isopropenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo.

El término "cicloalquilo" indica un sistema anular hidrocarbonado mono- o multicíclico no aromático insaturado tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo. Ejemplos de grupos cicloalquilo multicíclicos incluyen grupos perhidronaftilo, adamantilo y norbornilo, un grupo cíclico puenteado o grupos espiribicíclicos, p. ej., espiro(4,4)non-2-ilo.

El término "cicloalcalquilo" se refiere a un cicloalquilo según se define anteriormente ligado directamente a un grupo alquilo según se define anteriormente, que da como resultado la creación de una estructura estable tal como ciclopropilmetilo, ciclobutiletilo, ciclopentiletilo.

El término "éter alquílico" se refiere a un grupo alquilo o un grupo cicloalquilo como el definido anteriormente que tiene al menos un oxígeno incorporado en la cadena alquílica, p. ej., metil-etil-éter, éter dietílico, tetrahydrofurano.

El término "alquilamina" se refiere a un grupo alquilo o un grupo cicloalquilo como el definido anteriormente que tiene al menos un átomo de nitrógeno, p. ej., *n*-butilamina y tetrahydrooxacina.

El término "arilo" se refiere a radicales aromáticos que tienen en el intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono tales como fenilo, naftilo, tetrahydronaftilo, indanilo, bifenilo.

El término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo como el definido anteriormente unido directamente a un grupo alquilo como el definido anteriormente, p. ej., -CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> y -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>.

El término "heterocíclico" se refiere a un radical anular de 3 a 15 miembros estable que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. Para los propósitos de esta invención, el radical anular heterocíclico puede ser un sistema anular monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas anulares condensados, puenteados o tipo espiro, y los átomos de nitrógeno, fósforo, carbono, oxígeno o azufre del radical anular heterocíclico pueden estar opcionalmente oxidados hasta diversos estados de oxidación. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical anular puede estar parcialmente o totalmente saturado (es decir, heteroaromático o heteroaril aromático). Ejemplos de tales radicales anulares heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, acetidinilo, acridinilo, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofuranilo, carbazolilo, cinolinilo, dioxolanilo, indolicinilo, naftiridinilo, perhidroacepinilo, fenacinilo, fenotiacinilo, fenoxacinilo, ftalacinilo, piridilo, pteridinilo, purinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrazolilo, imidazolilo, tetrahydroisoquinolilo, piperidinilo, piperacinilo, 2-oxopiperacinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, 2-oxoacepinilo, acepinilo, pirrolilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, piracinilo, pirimidinilo, piridacinilo, oxazolilo, oxazolinilo, oxasolidinilo, triazolilo, indanilo, isoxazolilo, isoxasolidinilo, morfolinilo, tiazolilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, isotiazolilo, quinuclidinilo, isotiazolidinilo, indolilo, isoindolilo, indolinilo, isoindolinilo, octahydroindolilo, octahydroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, decahydroisoquinolilo, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopiranilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, furilo, tetrahydrofurilo, tetrahydropiranilo, tienilo, benzotienilo, tiamorfolinilo, tiamorfolinilsulfóxido, tiamorfolinilsulfona, dioxafosfolanilo, oxadiazolilo, cromanilo, isocromanilo.

El radical anular heterocíclico puede estar ligado a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de

carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heteroarilo" se refiere a un anillo heterocíclico en el que el anillo es aromático.

El término "heteroarilalquilo" se refiere a un radical anular heteroarílico como el definido anteriormente unido directamente a un grupo alquilo. El radical heteroarilalquilo puede estar ligado a la estructura principal en cualquier átomo de carbono del grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heterociclilo" se refiere a un radical anular heterociclilo como el definido anteriormente. El radical anular heterociclilo puede estar ligado a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable.

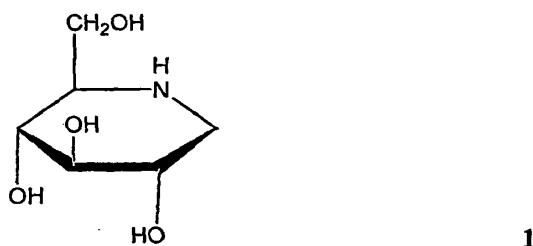
El término "heterociclilalquilo" se refiere a un radical anular heterociclilo como el definido anteriormente unido directamente a un grupo alquilo. El radical heterociclilalquilo puede estar ligado a la estructura principal en un átomo de carbono del grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable.

Los sustituyentes en el 'alquilo sustituido', 'alquenilo sustituido', 'alquinilo sustituido', 'cicloalquilo sustituido', 'cicloalcalquilo sustituido', 'cicloalquenilo sustituido', 'arilalquilo sustituido', 'arilo sustituido', 'anillo heterocíclico sustituido', 'anillo heteroarilo sustituido', 'heteroarilalquilo sustituido' o 'anillo heterociclilalquílico sustituido' pueden ser iguales o diferentes con uno o más seleccionados de los grupos hidrógeno, hidroxilo, halógeno, carboxilo, ciano, amino, nitro, oxo (=O), tio (=S), o grupos opcionalmente sustituidos seleccionados de alquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, anillo heterocíclico, -COOR<sup>x</sup>, -C(O)R<sup>x</sup>, -C(S)R<sup>x</sup>, -C(O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -C(O)ONR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>CONR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -N(R<sup>x</sup>)SOR<sup>y</sup>, -N(R<sup>x</sup>)SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -(=N-N(R<sup>x</sup>)R<sup>y</sup>), -NR<sup>x</sup>C(O)OR<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(S)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(S)NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -SONR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>2</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -OR<sup>x</sup>, -OR<sup>x</sup>C(O)NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -OR<sup>x</sup>C(O)OR<sup>y</sup>, -OC(O)R<sup>x</sup>, -OC(O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -R<sup>x</sup>NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>R<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>CF<sub>3</sub>, -R<sup>x</sup>NR<sup>y</sup>C(O)R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>OR<sup>y</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)OR<sup>y</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)NR<sup>y</sup>R<sup>z</sup>, -R<sup>x</sup>C(O)R<sup>x</sup>, -R<sup>x</sup>OC(O)R<sup>y</sup>, -SR<sup>x</sup>, -SOR<sup>x</sup>, -SO<sub>2</sub>R<sup>x</sup>, -ONO<sub>2</sub>, en donde R<sup>x</sup>, R<sup>y</sup> y R<sup>z</sup> en cada uno de los grupos anteriores pueden ser un átomo de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalcalquilo sustituido o no sustituido, un anillo heterocíclico sustituido o no sustituido, heterociclilalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o heteroarilalquilo sustituido o no sustituido.

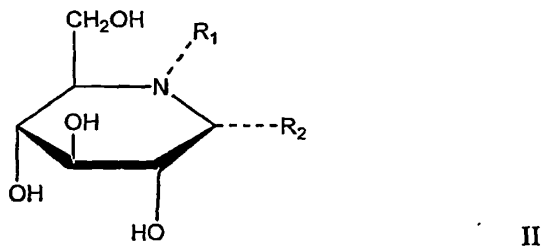
El término "halógeno" se refiere a radicales de flúor, cloro, bromo y yodo.

#### DNJ y derivados de DNJ

Se ha encontrado que los derivados de 1-desoxojirimicina (Compuesto **1**, DNJ; 1,5-imino-1,5-didesoxi-D-glucitol-CAS No. 19130-96-2) son útiles para tratar la enfermedad de Pompe. La DNJ tiene la fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub> y un peso molecular de 163,2. La DNJ se describe en la patente de EE. UU. 4.806.650 de Schroder y cols. y tiene la siguiente estructura:



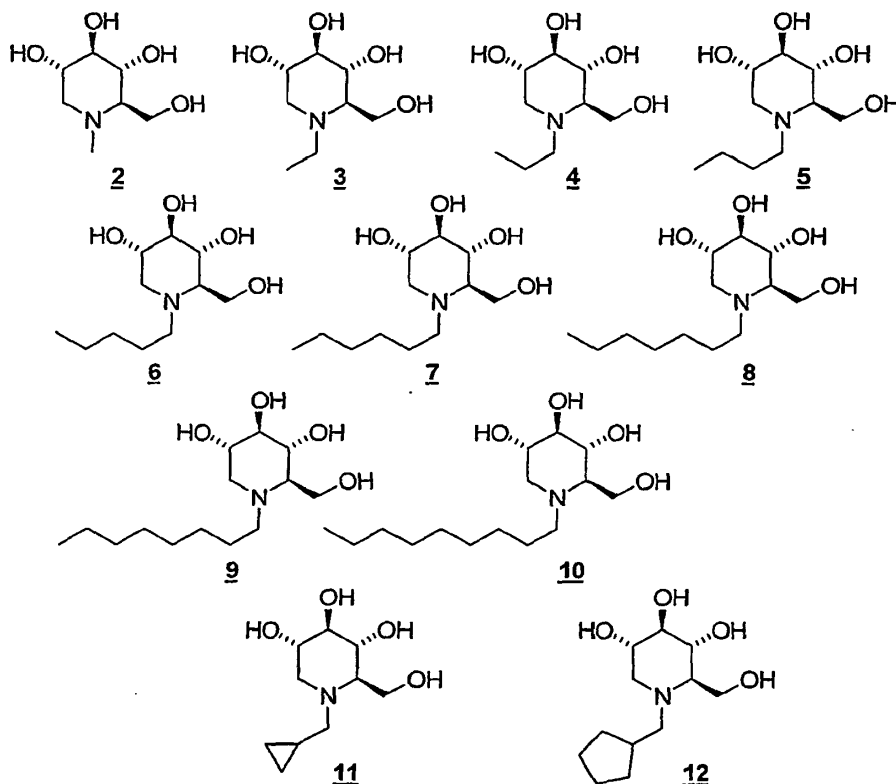
Los derivados de DNJ útiles en la presente divulgación se pueden describir mediante la fórmula:



donde R<sub>1</sub> es H o un alquilo, alquenilo, éter alquílico o alquilamina lineal o ramificado que contiene 1 -12 átomos de carbono, alquilarilo, heteroarilo o heteroarilalquilo que contiene 5 - 12 átomos de anillo, donde R<sub>1</sub> está opcionalmente sustituido con uno o más -OH, -COOH, -Cl, -F, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, -C(=O)N-(alquilo)<sub>2</sub> (es decir, -O-C(=O)N-(Me)<sub>2</sub>) y R<sub>2</sub> es H; un alquilo, cicloalquilo, alquenilo o éter alquílico lineal o ramificado que contiene 1 - 9 átomos de carbono o arilo que contiene 5 - 12 átomos de carbono, en donde R<sub>2</sub> está opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub> o un anillo heterocíclico.

Al menos uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> no es H.

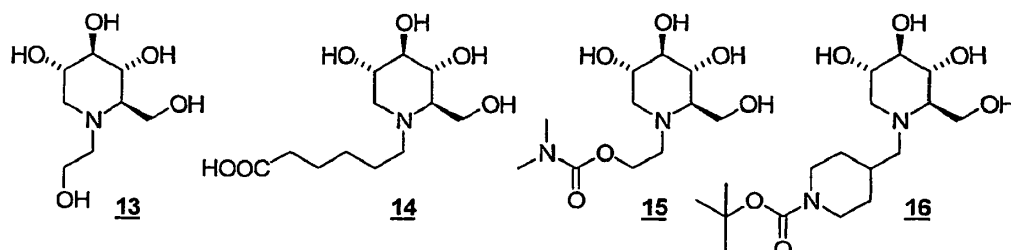
Derivados de DNJ preferidos incluyen derivados alquilados en N que tienen 1 - 12 átomos de carbono. Más preferiblemente, estos derivados son compuestos de cadena lineal, ramificados o cíclicos que tienen 1 - 9 átomos de carbono. Compuestos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, N-metil-DNJ (2), N-etil-DNJ (3), N-propil-DNJ (4), N-butil-DNJ (5), N-pentil-DNJ (6), N-hexil-DNJ (7), N-heptil-DNJ (8), N-octil-DNJ (9), N-nonil-DNJ (10), N-metilciclopropil-DNJ (11) y N-metilciclopentil-DNJ (12).



Un derivado de alquil-DNJ preferido es la N-metil-1-desoxinojiramicina (Compuesto 2, N-metil-DNJ; N-metilmoranolina, 1,5-(metilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol) que es un análogo de glucosa sintético que está disponible comercialmente de Toronto Research Chemicals, Número Cat. M297000, CAS 69567-1-08. La N-metil-DNJ reduce la velocidad glucogenolítica al inhibir la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa de enzima desramificadora de glucógeno en el hígado, y posee una acción antihiper glucémica al bloquear la  $\alpha$ -1,4-glucosidasa (Arai M y cols., *Circulation*. 7 de abril de 1998; 97(13):1290-7).

Otro derivado de alquil-DNJ preferido es la N-nonil-desoxinojiramicina (Compuesto 10, N-nonil-DNJ; 1,5-(nonilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol), un análogo de glucosa sintético que es útil para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher (una enfermedad del almacenamiento lisosómico caracterizada por la acumulación de glucolípidos). (Sawkar AR, y cols., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 26:99(24):15428-33).

Los derivados de alquil-DNJ que tienen un sustituyente tal como un -OH, -COOH, o OCF<sub>3</sub> también son compuestos preferidos. Derivados de alquil-DNJ sustituidos ejemplares incluyen, pero no se limitan a:

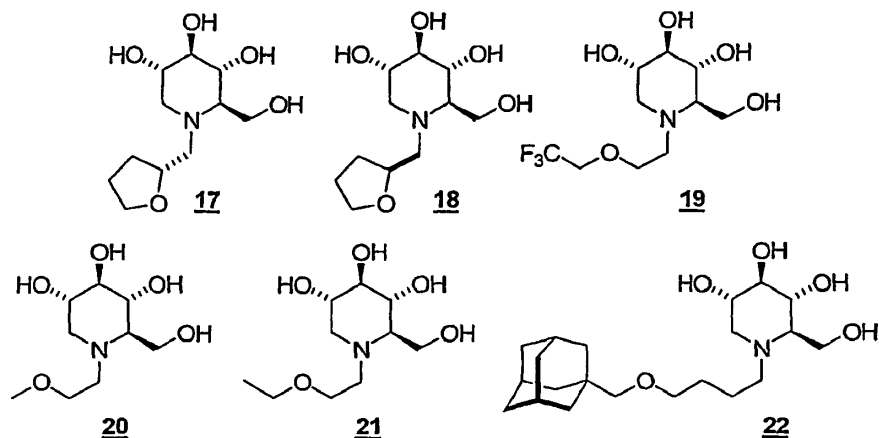


Un derivado de DNJ preferido es la N-2-hidroxi-etil-desoxinojiramicina (Compuesto 13, N-etoxi-DNJ; 1,5-(2-hidroxi-etilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol; miglitol), un análogo de glucosa sintético usado para tratar la diabetes mellitus tipo 2. Drent y cols., *Diabetes Nutr Metab*. 2002;15(3):152-9; de Luis Roman DA, *Rev Clin Esp*. enero 2004; 204(1):32-4.

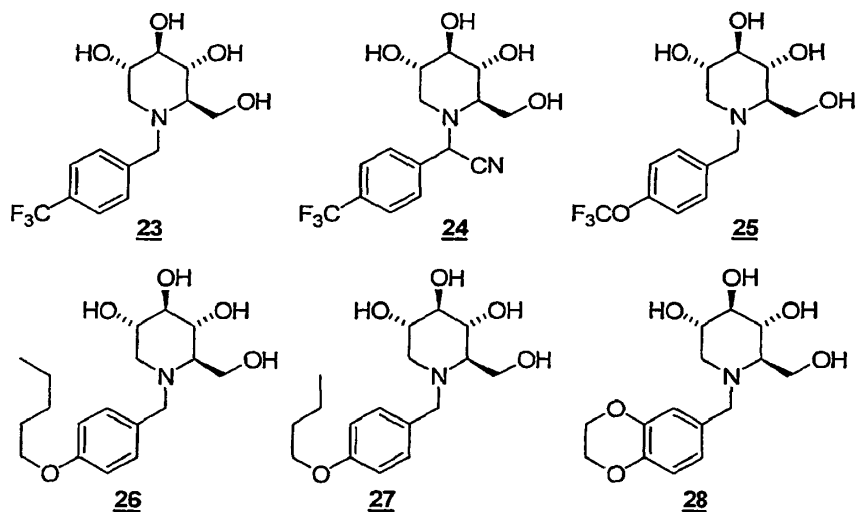
Otro derivado de DNJ preferido es la 5-N-carboxipentildesoxinojirimicina (Compuesto **14**, 5-N-carboxipentil-DNJ; 1,5-(5-N-carboxipentilimino)-1,5-didesoxi-D-glucitol). Este análogo de glucosa sintético se puede sintetizar mediante la ruta descrita por Bernotas RC, y cols., *Biochem J.* 1 de sep. 1990;270(2):539-40.

Derivados de DNJ adicionales son derivados de éter alquílico tales como los compuestos:

5

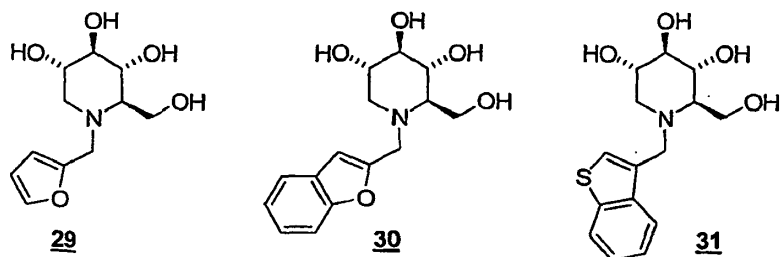


Otros compuestos preferidos incluyen derivados tales como los derivados de DNJ sustituidos con bencilo en N representados por la fórmula:



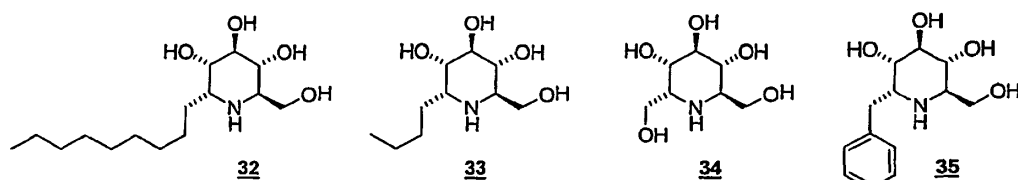
10

Otros compuestos preferidos incluyen derivados tales como los derivados de DNJ sustituidos con CH<sub>2</sub>-Ar en N representados por la fórmula, en la que Ar es un heterociclo aromático:

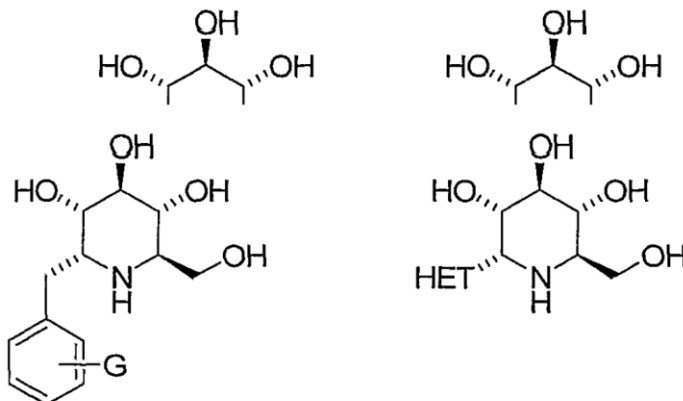


15

Además de los derivados de DNJ sustituidos en el nitrógeno, también son compuestos preferidos de la presente divulgación derivados de DNJ que tienen un sustituyente pegado al carbono C-1 adyacente al nitrógeno del anillo. Estos compuestos incluyen, pero no se limitan a:



Donde los análogos hidrocarbonados de cadena lineal incluyen, pero no se limitan a, 1-12 átomos de carbono y R incluye, pero no se limita a: alquilo ramificado, cicloalquilo, o alquilo opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -CF<sub>3</sub>, -OCF<sub>3</sub>, NHR, NHCOR' o un anillo aromático o heterocíclico, en donde R' es un grupo alquilo.



5

donde HET es grupo heterocíclico tal como tetrahidrofurano, piridina, furano, pirrol, imidazol, triazol, tetrazol, oxazol, tiazol y los análogos benzoicos adjuntos, etc., Ar es un fenilo o fenilo sustituido. Los sustituyentes fenilo pueden consistir en G que es un grupo funcional (p. ej., CH<sub>3</sub>, Cl, F o CH<sub>2</sub>-O-CF<sub>3</sub>) y n es un número entero entre 0 y 5.

#### Síntesis de derivados de DNJ

10 Los compuestos que tienen una sustitución en R<sub>1</sub> se pueden sintetizar a partir de DNJ como se describe en: EP 49858, WO2005/063706, U.S. 4.639.436; WO 2004/037373; WO 95/22975; U.S. 5.399.567; US 5.310.745; Bols y cols., *Journal of Carbohydrate Chemistry* 2004 23(4), 223-238, Sawker y cols., *Chemistry and Biology*, 2005; 12, 1235-1244, Overkleef, *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 273(41), 26522-26527; Tan y cols., *Journal of Biological Chemistry*. 1991, 266(22), 14504-14510; Romaniouk y cols., *Glycobiology*. 2004; 14(4), 301-310; Lesur, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 1997; 7(3), 355-360; Yoshikuni, *Agric. Biol. Chem* 1998; 52(1), 121), y mediante modificaciones conocidas de estos métodos.

20 Los compuestos que tienen una sustitución en R<sub>2</sub> se pueden sintetizar a partir de DNJ como se describe en: Anzeveno, y cols., *J. Org. Chem.* 1989; 54(11), 2539; WO 00/56713; US 4.880.917; EP 0315017 y US 5.051.407, y por Boshagen y cols, *Angewante Chemie*, Int. Ed. Engl. 1981; 20(9), 806-807, y por métodos adicionales que se han presentado, y modificaciones conocidas de estos métodos se muestran en WO00/56713, US 5.051.407 y EP 0315017. Otro enfoque para la síntesis de estas moléculas ha sido presentado por Davis en *Angewante Chemie*, Int. Ed. Engl.2003; 42, 3788-3792.

25 Los compuestos de la presente divulgación también se pueden sintetizar a partir de una tetra-Obn-gluconolactona. Esta síntesis se puede adaptar a partir de la síntesis descrita en: Perrine y cols., *J. Org. Chem.* 1967; 32, 664; Matos, Lopes & Lopes, *Synthesis* 1999; 4, 571; Rao & Perlin; *Can. J. Chem.* 1981; 59, 333; Hoos, Naughton y Vassella, *Helv. Chim. Acta*, 1993; 76, 1802, y Baxter & Reitz, *J. Org. Chem.*1994; 59, 3175.

También se puede usar un enfoque semisintético para formar los derivados de DNJ. Esta ruta enzimática usa *Gluconobacter Oxidans*, y se puede adaptar de los métodos descritos en: los documentos US 4.266.025; US 5.695.969; US 4.246.345; US 4.806.650; 0430307; y Kinast & Schedel; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20, 805 (1981).

30 Algunos compuestos se pueden adquirir, por ejemplo, los siguientes compuestos se adquirieron de Toronto Research Chemicals: 1-desoxinojirimicina (Nº Cat. D245000), hidrocloreuro de 1-desoxinojirimicina (Nº Cat. D245005), N-butil-1-desoxinojirimicina (Nº Cat. B691000, CAS[21011-90-0]), miglitol (Nº Cat. M344200, CAS[72432-03-2]), N-metil-1-desoxinojirimicina (Nº Cat. 297000, CAS[69567-1-8]), N-5-carboxipentil-1-desoxinojirimicina (Nº Cat. C181200), N-(5-adamantan-1-il-metoxi)-pentil-1-desoxinojirimicina (Nº Cat. A21000); la  $\alpha$ -homonojirimicina se adquirió de TCI America (Nº Cat. H1144, CAS 119557-99-2).

35 Una lista no limitativa de los compuestos que se pueden usar en la presente divulgación incluye: DNJ, N-butil-DNJ, N-(ciclopropil)metil-DNJ, N-2-(tetrahidrofuran)metil-DNJ, éter trifluoroetílico de N-2-oxoetil-DNJ / N-(2-(2,2,2-

- trifluoroetoxi)etil-DNJ, dimetilcarbamato de N-etiloxi-DNJ / N-(2-(N,N-dimetilamido)etiloxi)-DNJ, N-metil-DNJ, 2-metoxietil-DNJ, 2-etoxietil-DNJ, 4-trifluorometil-bencil-DNJ,  $\alpha$ -ciano-4-trifluorometil-bencil-DNJ, 4-pentoxibencil-DNJ, 4-butoxibencil-DNJ, 4-t-BOC-piperidinilmetil-DNJ,  $\alpha$ -C6-n-nonil-DNJ y  $\alpha$ -homo-DNJ. El porcentaje de potenciación relativo a DNJ 1 mM en el que se observa la mitad de la potenciación máxima se da para estos compuestos en las Tablas 1 y 2 posteriores (Ejemplo 2).
- Compuestos adicionales contemplados para el uso incluyen N-nonil-DNJ (10); miglitol (13); N-5-carboxipentil-1-DNJ (14); metil-2-benzofuranil-DNJ (30); metil-2-benzotiafenil-DNJ (31);  $\alpha$ -C6-n-butyl-DNJ (33); metil-2-furanil-DNJ (29); N-n-hexil-DNJ (7); N-etil-DNJ (3); N-n-propil-DNJ (4); N-n-pentil-DNJ (6); y  $\beta$ -C6-bencil-DNJ (36); 2-(N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-metilamino)etil)-DNJ (28); y N-2-(N-metil-N-metilendioxifenilamino)etil-DNJ (37).
- 10 Ensayos de actividad y localización
- La actividad, la estabilidad y/o la circulación potenciadas de Gaa se pueden determinar al medir un incremento en el polipéptido de Gaa celular, al determinar un incremento en la circulación al lisosoma, p. ej., o al determinar la actividad o estabilidad incrementada de Gaa. Métodos ejemplares no limitativos para evaluar cada uno de los precedentes se describen posteriormente.
- 15 Determinación de la expresión intracelular de Gaa. Se conocen en la técnica métodos para determinar los niveles de proteína de IL-DNJ intracelulares. Tales métodos incluyen inmunotransferencia, inmunoprecipitación seguida por inmunotransferencia (IP Western) o inmunofluorescencia usando una proteína de IL-DNJ marcada.
- 20 Determinación de la circulación de Gaa. La evaluación de la circulación de proteínas a través de la ruta biosintética se puede conseguir, p. ej., usando experimentos de seguimiento pulsátil con proteína receptora marcada con  $^{35}\text{S}$ , junto con glucosidasas; o, preferiblemente, mediante inmunofluorescencia indirecta o directa para determinar la modificación de la proteína durante la circulación. Estos y otros métodos se describen, por ejemplo, en *Current Protocols in Cell Biology* 2001; John Wiley & Sons. Experimentos de inmunofluorescencia ejemplares para detectar la circulación lisosómica de Gaa se describen con detalle en los Ejemplos 3 y 4 posteriormente.
- 25 Otros métodos para detectar la circulación deteriorada de proteínas son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, para proteínas que se glucosilan en N y/u O en el aparato de Golgi, se puede usar marcaje metabólico con seguimiento pulsátil usando proteínas marcadas radiactivamente, combinado con tratamiento con glucosidasa e inmunoprecipitación, para detectar si las proteínas están sufriendo glucosilación completa en el aparato de Golgi, o si están siendo retenidas en el ER en lugar de circular hasta el aparato de Golgi para una glucosilación adicional.
- 30 Métodos sensibles para detectar visualmente la localización celular también incluyen microscopía fluorescente usando proteínas fluorescentes o anticuerpos fluorescentes. Por ejemplo, las proteínas de IL-DNJ de interés se pueden etiquetar con, p. ej., proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla y proteína fluorescente roja, seguido por microscopía multicolor y de baja frecuencia y microscopía electrónica para estudiar el destino de esta proteína en células fijadas y en células vivas. Para una revisión del uso de obtención de imágenes fluorescentes en la circulación de proteína, véase Watson y cols., *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(1):43-61. Para una descripción del uso de microscopía confocal para la colocalización intracelular de proteínas, véase Miyashita y cols., *Methods Mol Biol.* 2004; 261:399-410.
- 35 La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS, por sus siglas en inglés) es un método de detección ultrasensible y no invasivo capaz de resolución monomolecular y en tiempo real (Vukojevic y cols., *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(5): 535-50). La SPFI (obtención de imágenes de fluorescencia de una sola partícula, por sus siglas en inglés) usa la alta sensibilidad de fluorescencia para visualizar moléculas individuales que se han marcado selectivamente con partículas fluorescentes pequeñas (Cherry y cols., *Biochem Soc Trans* 2003; 31(Pt 5): 1028-31). Para una revisión de la obtención de imágenes de células vivas, véase Hariguchi, *Cell Struct Funct* 2002; 27(5):333-4).
- 40 También se usa la microscopía de transferencia energética por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés) para estudiar la estructura y la localización de proteínas bajo condiciones fisiológicas (Periasamy, *J Biomed Opt* 2001; 6(3): 287-91).
- 45 Determinación de un incremento en la actividad de Gaa. In vitro, la actividad de Gaa se puede determinar como se describe posteriormente en el Ejemplo 2. La actividad de Gaa se puede determinar in vivo siguiendo el tratamiento con chaperonas farmacológicas usando linfocitos mixtos como se describe en Okumiya y cols., *Mol Genet Metab.* mayo 2006;88(1):22-8. El método emplea glucógeno y 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -d-glucopiranosido (4MU- $\alpha$ Glc) como sustratos para medir la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosómica, e incorpora acarbosa para eliminar la interferencia de  $\alpha$ -glucosidasas no relacionadas (predominantemente maltasa-glucoamilasa).
- Formulación, dosificación y administración
- 55 En una realización, el compuesto de chaperona se administra como monoterapia, preferiblemente en una forma de dosificación oral (descrita adicionalmente posteriormente), aunque se contemplan otras formas de dosificación. En esta realización, se contempla que el régimen de dosificación debe ser uno que proporcione un nivel estacionario

constante de compuesto en el plasma del paciente con enfermedad de Pompe. Esto se puede obtener bien mediante la administración diaria en dosis divididas, o formulaciones de liberación controlada, o bien mediante la administración menos frecuente de formas de liberación sostenida. Formulaciones, dosificaciones y vías de administración para el compuesto de chaperona se detallan posteriormente.

## 5 Formulaciones

En una realización, el compuesto de chaperona se administra como monoterapia, y puede estar en una forma adecuada para cualquier vía de administración, incluyendo, p. ej., oralmente en forma de comprimidos o cápsulas o líquido, en solución acuosa estéril para inyección o en un polvo liofilizado seco para añadir a la formulación de la Gaa reconstitutiva (véase posteriormente) durante o inmediatamente después de la reconstitución para evitar la degradación de la enzima in vitro antes de la administración.

Cuando el compuesto de chaperona se formula para la administración oral, los comprimidos o las cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato cálcico); lubricantes (p. ej., estearato magnésico, talco o sílice); desintegrantes (p. ej., almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico). Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos muy conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para la constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tamponadoras, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes según sea apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada del compuesto de chaperona activo.

ZAVESCA<sup>®</sup>, un compuesto de chaperona contemplado para el uso en el método de la presente invención, está disponible comercialmente como cápsulas de gelatina dura, que contiene cada una 100 mg de DNJ, almidón glicolato sódico, povidona (K30) y estearato magnésico. La envuelta de las cápsulas incluye gelatina y dióxido de titanio.

Las formulaciones farmacéuticas del compuesto de chaperona adecuado para uso parenteral/inyectable incluyen generalmente soluciones acuosas estériles (si son solubles en agua), o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será razonable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar la Gaa purificada y el compuesto de chaperona en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por filtración o esterilización terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectable estériles, los métodos de preparación preferidos son secado a vacío y la técnica de liofilización que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la solución del mismo previamente filtrada estérilmente.

La formulación puede contener un excipiente. Excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en la formulación son tampones tales como tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tales como albúmina sérica, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA y cloruro sódico; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (p. ej., PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Sistemas tamponadores para el uso con las formulaciones incluyen tampones de citrato, acetato, bicarbonato y fosfato. Un tampón de fosfato es una realización preferida.

La formulación también puede contener un detergente no iónico. Detergentes no iónicos preferidos incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, octil[ $\alpha$ ]-glucósido, octil[ $\beta$ ]-glucósido, Brij 35, Pluronic y Tween 20.

#### Administración

- 5 La vía de administración del compuesto de chaperona puede ser oral (preferiblemente) o parenteral, incluyendo intravenosa, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradérmica, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracistenal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosa, transdérmica o a través de inhalación.

- 10 La administración de las formulaciones parenterales del compuesto de chaperona descritas anteriormente puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la preparación, o se pueden administrar por administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (p. ej., una bolsa i.v.) o interno (p. ej., un implante bioerosionable). Véanse, p. ej., las Pat. EE. UU. N° 4.407.957 y 5.798.113. Métodos y aparatos de aporte intrapulmonar se describen, por ejemplo, en las Pat. EE. UU. N° 5.654.007, 5.780.014 y 5.814.607. Otros sistemas parenterales útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, aporte con bomba, aporte de células encapsuladas, aporte liposómico, inyección con aguja, inyección sin aguja, un nebulizador, un aerosolizador, electroporación y un parche transdérmico. Dispositivos de inyección sin aguja se describen en las Pat. EE. UU. N° 5.879.327, 5.520.639, 5.846.233 y 5.704.911. Cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente se puede administrar usando estos métodos.

- 15 Las inyecciones subcutáneas tienen las ventajas de permitir la autoadministración, mientras que también dan como resultado una semivida plasmática prolongada en comparación con la administración intravenosa. Por otra parte, una variedad de dispositivos diseñados para la comodidad del paciente, tales como plumas de inyección rellenables y dispositivos de inyección sin aguja, se pueden usar con las formulaciones de la presente invención según se analiza en la presente memoria.

#### Dosificación

- 25 La cantidad de compuesto de chaperona eficaz para rescatar Gaa mutante endógena (y/o estabilizar la Gaa purificada administrada – véase la sección de terapia combinada posteriormente) se puede determinar caso por caso por los expertos en la técnica. Se pueden obtener datos farmacocinéticos y farmacodinámicos tales como la semivida ( $t_{1/2}$ ), la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), el tiempo hasta la concentración plasmática máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ), la exposición según se mide por el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) y la distribución tisular tanto para la proteína restitutiva como para el compuesto de chaperona, así como datos para la unión de chaperona/Gaa restitutiva (constantes de afinidad, constantes de asociación y disociación, y valencia), usando métodos habituales conocidos en la técnica para determinar cantidades compatibles requeridas para estabilizar la proteína restitutiva, sin limitar su actividad, y así conferir un efecto terapéutico.

- 30 Se pueden usar datos obtenidos de un ensayo de cultivo celular o estudios en animales para formular un intervalo de dosificación terapéutica para el uso en seres humanos y animales no humanos. La dosificación de compuestos usados en métodos terapéuticos de la presente divulgación está preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la concentración  $ED_{50}$  (eficaz para 50% de la población probada) pero con poca o ninguna toxicidad. La dosificación particular usada en cualquier tratamiento puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de factores tales como la forma de dosificación particular empleada, la vía de administración utilizada, las condiciones del individuo (p. ej., el paciente), etc.

- 35 Una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular y formularse en modelos en animales para alcanzar un intervalo de concentración en circulación que incluya la  $IC_{50}$ . La concentración  $IC_{50}$  de un compuesto es la concentración que alcanza una inhibición semimáxima de síntomas (p. ej., según se determina a partir de los ensayos de cultivo celular). Dosificaciones apropiadas para el uso en un individuo particular, por ejemplo en pacientes humanos, se pueden determinar más exactamente a continuación usando tal información.

Las medidas de los compuestos en plasma se pueden medir habitualmente en un individuo tal como un paciente mediante técnicas tales como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) o cromatografía de gases.

- 40 La toxicidad y la eficacia terapéutica de la composición se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar, por ejemplo en ensayos de cultivo celular o usando animales experimentales para determinar la  $LD_{50}$  y la  $ED_{50}$ . Los parámetros  $LD_{50}$  y  $ED_{50}$  son muy conocidos en la técnica y se refieren a las dosis de un compuesto que sean letales para 50% de una población y terapéuticamente eficaces en 50% de una población, respectivamente. La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos se denomina el índice terapéutico y se puede expresar como la relación:  $LD_{50}/ED_{50}$ . Se prefieren los compuestos de chaperona que exhiban índices terapéuticos grandes.

Como un régimen de dosificación ejemplar, se administra N-butil-DNJ (ZAVESCA®) para el tratamiento de la



enfermedad de Gaucher en dosis orales de 100 a 300 mg al día en dosis divididas (de dos a tres veces al día). Después de la administración de 100 mg, el  $t_{m\acute{a}x}$  variaba de 2 a 2,5 h en pacientes con enfermedad de Gaucher. La semivida de ZAVESCA<sup>®</sup> es de aproximadamente 6 a 7 horas, lo que predice que el estado estacionario se alcanzará en de 1,5 a 2 días después de una dosificación diaria de tres veces. No hay evidencia de que ZAVESCA<sup>®</sup> sea metabolizado en seres humanos.

Para una actividad óptima de chaperona de Gaa, se espera que sean eficaces dosis de los derivados de DNJ inferiores a las requeridas para inhibir la síntesis de glucolípidos. Por ejemplo, se prefieren dosis de entre 5 y 150 mg/día, particularmente entre 5-75 mg/día para los derivados de DNJ que tienen una actividad potenciadora de Gaa superior. Algunos derivados de DNJ pueden requerir dosis ligeramente superiores debido a una actividad de potenciación de Gaa disminuida.

Las concentraciones óptimas del compuesto de chaperona se determinarán según la cantidad requerida para estabilizar e inducir una conformación apropiada de la proteína recombinante in vivo, en un tejido o en circulación, sin impedir su actividad, la biodisponibilidad del compuesto de chaperona en un tejido o en circulación ni el metabolismo del compuesto de chaperona en el tejido o en circulación. Por ejemplo, cuando el compuesto de chaperona es un inhibidor enzimático, la concentración del inhibidor se puede determinar al calcular el valor de IC<sub>50</sub> de la chaperona específica para la enzima. Teniendo en cuenta la biodisponibilidad y el metabolismo del compuesto, concentraciones alrededor del valor de IC<sub>50</sub> o ligeramente por encima del valor de IC<sub>50</sub> se pueden evaluar a continuación basándose en los efectos sobre la actividad enzimática, p. ej., la cantidad de inhibidor necesaria para incrementar la cantidad de actividad enzimática o prolongar la actividad enzimática de la enzima administrada. Como un ejemplo, el valor de IC<sub>50</sub> del compuesto desoxigalactonojiromicina (DGJ) para la enzima  $\alpha$ -Gal A es 0,04  $\mu$ M, indicando que la DGJ es un potente inhibidor. Según esto, se espera que la concentración intracelular de  $\alpha$ -Gal A sea muy inferior que la de la  $\alpha$ -Gal A administrada.

#### Terapia combinada con terapia enzimática restitutiva

La terapia enzimática restitutiva incrementa la cantidad de proteína al introducir exógenamente una enzima silvestre o biológicamente funcional por medio de infusión. Esta terapia se ha desarrollado para muchos trastornos genéticos incluyendo trastornos de almacenamiento liposómico, enfermedad de Gaucher y enfermedad de Fabry, como se mencionó anteriormente. La enzima silvestre se purifica de un sistema de expresión celular recombinante (p. ej., células de mamífero o células de insecto- véanse las Patentes de EE. UU. N° 5.580.757 de Desnick y cols.; 6.395.884 y 6.458.574 de Selden y cols.; 6.461.609 de Calhoun y cols.; 6.210.666 de Miyamura y cols.; 6.083.725 de Selden y cols.; 6.451.600 de Rasmussen y cols.; 5.236.838 de Rasmussen y cols.; y 5.879.680 de Ginns y cols.), placenta humana o leche de animal (véase la Patente de EE. UU. N° 6.188.045 de Reuser y cols.). Después de la infusión, se espera que la enzima exógena sea absorbida por los tejidos a través de un mecanismo inespecífico o específico para un receptor. En general, la eficacia de absorción no es alta, y el tiempo de circulación de la proteína exógena es breve (Ioannu y cols., *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 68: 14-25). Además, la proteína exógena es inestable y está sometida a degradación intracelular rápida así como tiene el potencial de reacciones inmunológicas adversas con tratamientos posteriores.

La restitución enzimática para la enfermedad de Pompe ha sido descrita por varios grupos, Klinge y cols., *Neuropediatrics*. 2005; 36(1): 6-11; Klinge y cols., *Neuromuscul Disord*. 2005; 15(1): 24-31; Van den Hout y cols., *J Inherit Metab Dis*. 2001; 24(2): 266-74; y Amalfitano y cols., *Genet Med*. 2001; 3(2): 132-8, con éxito limitado. La Gaa restitutiva para administración a seres humanos se describe en Van den Hout y cols., *Lancet*. 2000; 56: 397-8.

La presente invención incrementa la eficacia de la terapia proteínica restitutiva al incrementar la estabilidad de la proteína purificada *in vivo* en pacientes con enfermedad de Pompe que tienen una Gaa mutada caracterizada por mal plegamiento, mediante la coadministración de una ASSC para la proteína, e *in vitro* en una formulación o composición.

En una realización, la Gaa restitutiva y el compuesto de chaperona se formulan en composiciones separadas. En esta realización, el compuesto de chaperona derivado de DNJ y la Gaa restitutiva se pueden administrar según la misma vía, p. ej., infusión intravenosa, o, preferiblemente, mediante vías diferentes, p. ej., infusión intravenosa para la enzima restitutiva y administración oral para el compuesto de chaperona según se describe en la sección anterior.

La Gaa restitutiva se administra mediante cualquiera de las vías descritas anteriormente para la administración de la chaperona, pero preferiblemente la administración es parenteral. Más preferiblemente, la administración es intravenosamente en una solución estéril para inyección.

En otra realización, el compuesto de chaperona y la Gaa restitutiva se formulan en una sola composición. Esta composición mejora la estabilidad de la enzima durante el almacenamiento y la administración *in vivo*, reduciendo de ese modo los costes e incrementando la eficacia terapéutica. Preferiblemente, la formulación es adecuada para la administración parenteral, incluyendo intravenosa, subcutánea e intraperitoneal, sin embargo, también se contemplan formulaciones adecuadas para otras vías de administración tales como oral, intranasal o transdérmica.

Cronología de la administración. Cuando la Gaa restitutiva y el compuesto de chaperona están en formulaciones separadas, la administración puede ser simultánea, o el compuesto de chaperona se puede administrar antes de o

después de la Gaa reconstitutiva. Por ejemplo, cuando la enzima reconstitutiva se administra intravenosamente, el compuesto de chaperona se puede administrar durante un período de 0 horas a 6 horas más tarde. Alternativamente, el compuesto de chaperona se puede administrar de 0 a 6 horas antes de la proteína.

5 En una realización preferida, cuando el compuesto de chaperona y la proteína reconstitutiva se administran separadamente, y cuando el compuesto de chaperona tiene una semivida circulatoria breve (p. ej., una molécula pequeña), el compuesto de chaperona se puede administrar oralmente de forma continua, tal como diariamente, a fin de mantener un nivel constante en la circulación. Este nivel constante será uno que se haya determinado que es atóxico para el paciente y óptimo en cuanto a la interacción con una proteína reconstitutiva elegida durante el tiempo de administración para conferir un efecto terapéutico no inhibitorio.

10 En otra realización, el compuesto de chaperona se administra durante el período de tiempo requerido para la renovación de la Gaa reconstitutiva (que se prolongará mediante la administración del compuesto de chaperona).

Dosis de Gaa reconstitutiva. Según los métodos actuales, la concentración de enzima reconstitutiva está generalmente entre aproximadamente 0,05-5,0 mg/kg de peso corporal, típicamente administrada semanalmente o quincenalmente. La enzima se puede administrar en una dosificación que varía de 0,1 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. Por ejemplo, para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la dosis de α-Gal A recombinante administrada está típicamente entre 0,1-0,3 mg/kg y se administra semanalmente o quincenalmente. Son necesarias dosis repetidas regularmente de la proteína a lo largo de la vida del paciente. Las inyecciones subcutáneas mantienen una exposición sistémica más prolongada al fármaco. La dosificación subcutánea es preferiblemente 0,1-5,0 mg de la α-Gal A por kg de peso corporal quincenalmente o semanalmente. La α-Gal A también se administra intravenosamente, p. ej. en una inyección intravenosa en embolada, en una inyección intravenosa de empuje lento o mediante una inyección intravenosa continua. La infusión IV continua (p. ej., a lo largo de 2-6 horas) permite el mantenimiento de niveles específicos en la sangre.

25 Se espera que la dosis eficaz de Gaa recombinante o purificada sea mayor que la requerida en la enfermedad de Fabry o Gaucher, debido al hecho de que el tejido elegido en la enfermedad de Pompe, el músculo esquelético, está protegido de la enzima administrada recombinantemente por tejido endotelial e intersticial. La Gaa recombinante (Myozyme, Genzyme, Inc.) está aprobada actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. Se están efectuando experimentos adicionales en la Universidad de Duke junto con Synpac, Inc., y en Europa. En un estudio europeo, pacientes infantiles de enfermedad de Pompe se iniciaron con una dosis de 15 y 20 mg/kg por semana de Gaa humana recombinante procedente de leche de conejo, aunque durante el estudio, basándose en la comprobación de los niveles de actividad en tejido muscular, la dosis se incrementaba hasta 40 mg/kg en una infusión intravenosa de una vez a la semana. El estudio se continuó durante 144 infusiones a lo largo de 36 semanas (Van den Hout y cols., *Pediatrics*. 2004; 113: 448-57). En un experimento en varios pacientes con enfermedad de Pompe de inicio tardío, Gaa humana recombinante procedente de leche de conejo se administró intravenosamente como una solución de 1 a 2 mg/ml en solución salina con glucosa al 5% y albúmina sérica humana al 0,1%, inicialmente en dosis semanales de 10 mg/kg, incrementando hasta 20 mg/kg (Winkel y cols., *Ann Neurol*. 2004; 55: 495-502).

#### Terapia combinada con terapia génica

40 Aunque todavía no han sido aprobadas para tratamiento terapéutico en los Estados Unidos, las terapias génicas (tanto *ex vivo* como transferencia directa) para numerosos trastornos genéticos están bajo investigación. La presente divulgación también contempla el uso del compuesto de chaperona en combinación con terapia génica para restituir la Gaa insuficiente en la enfermedad de Pompe. Esta combinación mejorará la eficacia de la terapia génica al incrementar el nivel de expresión de la Gaa terapéutica *in vivo*, puesto que, además de mejorar el plegamiento y el procesamiento de enzimas mutadas, se ha mostrado que las chaperonas de molécula pequeña mejoran el plegamiento y el procesamiento de los homólogos silvestres o conformacionalmente estables (véase, p. ej., el documento U.S. 6.274.597 de Fan y cols., Ejemplo 3).

50 Recientemente, Sun y cols. (*Mol Ther*. 2005; 11(1): 57-65) han empleado un vector de virus adenoasociado (AAV) que codifica Gaa humana (hGaa; pseudotipificado como AAV8 (AAV2/8)) para la inyección intravenosa en un modelo en ratones inmunodeficientes de la enfermedad de Pompe (ratones inactivados para Gaa/SCID). Se mantenían altos niveles de hGaa en el plasma durante 24 semanas después de la administración del vector AAV2/8. La deficiencia en Gaa en el corazón y el músculo esquelético se corregía con el vector AAV2/8 en ratones macho, mientras que los ratones hembra solo tenían corrección en el corazón.

55 Cualquiera de los métodos para terapia génica que están o estén disponibles en la especialidad se pueden usar para aportar genes terapéuticos. Métodos ejemplares se describen posteriormente. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel y cols., *Clinical Pharmacy* 1993, 12:488-505; Wu y Wu, *Biotherapy* 1991, 3:87-95; Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1993, 32:573-596; Mulligan, *Science*. 1993, 260:926-932; y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 1993, 62:191-217; May, *TIBTECH* 1993, 11:155-215. Métodos comúnmente conocidos en la especialidad de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel y cols., (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990,

*Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y cols., (eds.), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY; y Colosimo y cols., *Biotechniques* 2000;29(2):314-8, 320-2, 324.

5 El gen de Gaa que se va a administrar se puede aislar y purificar usando técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante habituales dentro de la experiencia de la especialidad. Por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la proteína elegida se pueden aislar usando expresión de ADN recombinante según se describe en la bibliografía. Véanse, p. ej., Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; *Transcription And Translation* [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; *Animal Cell Culture* [R.I. Freshney, ed. (1986)]; *Immobilized Cells And Enzymes* [IRL Press, (1986)]; B.É Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984). El ácido nucleico que codifica la proteína puede ser de longitud completa o truncado, con la condición de que el gen codifique una proteína biológicamente activa.

15 El gen de Gaa identificado y aislado se puede insertar a continuación en un vector de clonación apropiado. Vectores adecuados para terapia génica incluyen virus, tales como adenovirus, virus adenoasociados (AAV), variolovacuna, herpesvirus, baculovirus y retrovirus, parvovirus, lentivirus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación típicamente usados en la especialidad que se han descrito para la expresión en una variedad de hospedadores eucarióticos y procarióticos, y se pueden usar para la terapia génica así como para la expresión simple de proteínas.

20 En una realización preferida, el vector es un vector viral. Los vectores virales, especialmente los vectores adenovirales, se pueden complejar con un anfífilo catiónico, tal como un lípido catiónico, poli-L-lisina (PLL) y dietilaminoetil-dextrano (DELAE-dextrano) (DELAE-dextrano), que proporcionan una eficacia incrementada de infección viral de las células elegidas (Véase, p. ej., el documento PCT/US97/21496 presentado el 20 de noviembre de 1997). Vectores virales preferidos incluyen vectores derivados de variolovacuna, herpesvirus, AAV y retrovirus. En particular, los herpesvirus, especialmente el virus del herpes simple (HSV), tales como los divulgados en la Pat. EE. UU. N° 5.672.344, son particularmente útiles para el aporte de un transgén a una célula neuronal. También son útiles los vectores AAV, tales como los divulgados en las Pat. EE. UU. N° 5.139.941, 5.252.479 y 5.753.500 y la publicación PCT WO 97/09441, ya que estos vectores se integran en cromosomas de hospedador, con una necesidad mínima de administración repetida del vector. Para una revisión de los vectores virales en la terapia génica, véanse McConnell y cols., *Hum Gene Ther.* 2004; 15(11):1022-33; Mccarty y cols., *Annu Rev Genet.* 2004; 38:819-45; Mah y cols., *Clin. Pharmacokinet.* 2002; 41(12):901-11; Scott y cols., *Neuromuscul. Disord.* 2002;12 Supl 1:S23-9. Además, véase la Patente de EE. UU. N° 5.670.488. Beck y cols., *Curr Gene Ther.* 2004; 4(4): 457-67, describen específicamente la terapia génica en células cardiovasculares.

35 Las secuencias codificantes del gen que se va a aportar están conectadas operativamente a secuencias de control de la expresión, p. ej., un promotor que dirige la expresión del gen. Según se usa en la presente, la expresión "conectado operativamente" se refiere a la relación funcional de un polinucleótido/gen con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, mejoradores, sitios de finalización de la transcripción y la traducción y otras secuencias de señalización. Por ejemplo, una conexión operativa de un ácido nucleico a un promotor se refiere a la relación física y funcional entre el polinucleótido y el promotor de modo que la transcripción de ADN se inicie a partir del promotor mediante una ARN polimerasa que reconozca y se una específicamente al promotor, y en donde el promotor dirige la transcripción de ARN desde el polinucleótido.

40 En una realización específica, se usa un vector en el que las secuencias codificantes y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado del genoma, proporcionando así la expresión de la construcción a partir de un ácido nucleico que tiene integrado en el genoma (Koller y Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86:8932-8935; Zijlstra y cols., *Nature.* 1989, 342:435-438; la Patente de EE. UU. N° 6.244.113 de Zarling y cols.; y la Patente de EE. UU. N° 6.200.812 de Pati y cols.).

#### Aporte génico

50 El aporte del vector a un paciente puede ser bien directo, en cuyo caso el paciente está expuesto directamente al vector o un complejo de aporte, o bien indirecto, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con el vector *in vitro*, y a continuación se trasplantan al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

55 Transferencia directa. En una realización específica, el vector se administra directamente *in vivo*, donde entra en las células del organismo y media en la expresión del gen. Esto se puede efectuar mediante cualquiera de numerosos métodos conocidos en la especialidad y analizados anteriormente, p. ej., al construirlo como parte de un vector de expresión apropiado y administrarlo de modo que se vuelva intracelular, p. ej., mediante infección usando un vector retroviral u otro viral insuficiente o atenuado (véase la Patente de EE. UU. N° 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (p. ej., una pistola génica; Biolistic, Dupont); o revistiendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en

5 biopolímeros (p. ej., polisacárido de poli-β-1-64-N-acetilglucosamina; véase la Patente de EE. UU. Nº 5.635.493), encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas; al administrarlo en conexión con un péptido u otro ligando conocido por entrar en el núcleo; o al administrarlo en conexión con un ligando sometido a endocitosis mediada por receptor (véase, p. ej., Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 1987, 62:4429-4432), etc. En otra realización, se puede formar un complejo ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación liposómica, o péptidos 12-meros catiónicos, p. ej., derivados de antenapedia, que se pueden usar para transferir ADN terapéutico en células (Mi y cols., *Mol. Therapy.* 2000, 2:339-47). En otra realización más, el ácido nucleico puede ser orientado *in vivo* para la absorción y la expresión específica en células, al orientar a un receptor específico (véanse, p. ej., las Publicaciones PCT Nº WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316 y WO 93/14188). Recientemente, se ha usado una técnica denominada magnetofección para aportar vectores a mamíferos. Está técnica asocia los vectores con nanopartículas superparamagnéticas para el aporte bajo la influencia de campos magnéticos. Esta aplicación reduce el tiempo de aporte y mejora la eficacia del vector (Scherer y cols., *Gene Therapy.* 2002; 9:102-9). Metodologías de orientación y aporte adicionales se contemplan en la descripción de los vectores, posteriormente.

15 En una realización específica, el ácido nucleico se puede administrar usando un portador lipídico. Los portadores lipídicos se pueden asociar con ácidos nucleicos desnudos (p. ej. ADN plasmídico) para facilitar el paso a través de las membranas celulares. Se pueden usar con este propósito lípidos catiónicos, aniónicos o neutros. Sin embargo, se prefieren los lípidos catiónicos debido a que se ha mostrado que se asocian mejor con ADN que, generalmente, tiene una carga negativa. También se ha mostrado que los lípidos catiónicos median en el aporte intracelular de ADN plasmídico (Felgner y Ringold, *Nature.* 1989; 337:387). Se ha mostrado que la inyección intravenosa de complejos de lípido catiónico-plásmido en ratones da como resultado la expresión del ADN en el pulmón (Brigham y cols., *Am. J. Med. Sci.* 1989; 298:278). Véanse además, Osaka y cols., *J. Pharm. Sci.* 1996; 85(6):612-618; San y cols., *Human Gene Therapy.* 1993; 4:781-788; Senior y cols., *Biochemica et Biophysica Acta.* 1991; 1070:173-179; Kabanov y Kabanov, *Bioconjugate Chem.* 1995; 6:7-20; Liu y cols., *Pharmaceut. Res.* 1996; 13; Remy y cols., *Bioconjugate Chem.* 1994; 5:647-654; Behr, J-P., *Bioconjugate Chem.* 1994; 5:382-389; Wyman y cols., *Biochem.* 1997; 36:3008-3017; la Patente de EE. UU. Nº 5.939.401 de Marshall y cols; y la Patente de EE. UU. Nº 6.331.524 de Scheule y cols.

30 Lípidos iónicos representativos incluyen los divulgados, por ejemplo, en la Pat. EE. UU. Nº 5.283.185; y, p. ej., la Pat. EE. UU. Nº 5.767.099. En una realización preferida, el lípido catiónico es carbamato de N4-esperminocolesterol (GL-67) divulgado en la Pat. EE. UU. Nº 5.767.099. Lípidos preferidos adicionales incluyen carbamato de N4-espermidiocholesterol (GL-53) y carbamato de 1-(N4-espermino)-2,3-dilaurilglicerol (GL-89).

35 Preferiblemente, para la administración *in vivo* de vectores virales, se emplea un tratamiento inmunosupresor adecuado junto con el vector viral, p. ej., el vector adenoviral, para evitar la inmunodesactivación del vector viral y las células transfectadas. Por ejemplo, se pueden administrar citocinas inmunosupresoras, tales como interleucina-12 (IL-12), interferón-γ (IFN-γ) o anticuerpo anti-CD4, para bloquear respuestas inmunitarias humorales o celulares a los vectores virales. A este respecto, es ventajoso emplear un vector viral que esté manipulado para expresar un número mínimo de antígenos.

40 Transferencia indirecta. Las células somáticas pueden manipularse *ex vivo* con una construcción que codifica una proteína silvestre usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente y reimplantarse en un individuo. Este método se describe generalmente en el documento WO 93/09222 de Selden y cols. Además, esta tecnología se usa en la tecnología IMPACT patentada de Cell Based Delivery, descrita en Payumo y cols., *Clin. Orthopaed. and Related Res.* 2002; 403S: S228-S242. En esta terapia génica, las células somáticas (p. ej., fibroblastos, hepatocitos o células endoteliales) se retiran del paciente, se cultivan *in vitro*, se transfectan con el gen o los genes de interés terapéutico, se caracterizan y se reintroducen en el paciente. Se pueden usar tanto las células primarias (aportadas desde un individuo o tejido y manipuladas antes del pase) como las células secundarias (sometidas a pases *in vitro* antes de la introducción *in vivo*), así como líneas celulares inmortalizadas conocidas en la especialidad. Células somáticas útiles para los métodos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, células somáticas, tales como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, células gliales, células neurales, elementos formados de la sangre, células musculares, otras células somáticas que se pueden cultivar, y precursores de células somáticas. En una realización preferida, las células son fibroblastos o células madre mesenquimales.

55 Se usan construcciones de ácidos nucleicos, que incluyen el gen exógeno y, opcionalmente, ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable, junto con secuencias adicionales necesarias para la expresión del gen exógeno en células primarias o secundarias del receptor, para transfectar células primarias o secundarias en las que se va a producir el producto codificado. Se pueden usar con este propósito estas construcciones que incluyen, pero no se limitan a, vectores infecciosos, tales como vectores retrovirales, de herpes, de adenovirus, de virus adenoasociados, de paperas y de poliovirus.

El aporte transdérmico es especialmente adecuado para la transferencia indirecta usando tipos de células de la epidermis incluyendo queratinocitos, melanocitos y células dendríticas (Pfutzner y cols., *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2000; 9:2069-83).

60 Las células madre mesenquimales (MSCs) son células madre que no producen sangre producidas en la médula

ósea. Las MSCs se pueden elaborar para diferenciarse y proliferar en tejidos no sanguíneos especializados. Las células madre transfectadas con retrovirus son buenos candidatos para la terapia debido a su capacidad para la autorrenovación. Esta capacidad evita la administración repetitiva de la terapia génica. Otra ventaja es que si las células madre inyectadas alcanzan el órgano elegido y a continuación se diferencian, pueden reemplazar a las células dañadas o malformadas en el órgano.

#### Estabilidad in vitro

Asegurar la estabilidad de una formulación farmacéutica durante su período de conservación es un reto importante. Antes del desarrollo de un producto farmacéutico proteínico, se deben explorar y tratar las inestabilidades inherentes o latentes dentro de los ingredientes activos. La inestabilidad de un agente terapéutico se clasifica como inestabilidad química o inestabilidad física. Ejemplos de inestabilidad química son hidrólisis, oxidación y desamidación. Ejemplos de inestabilidad física son agregación, precipitación y adsorción a superficies. Además, una proteína se puede someter a tensiones tales como tensión por pH, temperatura, cizalladura, tensión por congelación/descongelación y combinaciones de estas tensiones.

Uno de los problemas más predominantes con las formulaciones es la agregación del producto, que da como resultado una pérdida en la bioactividad. La adición de excipientes puede frenar el proceso pero no lo puede evitar completamente. Las pérdidas de actividad se pueden detectar o no mediante ensayos físicos y solo son evidentes en bioensayos o ensayos de potencia con grandes (a veces 15-20%) coeficientes de variación, haciendo difícil determinar las pérdidas reales.

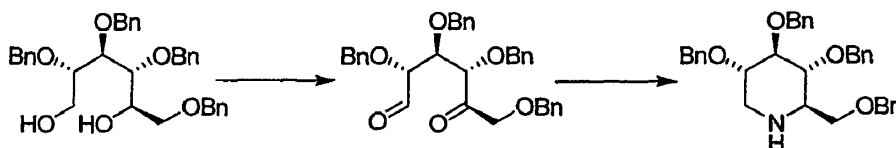
Además de estabilizar la enzima restitutiva que se va a administrar, la presencia de un compuesto de chaperona puede permitir que la formulación farmacéutica se almacene a un pH neutro de alrededor de 7,0-7,5. Esto conferirá una ventaja a enzimas que normalmente se deben almacenar a un pH inferior para conservar la estabilidad. Por ejemplo, las enzimas lisosómicas, incluyendo Gaa, retienen una conformación estable a un pH bajo (p. ej., 5,0 o inferior). Sin embargo, el almacenamiento prolongado de la enzima restitutiva a un pH bajo puede acelerar la degradación de la enzima y/o la formulación. La adición de un compuesto de chaperona estabilizante puede mitigar la necesidad de almacenar la proteína restitutiva en ácido.

#### Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, presentados posteriormente. El uso de estos ejemplos es solamente ilustrativo y no limita de ningún modo el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado.

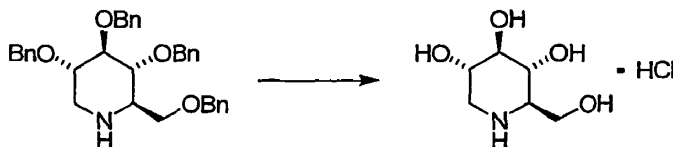
#### Ejemplo 1: Síntesis de DNJ y derivados

##### Tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina [PREPARACIÓN GENERAL DE IMINOAZÚCAR-1]



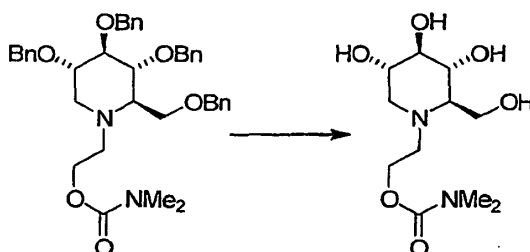
Una solución de DMSO (4,4 ml, 0,124 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (75 ml) se pone bajo una atmósfera de argón y se enfría hasta  $-78^\circ\text{C}$ . Una solución de anhídrido trifluoroacético (6,1 ml, 0,088 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (50 ml) se añade lentamente manteniendo la temperatura a  $-78^\circ\text{C}$ . Después de que la adición sea completa, la reacción se agita 30 minutos adicionales, se añade gota a gota una solución de 2,3,4,6-tetra-O-bencilglucitol (5,4 g, 10 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La reacción se agita a  $-78^\circ\text{C}$  durante 90 minutos y a continuación se desactiva mediante la adición de trietilamina (11,2 ml, 0,08 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 ml). La reacción se calienta hasta  $0^\circ\text{C}$  y a continuación se concentra usando un rotoevaporador. El residuo se diluye con MeOH (75 ml) y se añade una solución de  $\text{NH}_3$  2 M en MeOH (10,0 ml, 20,0 mmol) seguido por ácido fórmico (0,77 ml, 20,0 mmol), tamices moleculares de 3 Å y finalmente  $\text{NaCNBH}_3$  (1,57 g, 25,0 mmol). La mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó usando un rotoevaporador. El residuo se disuelve en EtOAc y se lava con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10%, y a continuación se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Después de la filtración, el disolvente se evapora y el producto se purifica mediante cromatografía de desarrollo rápido (gradiente por etapas 20-40% de EtOAc en hexano) para dar 2,3,4,6-tetrabencil-1-desoxinojirimicina.

##### Hidrocloruro de 1-desoxinojirimicina (Compuesto 1)



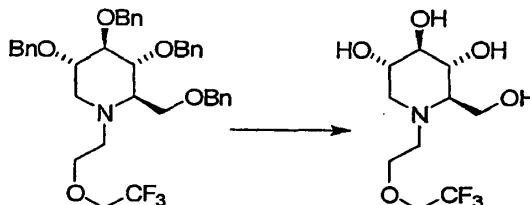
Una solución de 2,3,4,6-tetrabencil-1-desoxinojirimicina (5,0 g, 9,5 mmol) en EtOH (100 ml) se agita con HCl 5 N en 2-PrOH (3,0 ml, 15,0 mmol) y a continuación se evapora usando un rotoevaporador. El residuo se disuelve en EtOH y se evapora de nuevo usando un rotoevaporador. El residuo se disuelve en EtOH (150 ml) y se hidrogena [0,34 MPa (50 psi)] sobre 0,5 g de Pd(OH)<sub>2</sub> durante la noche a temperatura ambiente. El catalizador se retira mediante filtración y la torta filtrante se lava con EtOH/H<sub>2</sub>O y a continuación finalmente EtOH. El filtrado se evapora en un rotoevaporador y a continuación se coevapora con EtOH para dar un sólido blanco. El sólido se tritura con EtOH y se filtra para dar un sólido blanco. La recristalización en EtOH/H<sub>2</sub>O da el compuesto del epígrafe como un sólido blanco. PF 212-215°C, MH<sup>+</sup> =164.

Dimetilcarbamato de N-(2-hidroxietyl)-1-desoxinojirimicina (Compuesto 15)



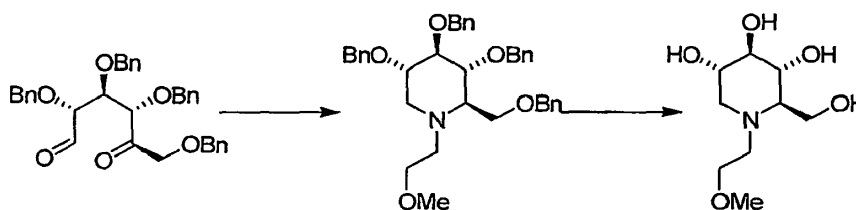
Se disuelve dimetilcarbamato de N-(2-hidroxietyl)-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina (0,63 g, 0,99 mmol) en 50 ml de metanol y se trata con 130 microlitros de ácido clorhídrico concentrado (1,6 mmol) e hidróxido de paladio al 20% (0,2 g, 0,3 mmol) como catalizador. La mezcla de reacción heterogénea se pone bajo una atmósfera de hidrógeno y se agita durante 15 h. El catalizador se retira mediante filtración a través de Celite que se lava con metanol adicional. El filtrado se concentra usando un rotoevaporador y el producto en bruto se purifica usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo con cloroformo:metanol (4:1). Las fracciones apropiadas se concentran usando un rotoevaporador y a continuación se liofilizan del agua para dar el derivado dimetilcarbamato de N-(2-hidroxietyl)-1-desoxinojirimicina (V, Compuesto 14) (MS = 279,4, M + H).

N-(2-(2,2,2-Trifluoroetoxietyl)-1-desoxinojirimicina (Compuesto 19)



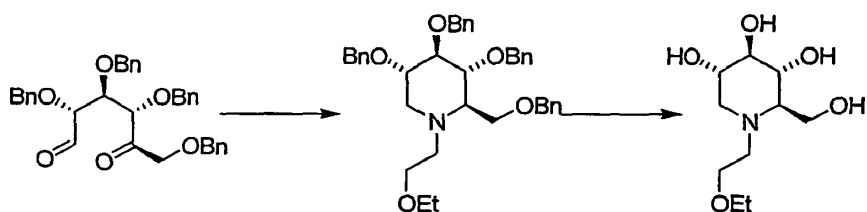
Se disuelve el producto intermedio de éter trifluoroetilico (IX) (0,40 g, 0,62 mmol) en 150 ml de metanol y se trata con 130 microlitros de ácido clorhídrico concentrado (1,6 mmol) e hidróxido de paladio al 20% (0,2 g, 0,3 mmol). La mezcla de reacción heterogénea se pone bajo una atmósfera de hidrógeno y se presuriza hasta 0,26 MPa (40 psi) usando un agitador de Parr. Después de 32 h, el catalizador se retira mediante filtración a través de Celite que se lava con metanol adicional. El filtrado se concentra usando un rotoevaporador y el producto en bruto se purifica usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo con cloroformo:metanol (4:1). Las fracciones apropiadas se concentran usando un rotoevaporador y a continuación se liofilizan del agua para dar N-(2-(2,2,2-trifluoroetoxietyl)-1-desoxinojirimicina como una espuma amarilla (MS = 290,2, M + H).

N-(Metoxietyl)-DNJ (Compuesto 20)



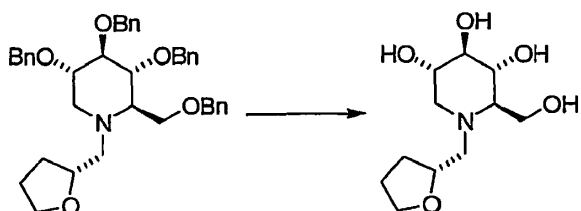
Se usa la preparación general del iminoazúcar-1, excepto que se usa 2-metoxietylamina en lugar de NH<sub>3</sub> para dar el compuesto del epígrafe, MS (ES<sup>+</sup>): 222 [M+1].

N-(Etoxietyl)-DNJ (Compuesto 21)



Se usa la preparación general del iminoazúcar-1 excepto que se usa 2-etoxietilamina en lugar de  $\text{NH}_3$  para dar el compuesto del epígrafe. MS (ES+): 258 [M+Na].

N-R-(-)-Tetrahydrofuranilmetil-1-desoxinojirimicina (Compuesto 17)

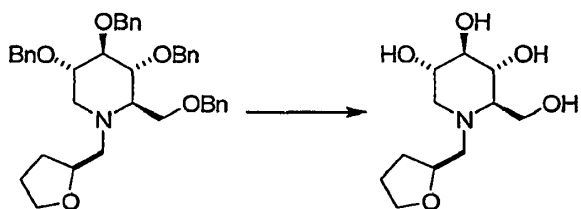


5

Se desbencila tetrahydrofuranilmetil-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina usando hidróxido de paladio en etanol bajo una atmósfera de hidrógeno a 0,41 MPa (60 psi) con calentamiento hasta 60°C. El producto en bruto se purifica usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo con una mezcla de cloroformo:metanol:hidróxido amónico (80:20:2) para dar la base libre del compuesto del epígrafe como una espuma blanca. A continuación, la base libre purificada se convierte en la sal de hidrocloreto mediante tratamiento con 1,0 equivalentes de ácido clorhídrico anhidro en 2-propanol. El disolvente se retira mediante evaporación usando un rotoevaporador para dar la sal de hidrocloreto deseada como un sólido blanco (MS = 248,2, M + H).

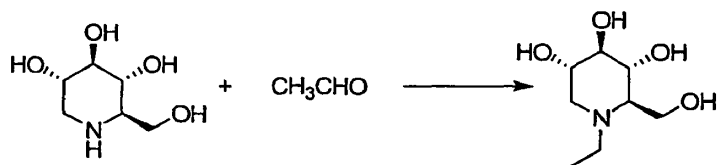
10

N-S-(+)-Tetrahydrofuranilmetil-1-desoxinojirimicina (Compuesto 18)



15 Se desbencila N-S-(+)-tetrahydrofuranilmetil-tetra-O-bencil-1-desoxinojirimicina usando hidróxido de paladio en metanol bajo una atmósfera de hidrógeno a 0,41 MPa (60 psi) con calentamiento hasta 60°C. El producto en bruto se purifica usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo con una mezcla de cloroformo:metanol:hidróxido amónico (80:20:2) para dar el compuesto del epígrafe como una espuma blanca (MS = 248,2, M + H).

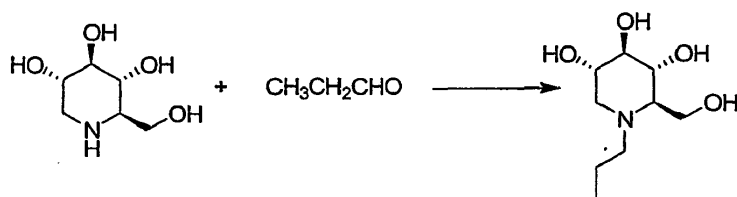
20 N-Etil-DNJ (Compuesto 3) [PREPARACIÓN GENERAL DEL IMINOAZÚCAR-2]



25

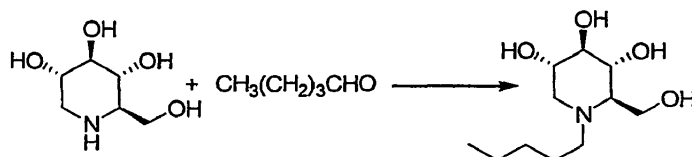
Una mezcla de 1-DNJ (1,0 g, 6,1 mmol), metanol (60 ml), agua desionizada (3,0 ml), acetaldehído (6,2 g, 141 mmol) y negro de Pd (50 mg) se agita rápidamente y se hidrogena a 20-22°C bajo una presión de 0,41 MPa (60 psi) de  $\text{H}_2$  durante 20 h. El catalizador se retiró mediante filtración a través de un lecho de Celite-545. El filtrado se evapora usando un rotoevaporador. El residuo no volátil se aplica a una columna de gel de sílice de desarrollo rápido y se eluye con una mezcla comprendida por cloruro de metileno:metanol: $\text{NH}_4\text{OH}$  al 29% y conc. (70:30:5). Las fracciones apropiadas se recogen, se combinan, se evaporan usando un rotoevaporador. La liofilización proporciona el producto aislado deseado. MP 168,3-169,6°C, m/z 192 (ES, [M+H]<sup>+</sup>).

N-Propil-DNJ (Compuesto 4)



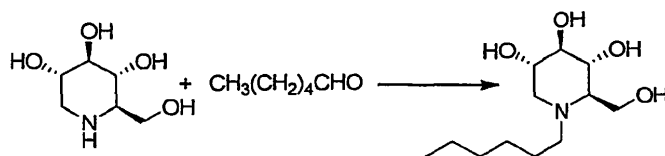
5 Una mezcla de 1-DNJ (1,0 g, 6,1 mmol), metanol (60 ml), agua desionizada (10,0 ml), propionaldehído (8,1, 139 mmol) y negro de Pd (100 mg) se agita rápidamente y se trata usando condiciones similares a las descritas para la preparación de N-etil-DNJ. El compuesto del epígrafe se obtiene como un sólido blanco. MP: 56,6-57,2°C, m/z 206 (ES, [M+H]<sup>+</sup>).

N-Pentil-DNJ (Compuesto 6)



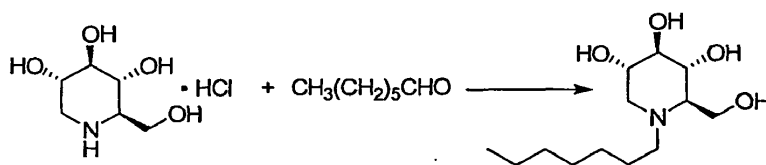
10 Una mezcla de 1-DNJ (1,0 g, 6,1 mmol), metanol (100ml), agua desionizada (10,0 ml), valeraldehído (4,22 g, 49 mmol) y negro de Pd (100 mg) se agita rápidamente y se trata usando condiciones similares a las descritas para la preparación de N-etil-DNJ. El compuesto del epígrafe se obtiene como un sólido blanco. MP 70-71°C, m/z 234 (ES, [M+H]<sup>+</sup>).

N-Hexil-DNJ (Compuesto 7)



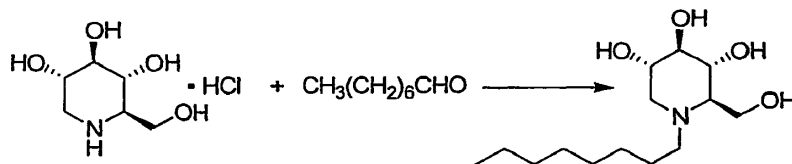
15 Una mezcla de 1-DNJ (1,0 g, 6,1 mmol), metanol (100 ml), agua desionizada (3,0 ml), hexanal (4,3 g, 42,9 mmol) y negro de Pd (50 mg) se agita rápidamente y se trata usando condiciones similares a las descritas para la preparación de N-Etil-DNJ. El compuesto del epígrafe se obtiene como un sólido blanco. MP 64,4-65,6°C, m/z 248 (ES, [M+H]<sup>+</sup>).

N-Heptil-DNJ (Compuesto 8)



20 Una mezcla de 1-DNJ-HCl (1,0 g, 5,0 mmol), metanol (100 ml), heptaldehído (4,9 g, 42,9 mmol) y negro de Pd (50 mg) se agita rápidamente y se trata usando condiciones similares a las descritas para la preparación de N-etil-DNJ. El compuesto del epígrafe se obtiene como un sólido blanco. MP 107-108°C, m/z 262 (ES, [M+H]<sup>+</sup>).

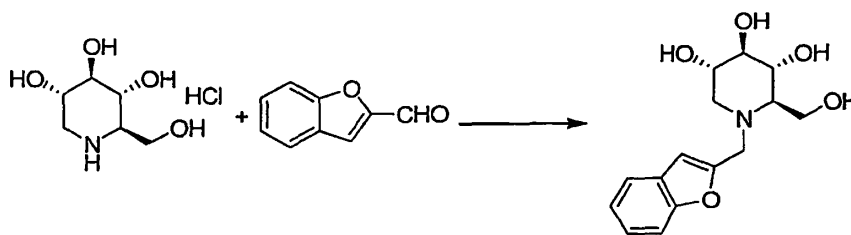
N-Octil-DNJ (Compuesto 9)



25 Una mezcla de 1-DNJ-HCl (1,0 g, 5,0 mmol), metanol (100 ml), octilaldehído (4,9 g, 42,9 mmol) y negro de Pd (50 mg) se agita rápidamente y se trata usando condiciones similares a las descritas para la preparación de N-etil-DNJ. El compuesto del epígrafe se obtiene como un sólido blanco. MP 193-195°C, m/z 276 (ES, [M+H]<sup>+</sup>).

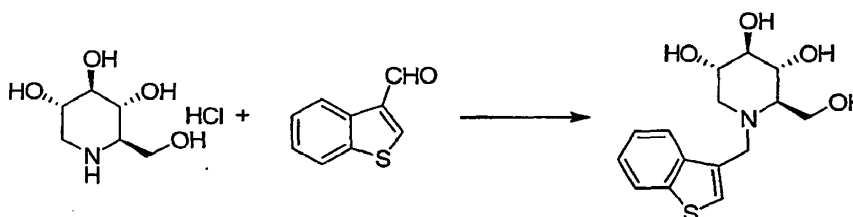
N-(Benzofuran-2-il)metil)desoxinojirimicina (Compuesto 30)





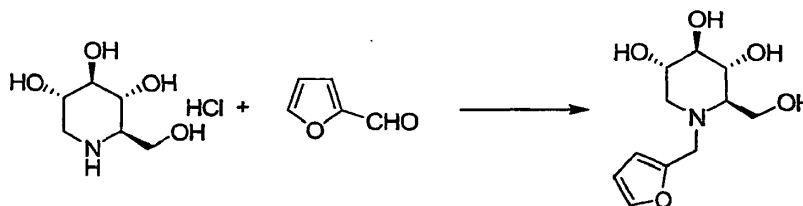
- 5 Una suspensión de hidrocloreto de desoxijirimicina (0,5 g, 2,5 mmol) en EtOH (30 ml) se trata con benzofuran-2-carboxaldehído (0,55 g, 3,75 mmol), HOAc (0,15 ml, 3,75 mmol) y cianoborohidruro sódico (0,23 g, 3,75 mmol). La mezcla se agita durante 24-36 h a temperatura ambiente. El disolvente se evapora usando un rotoevaporador y el residuo se disuelve en una mezcla de MeOH/NH<sub>4</sub>OH 9/1 y se evapora sobre sílice. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido con un gradiente de 0 a 20% (MeOH/NH<sub>4</sub>OH 9/1) en CHCl<sub>3</sub>. Las fracciones apropiadas se combinan y el disolvente se evapora para dar el compuesto del epígrafe como un sólido blanco, pf 169-175°C. MH<sup>+</sup> = 294.

N-((Benzotiofen-3-il)metil)desoxijirimicina (Compuesto 31)



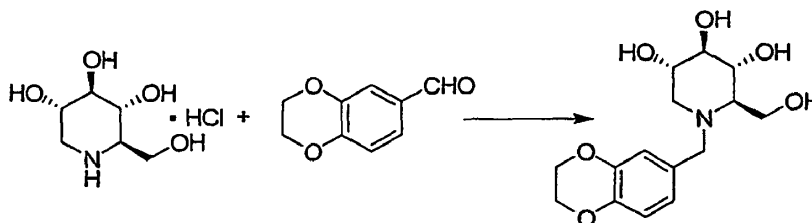
- 10 Se usó el método descrito para el compuesto directamente anterior, excepto que se usó benzotiofeno-3-carboxaldehído en lugar de benzofurano-2-carboxaldehído para dar el compuesto del epígrafe como un sólido blanco, pf 145-149°C. MH<sup>+</sup> = 310.

N-((Furan-2-il)metil)desoxijirimicina (Compuesto 29)



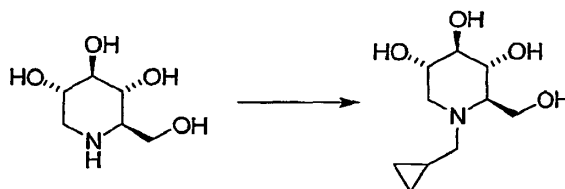
- 15 Se usó el método descrito para el compuesto anterior, excepto que se usó furfural en lugar de benzofurano-2-carboxaldehído para dar el compuesto del epígrafe como un aceite incoloro. MH<sup>+</sup> = 244.

N-((1,4-Benzodioxan-6-il)metil)desoxijirimicina (Compuesto 28)



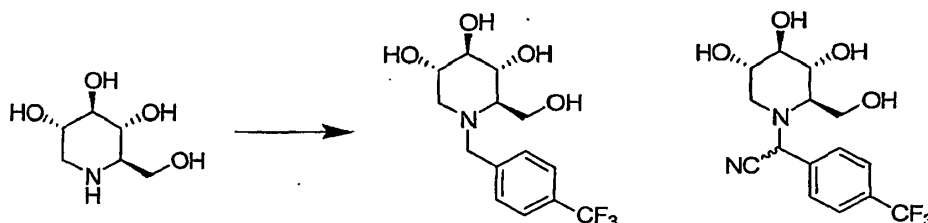
- 20 Se usó el método descrito, excepto que se usó 1,4-benzodioxano-6-carboxaldehído en lugar de benzofurano-2-carboxaldehído para dar el compuesto del epígrafe como un sólido amorfo MH<sup>+</sup> = 312.

N-Ciclopropilmetil-1-desoxijirimicina (Compuesto 11) [PREPARACIÓN GENERAL DEL IMINOAZÚCAR-3]



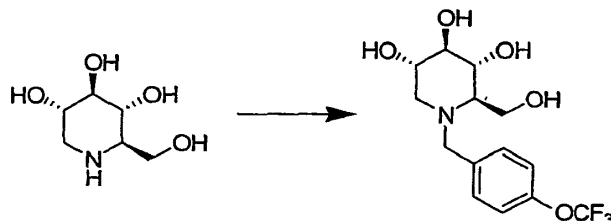
Se disuelve 1-desoxinojirimicina (Toronto Research Chemicals, N° Cat. D245000, 3,0 g, 18,4 mmol) en 300 ml de metanol anhidro y se combina con ciclopropanocarboxaldehído (Aldrich, 2,5 ml, 33,1 mmol). Se añaden tamices moleculares de 3 angstroms (6,0 g) y la mezcla se agita durante 15 min. Se añade MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 19,2 g, 46,0 mmol) seguido por ácido acético glacial (1,1 ml, 18,4 mmol). La mezcla de reacción se calienta hasta 45°C durante 48 h. La solución se concentra usando un rotoevaporador y el producto en bruto se purifica usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo en primer lugar con cloroformo a continuación con cloroformo:metanol 5:1/hidróxido amónico (10/1), a continuación cloroformo:metanol 3:1/hidróxido amónico (10/1) y finalmente cloroformo:metanol 1:1/hidróxido amónico (10/1). Al concentrar las fracciones apropiadas usando un rotoevaporador, se aísla el compuesto del epígrafe como una espuma blanca (MS = 218,8, M + H).

4-Trifluorometil(bencil)-DNJ (Compuesto 23) y  $\alpha$ -ciano-4-trifluorometil(bencil)-DNJ (Compuesto 24)



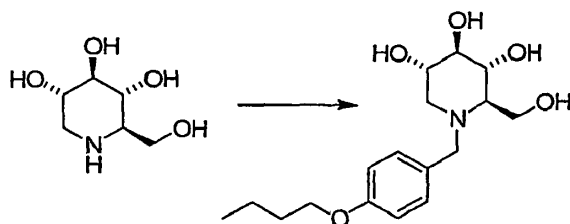
Usando la preparación general del iminoazúcar-3, se combinan 1-desoxinojirimicina (300 mg, 1,839 mmol), 4-trifluorometilbenzaldehído (Aldrich, 576,2 mg, 3,309 mmol), MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 1,92 g, 4,596 mmol), ácido acético (110,4 mg, 1,839 mmol) y se agitan como se describe en el procedimiento general. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo en primer lugar con cloroformo, a continuación cloroformo:metanol 10:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 8:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 6:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 4:1/hidróxido amónico (10:1) para dar 4-trifluorometil(bencil)-DNJ como un sólido blanco (MS = 322, M + H) y  $\alpha$ -ciano-4-trifluorometil(bencil)-DNJ como un sólido blanco (MS = 347, M+H).

4-Trifluorometoxi(bencil)-DNJ (Compuesto 25)



Usando la preparación general del iminoazúcar-3, se combinan y se agitan 1-desoxinojirimicina (300 mg, 1,839 mmol), 4-trifluorometoxilbenzaldehído (Aldrich, 629,2 mg, 3,309 mmol), MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 1,92 g, 4,596 mmol), ácido acético (110,4 mg, 1,839 mmol) como se describe en el procedimiento general. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice, eluyendo en primer lugar con cloroformo, a continuación cloroformo:metanol 10:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 8:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 6:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 4:1/hidróxido amónico (10:1) para dar el compuesto del epígrafe como un sólido blanco (MS = 338, M + H, MP 101-103°C).

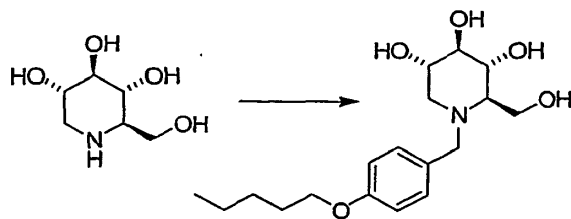
4-n-Butoxi(bencil)-DNJ (Compuesto 27)



Usando la preparación general del iminoazúcar-3, se combinan y se agitan 1-desoxinojirimicina (1,0 g, 6,1 mmol), 4-butoxibenaldehído (Aldrich, 2,0 g 11,2 mmol), MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 6,4 g, 15,3 mmol), ácido acético (0,37 ml, 6,4 mmol) como se describe en el procedimiento general. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice, eluyendo en primer lugar con cloroformo, a continuación cloroformo:metanol 10:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 8:1/hidróxido amónico (10:1),

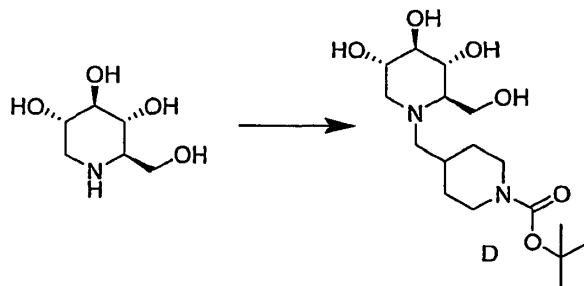
a continuación cloroformo:metanol 6:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 4:1/hidróxido amónico (10:1) para dar el compuesto del epígrafe como un sólido blanco (MP 153-155°C).

4-n-Pentoxi(bencil)-DNJ (Compuesto 26)



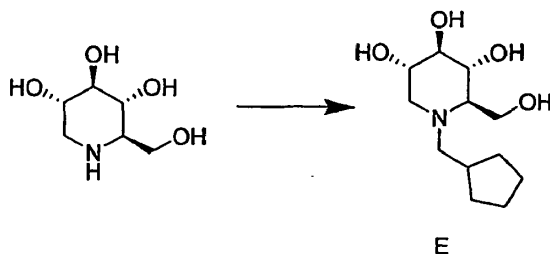
- 5 Usando la preparación general del iminoazúcar-3, se combinan y se agitan 1-desoxinojirimicina (1,0 g, 6,1 mmol), 4-butoxibenzaldehído (Alfa Aesar, 2,2 g 11,2 mmol), MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 6,4 g, 15,3 mmol), ácido acético (0,37 ml, 6,4 mmol) como se describe en el procedimiento general. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice, eluyendo en primer lugar con cloroformo, a continuación cloroformo:metanol 10:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 8:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 6:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 4:1/hidróxido amónico (10:1) para dar el compuesto del epígrafe como un sólido blanco (MS=340, M+H; MP 155-157°C).

N-(1-(terc-Butoxicarbonil)-4-piperidinilmetil)-1-desoxinojirimicina (Compuesto 16)



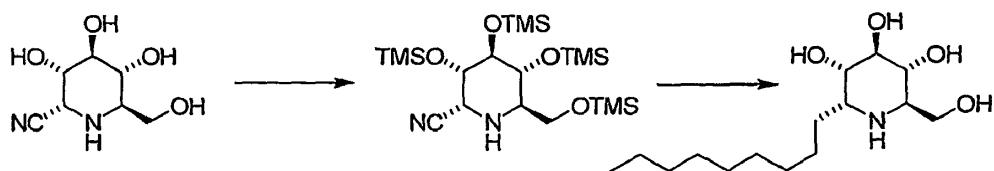
- 15 Usando la preparación general del iminoazúcar-3, se combinan y se agitan 1-desoxinojirimicina (500 mg, 3,064 mmol), 1-(terc-butoxicarbonil)-4-piperidinecarboxaldehído (CNH Technologies, 1,18 g, 5,516 mmol), MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 3,19 g, 4,596 mmol), ácido acético (184 mg, 3,064 mmol) como se describe en el procedimiento general. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo en primer lugar con cloroformo y a continuación cloroformo:metanol 10:1/hidróxido amónico (10:1) para dar N-(1-(terc-butoxicarbonil)-4-piperidinilmetil)-1-desoxinojirimicina como un sólido blancuzco (MS = 361, M + H, MP 46-50°C).

N-Ciclopentilmetil-1-desoxinojirimicina (Compuesto 12)



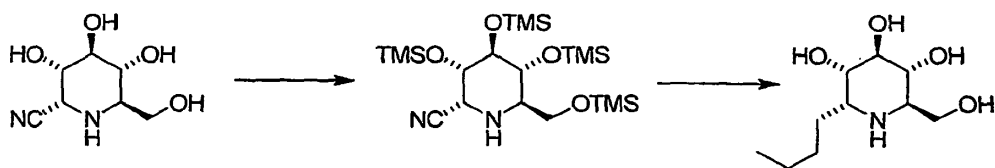
- 25 Usando la preparación general del iminoazúcar-3, se combinan y se agitan 1-desoxinojirimicina (500 mg, 3,064 mmol), ciclopentanocarboxaldehído (Aldrich, 541 mg, 5,516 mmol), MP-cianoborohidruro (Argonaut Technologies, 3,19 g, 7,661 mmol), ácido acético (184 mg, 3,064 mmol) como se describe en el procedimiento general. La purificación se efectúa usando cromatografía de desarrollo rápido en gel de sílice eluyendo en primer lugar con cloroformo, cloroformo:metanol 8:1/hidróxido amónico (10:1), a continuación cloroformo:metanol 4:1/hidróxido amónico (10:1) para proporcionar N-ciclopentilmetil-1-desoxinojirimicina como un aceite de color canela viscoso (MS = 246, M + H).

- 30 C-1- $\alpha$ -Nonil-1-desoxinojirimicina y C-1- $\beta$ -Nonil-1-desoxinojirimicina (Compuesto 32) [PREPARACIÓN GENERAL DEL IMINOAZÚCAR-4]



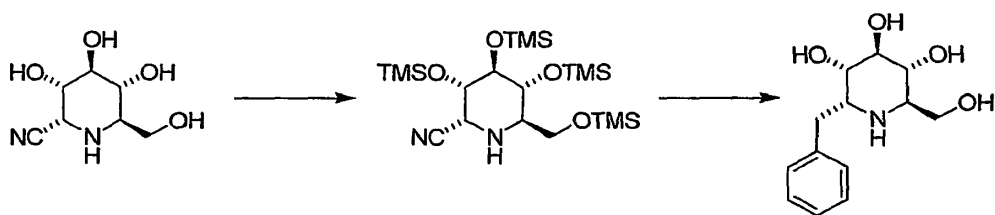
Usando un procedimiento análogo al descrito por Boshagen, Geiger y Junge (*Angewante Chemie*, Int. Ed. Engl., 20(9), 806-807(1981), se prepara 1- $\alpha$ -ciano-1-desoxinojirimicina según el método de Marcuccio (WO00/56713) (1,0 g, 5,3 mmol) y se suspende en hexametildisilazano (11 ml). La suspensión se trata con imidazol (156,3 mg, 2,5 mmol) y se calienta hasta 60°C durante 5 h bajo una atmósfera de argón. La mezcla se filtra para retirar los sólidos y el filtrado se concentra usando un rotoevaporador a 55-60°C. El residuo se disuelve en THF seco (50 ml) y se añade una solución de bromuro de n-nonilmagnesio (1 M en éter, 31,9 mmol, 38 ml) a 15-20°C. La mezcla se calienta hasta temperatura ambiente y se agita durante 5 h. La mezcla se enfría en un baño de hielo y se agita con HCl 1N (30 ml) durante 3 h. El pH de la mezcla se ajusta hasta 8,0 al añadir NaOH 2 N. La capa orgánica se retira y la fase acuosa se liofiliza. El residuo se disuelve en metanol (50 ml) y se filtra para retirar los sólidos. El filtrado se evapora hasta sequedad bajo vacío. El residuo obtenido después de la evaporación se cromatografía en una columna de gel de sílice usando cloruro de metileno:metanol:NH<sub>4</sub>OH al 29% (85:15:1,5). Las fracciones apropiadas que contienen el isómero  $\beta$  (Rf 0,5) se combinan y se evaporan usando un rotoevaporador y a continuación se liofilizan para obtener C-1- $\beta$ -nonyl-DNJ (MS = m/z 290).

#### 15 C1- $\alpha$ -Butil-DNJ (Compuesto 33)



Usando la preparación general del iminoazúcar-4, se convierte 1- $\alpha$ -ciano-1-desoxinojirimicina (2,0g, 9,5 mmol) en C-1- $\alpha$ -butil-DNJ. El producto se purifica mediante cromatografía en gel de sílice usando cloruro de metileno:metanol:NH<sub>4</sub>OH al 29% en la siguiente relación: (85:15:1,5). Las fracciones apropiadas, que contienen el isómero  $\alpha$  (Rf 0,3), se combinan y se evaporan para retirar el disolvente y a continuación se liofilizan para obtener el compuesto del epígrafe (MS = m/z 220).

#### C1- $\alpha$ -Bencil-DNJ (Compuesto 35)



Se prepara tetra-(O-trimetilsilil)-1- $\alpha$ -ciano-1-desoxinojirimicina (2,0g, 9,448 mmol) usando la preparación general del iminoazúcar-4. El compuesto protegido se disuelve en THF seco (20 ml) y se añade gota a gota bromuro de bencilmagnesio (2,0 M en THF, 20 ml). La mezcla se agita y se calienta a 45°C durante la noche. La mezcla se enfría hasta temperatura ambiente, se añade HCl 2 N (30 ml) y la mezcla se agita durante 3 h. El disolvente se evapora usando un rotoevaporador y el residuo se trata con una solución de NH<sub>4</sub>OH al 29% para neutralizar el ácido. La solución se lava con éter (2 x 20 ml) y la fase acuosa se separa y se liofiliza. El sólido se agita con cloruro de metileno:metanol:NH<sub>4</sub>OH al 29% (80:20:4), se filtra y el filtrado se evapora usando un rotoevaporador. El residuo se cromatografía en una columna de gel de sílice usando cloruro de metileno:metanol:NH<sub>4</sub>OH al 29% (80:20: 4). Las fracciones apropiadas que contienen el isómero  $\alpha$  (Rf 0,3) se combinan y se evaporan usando un rotoevaporador y a continuación se liofilizan para obtener el compuesto del epígrafe (MP = 7,3-74°C, MS = m/z 254). <sup>1</sup>H-NMR, 300 MHz (D<sub>2</sub>O) 2,28 (m, 2H), 2,55 (ddd, 1H, J=2,8, 5,6,10Hz), 2,99 (m, 2H), 3,06 (dd, 1H, J=2,8, 13,6Hz), 3,11 (m, 1H), 3,22 (dd, 1H, J=7,6, 11,2Hz), 3,56 (dd, 1H, J=3,2,11,6Hz) y 7,2 (m, 5H).

#### Ejemplo 2: Potenciación de Gaa con DNJ y derivados de DNJ

Los experimentos descritos posteriormente indican que la DNJ y el derivado de DNJ N-butyl-DNJ, inhibidores conocidos de enzimas responsables de la síntesis de glucolípidos, también se unen a y potencian la actividad de Gaa mutante sin inhibir la síntesis de glucolípidos.

## Métodos

Cultivo y siembra de células. Las líneas celulares de fibroblastos PM11 (P545L), PM8 y PM12 (ambos un defecto de corte y empalme) se usaron para experimentos de potenciación. Estas células son fibroblastos aislados de un paciente con enfermedad de Pompe. Las células se sembraron a alrededor de 5.000 células por pocillo en 180 µl de medio en placas Costa de 96 pocillos negras estériles de fondo transparente y se incubaron durante alrededor de 3-6 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. El medio consistía en DMEM con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina al 1%.

Tratamiento con fármacos. Todos los compuestos de prueba se disuelven en DMSO:H<sub>2</sub>O 1:1 hasta una concentración de reserva de 100 mM. Las diluciones en serie de las células usando otra placa Costar negra estéril de fondo transparente se realizaron como sigue:

- 5 1. Se añaden 20 µl de DMSO:H<sub>2</sub>O 1:1 y 180 µl de medio a las filas 3-11 y la fila 1, columnas E-H para una concentración de DMSO al 5%, H<sub>2</sub>O al 5% en medio.
2. Se añadieron 20 µl de DNJ 100 mM y 180 µl de medio a la fila 1, columnas A-D para una concentración de DNJ 10 mM
3. Se añadieron 30 µl de cada solución de reserva 100 mM que se iba a probar a un pocillo apropiado de la fila 2 junto con 270 µl de medio para una concentración de 10 mM.
- 15 4. La fila 1 se mezcló tres veces usando una pipeta de varios canales.
5. La fila 2 se mezcló como anteriormente y se transfirieron 100 µl desde la fila 2 hasta la fila 3. La fila 3 se mezcló como se describe anteriormente y se transfirieron 100 µl secuencialmente a cada una de las filas 4 a 11 (la fila 12 se deja sin tratar) a fin de generar diluciones triples en serie.
- 20 4. Se transfirieron 20 µl desde la placa de dilución según la Tabla 1.
5. La placa se incubó a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 6 días con el día 1 igual al día de dosificación.

Ensayo de actividad enzimática. Las células se lavaron dos veces con 200 µl de dPBS seguido por la adición de 70 µl de sustrato (4-MU-α-D-glu 2,11 mM 3 mM) en tampón de citrato-fosfato (citrato sódico 30 mM, fosfato sódico dibásico 40 mM, pH 4,0) y DMSO al 2,5% a las filas 1-12. Después de la incubación a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante alrededor de 3 h, se añadieron 70 µl de tampón de terminación (glicina 0,4 M pH 10,8) a las filas 1-12. La placa se leyó en un lector de placas fluorescente con contador Wallac de múltiples marcadores Victor<sup>2</sup> y la fluorescencia a F460 nm se determinó a una excitación de 355 nm y una emisión de 460 nm usando un tiempo de lectura de 1 segundo por pocillo. La actividad enzimática por µg de proteína en el sobrenadante se calculó a partir de la cantidad de fluorescencia emitida, que es directamente proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado y, de ahí, la cantidad de actividad de Gaa en el lisado. La relación de potenciación es la actividad de Gaa en presencia del derivado de DNJ dividida por la actividad de Gaa sin el compuesto.

## Resultados

DNJ, NB-DNJ y N-(ciclopropil)metil-DNJ. Como se muestra en la Figura 1, las células tratadas con DNJ (1), N-butil-DNJ, (5) y N-(ciclopropil)metil-DNJ (11) exhibieron incrementos dependientes de la dosis en la actividad de Gaa en comparación con células de control no tratadas en la línea celular PM11. La concentración más alta de DNJ, 1 mM, incrementa la actividad de Gaa alrededor de 7,8 veces en comparación con la actividad de Gaa en células no tratadas (datos no mostrados).

DNJ y NB-DNJ también incrementaban significativamente la actividad de Gaa (más de 2 veces) en las líneas celulares PM12 a una concentración de 50 µM. Tampoco se observaron incrementos en la actividad de Gaa en la línea celular PM8 mediante la DNJ (datos no mostrados). La potenciación de Gaa mediante DNJ y NB-DNJ depende de la dosis, con una potenciación creciente demostrada en un intervalo de 3,0-100 µM antes de la meseta (datos no mostrados).

Otros derivados de DNJ. Según se presenta en las Tablas 1 y 2, posteriormente, los derivados de DNJ N-metil-DNJ, N-(2-(N,N-dimetilamido)etiloxi)-DNJ (15), N-4-t-butiloxicarbonil-piperidnilmetil-DNJ (16), N-2-R-tetrahidrofuranylmetil-DNJ (17), N-2-R-tetrahidrofuranylmetil-DNJ (18), N-(2-(2,2,2-trifluoroetoxi)etil)-DNJ (19), N-2-metoxietil-DNJ (20), N-2-etoxietil-DNJ (21), N-4-trifluorometilbencil-DNJ (23), N-α-ciano-4-trifluorometilbencil-DNJ (24), N-4-trifluorometoxibencil-DNJ (25), N-4-n-pentoxibencil-DNJ (26) y N-4-n-butoxibencil-DNJ (27) también incrementaban significativamente la actividad de Gaa en la PM-11. El incremento de la actividad de Gaa usando N-metil-DNJ y N-carboxipentil-DNJ dependía de la dosis desde alrededor de 3-100 µM (datos no mostrados).

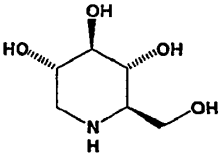
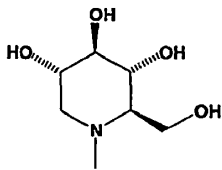
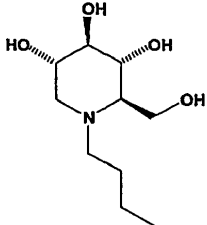
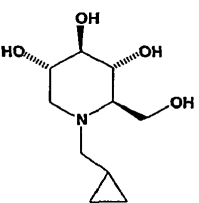
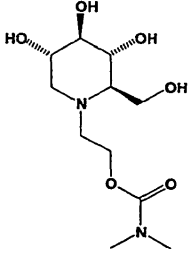
% E<sub>máx</sub> se refiere al porcentaje de potenciación máxima de un compuesto experimental con relación a la potenciación observada en presencia de DNJ 1 mM. Se calcula como lo más alto de la curva de regresión no lineal teórica analizada usando GraphPad Prism versión 3.02. La potenciación se define como el promedio de múltiples recuentos de fluorescencia normalizados hasta los recuentos máximos promedio en presencia de DNJ 1 mM y hasta los recuentos promedio mínimos en ausencia del compuesto. Los recuentos de fluorescencia se sustrajeron del

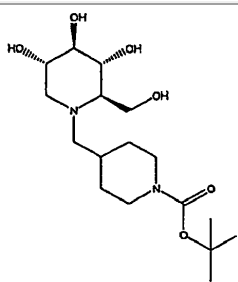
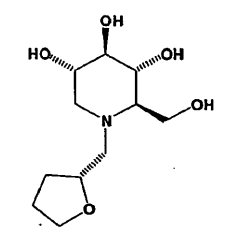
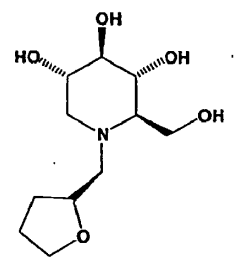
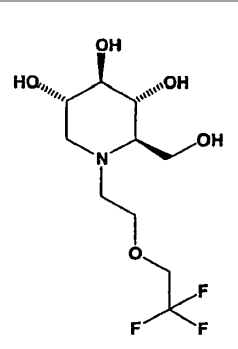
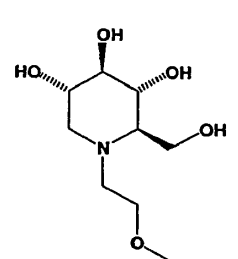
fondo. El fondo se define por los recuentos promedio en presencia menos en ausencia de células.  $EC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) se refiere a la concentración de compuesto que alcanza 50% de  $E_{\text{máx}}$ .

Sin querer limitarse por un mecanismo particular, se supone que la DNJ y los derivados de DNJ se unen a Gaa mutante en el ER e inducen un plegamiento apropiado de la proteína mutada permitiendo que la enzima salga del ER y circule hacia el lisosoma donde puede exhibir alguna cantidad de actividad enzimática.

5

**TABLA 1: DERIVADOS ALQUILADOS EN N DE 1-DESOXINOJIRIMICINA**

Comp. N°	Estructura	Nombre	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	% $E_{\text{máx}}$ ( $\mu\text{M}$ )
1		DNJ	$98,8 \pm 12,9$ (n=6)	$110,8 \pm 3,5$ (n=6)
2		N- Metil-DNJ	$74,5 \pm 9,5$ (n=3)	$67,3 \pm 6,0$ (n=3)
5		N-Butil-DNJ	$11,8 \pm 2,2$ (n=6)	$138,9 \pm 3,9$ (n=6)
11		N-(ciclopropil)metil-DNJ	$47,7 \pm 6,5$ (n=8)	$156,3 \pm 4,5$ (n=8)
15		Dimetilcarbarnato de N-etiloxi-DNJ / N-(2-(N,N-dimetilamido)etiloxi)-DNJ	$584,1 \pm 89,9$ (n=3)	$50,6 \pm 3,3$ (n=3)

Comp. Nº	Estructura	Nombre	EC <sub>50</sub> (µM)	% E <sub>máx</sub> (µM)
16		4-t-BOC-Piperidinilmetil-DNJ	69,7 ± 9,7 (n=3)	80,0 ± 1,9 (n=3)
17		N-2-(Tetrahidrofurano)metil-DNJ	653,2 ± 93,2 (n=3)	100,5 ± 3,0 (n=3)
18		N-2-(Tetrahidrofuran)metil-DNJ	103,5 ± 10,9 (n=5)	125,1 ± 6,9 (n=5)
19		Éter trifluoroetílico de N-2-oxoetil-DNJ / N-(2-(2,2,2-trifluoroetoxi)etil)-DNJ	371,8 ± 43,1 (n=3)	170,2 ± 12,3 (n=3)
20		2-metoxietil-DNJ	467,7 ± 6,0 (n=3)	119,9 ± 10,5 (n=3)
21		2-Etoxiel-DNJ	209,5 ± 13,1 (n=3)	115,0 ± 5,7 (n=3)

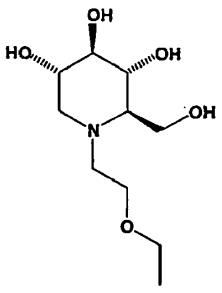
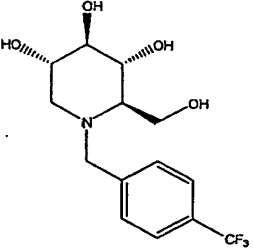
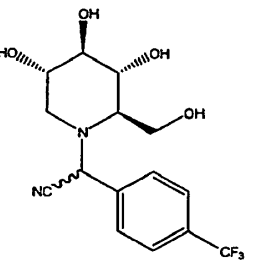
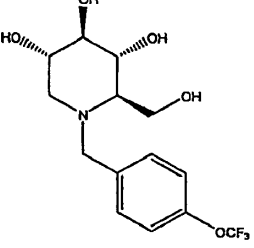
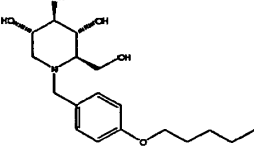
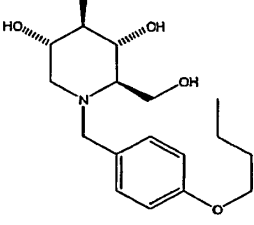
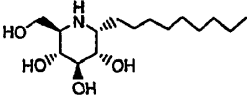
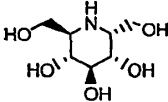
Comp. N°	Estructura	Nombre	EC <sub>50</sub> (μM)	% E <sub>máx</sub> (μM)
				
23		4-Trifluorometilbencil-DNJ	121,0 ± 11,4 (n=5)	91,6 ± 7,5 (n=5)
24		α-Ciano-4-trifluorometilbencil-DNJ	77,1 ± 10,4 (n=3)	104,0 ± 6,8 (n=3)
25		4-Trifluorometoxibencil-DNJ	66,5 ± 6,2 (n=3)	100,2 ± 6,3 (n=3)
26		4-Pentoxibencil-DNJ	6,6 ± 0,9 (n=3)	47,7 ± 3,9 (n=3)
27		4-Butoxibencil-DNJ	17,3 ± 1,6 (n=3)	68,5 ± 6,9 (n=3)



TABLA 2: DERIVADOS DE 1-DESOXINOJIRIMICINA CON SUSTITUCIÓN EN C

Comp. Nº	Estructura	Nombre	EC <sub>50</sub> (µM)	% E <sub>máx</sub> (µM)
32		α-C6-n-Nonil-DNJ	7,0 ± 1,8 (n=5)	38,9 ± 3,6 (n=5)
34		α-Homo-DNJ	281,0 ± 95,2 (n=3)	58,2 ± 2,1 (n=3)

Ejemplo 3: actividad de Gaa in vivo durante el tratamiento con DNJ y derivados de DNJ

- 5 Administración de fármacos. Este Ejemplo proporciona información sobre los efectos de derivados de DNJ en ratones. Los compuestos de prueba de derivados de DNJ se administraron a los ratones en 0,1 mg/kg/día, 10 mg/kg/día y 100 mg/kg/día; se recogieron órganos y plasma a las 2 y 4 semanas después del inicio del estudio. Se usaron veinte ratones C57BL6 macho (25 g) por grupo. El fármaco se suministró en el agua de bebida, por lo tanto, el consumo de agua se verificó diariamente.
- 10 En el grupo de control (0 mg/kg/día), los ratones fueron dosificados diariamente en el agua de bebida (sin fármaco) y se dividieron en dos grupos. Diez animales fueron sometidos a eutanasia después de 2 semanas de tratamiento, se recogió sangre de la aorta descendente o la vena cava, y los tejidos se recogieron y a continuación se sometieron a necropsia. Después de 4 semanas de tratamiento, los 10 animales restantes se sometieron a eutanasia y se sometieron a la misma evaluación.
- 15 En el primer grupo de prueba, 20 ratones fueron dosificados diariamente en el agua de bebida con un objetivo de administración de 1 mg/kg-día (suponiendo que un ratón de 25 g tiene un nivel de bebida diario de 5 ml/día, entonces el agua de bebida debe tener una concentración de 0,025 mg/5 ml o 5 microgramos/ml). De forma similar al control, 10 ratones fueron sometidos a eutanasia después de 2 semanas de tratamiento y se evaluaron. Después de 4 semanas de tratamiento, los 10 animales restante se sometieron a eutanasia y se evaluaron.
- 20 Para compuestos de prueba con un objetivo de 10 mg/kg-día, 20 ratones fueron dosificados diariamente en el agua de bebida (estimando una concentración de compuesto de 50 microgramos/ml) y se dividieron en dos grupos para una prueba como la descrita para los grupos anteriores.
- 25 Para el compuesto de prueba con un objetivo de 100 mg/kg-día, 20 ratones fueron dosificados diariamente en el agua de bebida (estimando una concentración de compuesto de 500 microgramos/ml) y divididos en dos grupos se probaron como se describe para los grupos anteriores.
- Las muestras de sangre se extrajeron en litio-heparina y se centrifugaron para el plasma. Después de la sangría, el corazón, el hígado, los gemelos, el sóleo, la lengua, el riñón y el cerebro se extirparon y se pusieron en viales. Los viales se pusieron en hielo seco para una congelación rápida. A continuación, los tejidos y el plasma se analizaron con respecto a los niveles tisulares de Gaa y glucógeno.
- 30 Preparación de tejidos. Se extirparon pequeñas porciones de tejido y se añadieron a 500 µl de tampón de lisis (citrato sódico 20 mM e hidrogenofosfato disódico 40 mM, pH 4,0, incluyendo Triton X-100 al 0,1%). A continuación los tejidos se homogeneizaron usando un microhomogeneizador durante un tiempo breve, seguido por centrifugación a 10.000 rpt durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se usaron para el ensayo enzimático.
- 35 Ensayo enzimático tisular. Se añadieron 17,5 µl de tampón de reacción (tampón de citrato-fosfato, sin Triton) y 50 µl de sustrato, α-glucopiranosido, marcado con 4-metilumbeliferona (4-MU), o controles negativos marcados, β-glucopiranosido y α-galactopiranosido a 2,5 µl de sobrenadante (en placas de 96 pocillos). Las placas se incubaron a 37° durante 1 hora, seguido por la adición de 70 µl de tampón de terminación (glicina 0,4 M-NaOH, pH 10,6). La actividad de Gaa se determinó al medir la absorbancia a 460 nm mediante excitación a 355 nm usando un tiempo de lectura de 1 segundo por pocillo (contador Wallac de múltiples marcadores Victor2). La actividad enzimática se normalizó hasta la cantidad en µl de lisado añadido, y se estimó la actividad enzimática por µl de lisado. La relación de potenciación es igual a la actividad con el compuesto sobre la actividad sin el compuesto.
- 40

## Resultados

Como se demuestra por las Figuras 2A-D y 3A-D, los niveles de Gaa se incrementaron después de dos semanas de tratamiento con DNJ y N-butil-DNJ en el cerebro, el hígado, los gemelos, la lengua (Fig. 2A-D) y también en el riñón, el diafragma, el corazón y el sóleo (Fig. 3A-D). Los resultados eran significativos para una tendencia lineal. Para la DNJ, los incrementos eran dependientes de la dosis en el cerebro, los gemelos, la lengua, el riñón, el diafragma, el corazón y el sóleo (significativos para una tendencia lineal). Para la N-butil-DNJ, los incrementos dependían de la dosis en el cerebro, el hígado, los gemelos, la lengua y el riñón.

Después de 4 semanas de tratamiento, se observaron incrementos en la actividad de Gaa después del tratamiento con DNJ en el cerebro, el hígado, los gemelos y la lengua (Figura 4A-D) y también en el riñón, el diafragma, el corazón y el sóleo (Figura 5A-D). Los resultados para N-butil-DNJ eran similares excepto para el diafragma, el corazón y el sóleo, donde no se observaron incrementos. Los incrementos parecían depender de la dosis en el cerebro, los gemelos, la lengua, el riñón (DNJ solamente), el diafragma (DNJ solamente), el corazón (DNJ solamente) y el sóleo (DNJ solamente).

Estos resultados confirman que las chaperonas farmacológicas específicas pueden incrementar la actividad de Gaa no mutada in vivo.

## Ejemplo 4: Acumulación y localización de Gaa con y sin exposición a derivados de DNJ

En este experimento, cuatro líneas celulares derivadas de pacientes con enfermedad de Pompe que exhibían poca o ninguna actividad de Gaa residual se compararon con fibroblastos naturales con respecto a la acumulación y la localización de Gaa.

## Métodos

Líneas celulares. Se evaluaron las líneas celulares PM8, PM9, PM11 y PM12. PM8 contiene un defecto de corte y empalme que da como resultado alguna actividad de Gaa residual (IVS1AS, T> G, -13); PM9 contiene una mutación interruptora en un alelo (R854X) y 3 mutaciones de aminoácido en los otros (D645E, V816I y T927I) y esencialmente no tiene actividad de Gaa residual (<1%); PM11 contiene una mutación de aminoácido (P545L) y tiene alguna actividad de Gaa residual. PM12 también tiene un defecto de corte y empalme (IVS8+G>A/M519V).

Inmunofluorescencia y microscopía. Células cultivadas durante 5 días con o sin compuesto se hicieron crecer durante 5 días sobre cubreobjetos de vidrio con NB-DNJ. Las células se fijaron con paraformaldehído al 3,7% durante 15 minutos, se permeabilizaron con saponina al 0,5% durante 5 minutos, a continuación se marcaron con una dilución 1:300 de anticuerpo de conejo contra Gaa humana (obsequio de Barry Byrne) y/o anticuerpos monoclonales murinos contra LAMP1 (BD Pharmingen, nº catálogo 555798) durante 1 hora a temperatura ambiente. Anticuerpos secundarios, anticuerpos caprinos contra IgG de conejo conjugados con AlexaFluor 488 y anticuerpos caprinos contra IgG murina conjugados con AlexaFluor 594 (Molecular Probes), se añadieron a continuación en una dilución 1:500 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se pusieron sobre portaobjetos con 10 µl de Vectashield, se sellaron con esmalte de uñas de secado rápido y se observaron con un microscopio confocal 90i Nikon C1.

## Resultados

PM8. A pesar de tener poca actividad de Gaa residual, las células PM8 exhibían un incremento de la tinción citosólica de LAMP-1 y Gaa, y tenían un patrón de tinción diferente, en comparación con fibroblastos naturales. Como se muestra en la Figura 6, los fibroblastos naturales tratados con NB-DNJ exhibían un patrón de tinción punteado tanto para LAMP-1 como para Gaa (Fig.6C-D), que parecía colocalizarse en los lisosomas. En contraste, en los fibroblastos PM8, la tinción era penetrante en el citoplasma tanto para LAMP-1 como para Gaa (Fig.6A-B y 6E-F). La superposición tanto de LAMP-1 como de Gaa en fibroblastos naturales confluentes confirma la colocalización en los lisosomas (Fig. 6H), mientras que la superposición en fibroblastos PM8 confluentes confirma el exceso citosólico de LAMP-1 y Gaa (Fig. 6G). Los resultados anteriores sugieren un posible defecto en la formación de lisosomas o la presencia de grandes agregados de estructuras endosómicas/lisosómicas formadas anormalmente (agresomas).

PM9. Los fibroblastos PM9 también inhibían un exceso de tinción de Gaa (Fig. 7B y 7D) y LAMP-1 (Fig. 7E) en el citosol (Fig. 7B). Una superposición muestra la formación de agregados de Gaa que se asemejan a agresomas (Figs. 7A, 7C y 7F, las flechas y la inserción muestran agresomas). Se anticipa que el tratamiento con derivados de DNJ restaurará la localización de Gaa en los lisosomas, y reducirá la formación de agresomas. Se anticipa que el tratamiento con derivados de DNJ restaurará la localización apropiada de Gaa en los lisosomas, y reducirá la presencia de agresomas citosólicos.

PM11. Los fibroblastos PM11 exhiben una actividad de Gaa reducida. Cuando se tratan con NB-DNJ (50 µM) y DNJ (100 µM), las células PM11 exhiben un incremento en la intensidad para el marcaje de Gaa en lisosomas según se determina por comarcaje con el marcador lisosómico LAMP-1, indicando una restauración en la circulación (Figura 8). Los fibroblastos PM11 no tratados exhiben alguna tinción de Gaa, poca de la cual se colocaliza con LAMP-1.

Además, para confirmar que el defecto en las células PM11 es la circulación de enzimas lisosómicas (Gaa) a los lisosomas, los fibroblastos naturales y las células PM11 se tiñeron con respecto a marcadores endosómicos temprano y tardío EEA1 y M6PR, respectivamente. No hay diferencia en los patrones de localización para los endosomas temprano y tardío entre fibroblastos naturales y fibroblastos PM11 con enfermedad de Pompe (datos no mostrados).

PM12. También se observaron incrementos significativos en la intensidad de tinción de Gaa en fibroblastos PM12 tratados con NB-DNJ (datos no mostrados).

#### Exposición

Este ejemplo demuestra que las chaperonas farmacológicas de la presente divulgación pueden restaurar el fenotipo de células que alojan mutaciones en Gaa distintas a (y además de) las mutaciones que hacen que Gaa se vuelva inestable y no pueda salir del ER durante la síntesis. Esto apoya una hipótesis en la que mejorar la circulación de Gaa mutante desde el ER hasta el lisosoma puede ser suficiente para mejorar algunos efectos patógenos de la enfermedad de Pompe en tejidos tales como el músculo, incluso sin restaurar la actividad de hidrolasa de Gaa en el lisosoma. Esta claro que la renovación de glucógeno no es suficiente para mejorar el fenotipo del paciente en la enfermedad de Pompe. Así, una hipótesis por la que las mejoras en la circulación pueden mejorar la patología de la enfermedad de Pompe es que la falta de actividad de Gaa provoca una deficiencia de glucosa en las células, lo que puede desencadenar o perpetuar una respuesta autofágica (usar glucógeno citoplásmico para la liberación rápida de glucosa). Esta respuesta autofágica dificulta la circulación a través de las rutas de circulación endosómicas, dando como resultado la circulación defectuosa de proteínas estabilizantes membranas, y la rotura final de las fibras musculares.

La terapia con chaperonas puede rescatar la actividad de Gaa, aliviar la deficiencia de glucosa y la respuesta autofágica inducida por la deficiencia de glucosa, y finalmente restaurar la circulación de proteínas estabilizantes membranas para evitar un daño muscular adicional.

#### Ejemplo 5: Efecto de derivados de DNJ sobre Gaa intestinal: contrarribado

La chaperona farmacológica específica ideal, en concentraciones subinhibidoras, potenciarán la Gaa lisosómica sin inhibir la Gaa intestinal. Según esto, la actividad de Gaa intestinal se evaluó en extractos en bruto procedentes de intestino de ratón a un pH de 7,0. Además, se estableció un ensayo de inhibición de la enzima Gaa intestinal para determinar si compuestos tales como DNJ y NB-DNJ ejercían un efecto inhibitorio sobre la Gaa intestinal.

#### Métodos

Preparación de tejidos. Los extractos en bruto se prepararon a partir de intestinos de ratón de ratones C57BK6 según se describe anteriormente. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo y se usaron para el ensayo enzimático.

#### Resultados

La DNJ era un inhibidor más potente de la Gaa intestinal con un valor de  $IC_{50}$  de 1  $\mu$ M, mientras que la NB-DNJ tenía un valor inhibitorio de  $IC_{50}$  de 21  $\mu$ M (datos no mostrados).

#### Ejemplo 6: Tratamiento de pacientes con enfermedad de Pompe con derivados de DNJ

A la vista de los resultados anteriores, el tratamiento de pacientes con enfermedad de Pompe con la DNJ y los derivados de DNJ de la presente divulgación reducirá la acumulación patológica de glucógeno en tejido muscular, mejorando de ese modo el estado de la enfermedad. A la vista del hecho de que el único tratamiento para la enfermedad de Pompe actualmente aprobado, la ERT, es ineficaz para reducir la acumulación de glucógeno en el músculo esquelético puesto que la enzima recombinante no puede penetrar en el tejido muscular, este método resuelve una necesidad de la técnica percibida desde hace mucho tiempo.

#### Métodos

Población de pacientes. Pacientes con enfermedad de Pompe de comienzo neonatal, infantil y/o en la edad adulta diagnosticada se incluirán y evaluarán en un estudio aleatorizado, con doble enmascaramiento, de múltiples dosis, abierto, de un derivado de DNJ administrado oralmente. Para la clasificación, los pacientes deben tener al menos uno de los siguientes: a) cardiomiopatía, definida como un índice de masa ventricular izquierda (LVMI, por sus siglas en inglés) determinado por ecocardiografía transversal; b) un requisito de soporte respiratorio invasivo o no invasivo, donde la respiración no invasiva se define como cualquier forma de soporte respiratorio aplicado sin el uso de un tubo endotraqueal; o c) retardo motor grave, definido como incapacidad para realizar tareas motrices normales conseguidas por el 90% de personas de edad similar normales en the Denver Developmental Screening Test (DDST-2; Hallioglou y cols., *Pediatr Int.* 2001; 43(4):400-4).

Administración de fármacos. Dos grupos de 10 sujetos recibieron bien 50 o bien 100 mg de DNJ o un derivado de DNJ dos veces al día durante 24 semanas. Esto está por debajo de la cantidad indicada para la escasez de

glucoesfingolípidos en la enfermedad de Gaucher.

5 Criterios de valoración. La eficacia clínica se evaluará mediante la supervivencia libre de respirador, el índice de masa ventricular izquierda, el desarrollo motor y la función de los músculos esqueléticos, p. ej., según se mide usando the Denver Developmental Screening Test y the Alberta Infant Motor Scale (Piper y cols., *Motor Assessment of the Developing Infant*. Filadelfia, PA, W.B. Saunders Co., 1994), the Bailey Scales of Infant Development II (BSIDII; Bailey y cols., *Bailey Scores of Infant Development*. 2ª Ed., San Antonio, TX: Harcourt Brace & Co. 1993), así como análisis histológicos y bioquímicos de biopsias musculares, es decir, una determinación de los niveles de glucógeno en pacientes tratados frente a no tratados usando una tinción de Schiff positiva a ácido peryódico (PAS, por sus siglas en inglés) y ensayos de actividad enzimática, y medida de la actividad de Gaa en fibroblastos obtenidos de los pacientes. Las medidas clínicas se evaluarán bisemanalmente, excepto para las biopsias musculares que se evaluarán a las 4, 12 y 24 semanas.

#### Resultados

15 El tratamiento con un derivado de DNJ será eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Pompe al mejorar algunos de los síntomas y reducir los niveles de glucógeno en tejido muscular. Por ejemplo, se espera que en 12 semanas se observen incrementos en la actividad de Gaa en el músculo, y que se reduzca la acumulación de glucógeno en el músculo. Además, se espera que se reduzca el LVMI y mejoren los síntomas respiratorios. Finalmente, se espera un avance en el desarrollo motor y el tono muscular, especialmente en pacientes jóvenes.

#### Conclusión

20 La invención proporciona una ventaja inesperada en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, para la que el único tratamiento actual es la ERT. La administración de una chaperona de molécula pequeña, preferiblemente oralmente, es económica y permite el rescate de la enzima en tejidos impenetrables para la ERT, es decir, el cerebro. Además, la terapia combinada con el compuesto de chaperona y la proteína restitutiva puede reducir el número de infusiones y/o la cantidad de enzima recombinante o purificada requerida, reduciendo de ese modo los costes y proporcionando una ventaja a los pacientes. Finalmente, la formulación de Gaa restitutiva en combinación con un compuesto de chaperona puede estabilizar la enzima recombinante y evitar la agregación y/o la degradación, incrementando de ese modo la duración de conservación de la enzima.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Amicus Therapeutics, Inc.

<120> UN MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE USANDO 1-DESOXINOJIRIMICINA Y DERIVADOS

5 <130> 077376.0191

<140> Pendiente de cesión  
< 141> 2006-05-17

<150> 60/729.329  
< 151> 2005-10-21

10 <150> 60/682.241  
< 151> 2005-05-10

<160> 2

<170> PatentIn versión 3,3

15 <210> 1  
< 211> 3624  
< 212> DNA  
< 213> Homo sapiens

<400> 1

```

cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcggggtg aggtcgggga tgaggcagca    60
ggtaggacag tgacctcggg gacgcgaagg accccggcca cctctaggtt ctctctgtcc    120
gcccgttgtt cagcgagggg ggctctgggc ctgccgcagc tgaccgggga actgaggcac    180
ggagcggggc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacca tgggagttag gcacccgccc    240
tgctcccacc ggctcctggc cgtctgcgcc ctctgtctct tggcaaccgc tgactcctg    300
gggcacatcc tactccatga tttcctgctg gttccccgag agctgagtgg ctctccccca    360
gtcctggagg agactcacc agctcaccag cagggagcca gcagaccagg gccccgggat    420
gcccaggcac accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccaac    480
agccgcttcg attgcccc tgacaaggcc atcaccagg aacagtgcga ggcccgcggc    540
tgctgtctaca tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc    600
ttcttccac ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctctc tgaaatgggc    660
tacacggcca ccctgaccg taccacccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg    720
cggctggacg tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct    780
aacaggcgtc acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca    840
ctctacagcg tggagtctc cgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac    900
ggcccgtgct tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag    960
ctgtccacct cgctgccctc gcagtatata acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg   1020
atgctcagca ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc   1080
    
```

ES 2 705 335 T3

ggtgcaacc tctacgggtc tcaccctttc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca 1140  
 cacggggtgt tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc 1200  
 cttagctgga ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc 1260  
 aagagcgtgg tgcagcagta cctggacggt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg 1320  
 ggctgggct tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg 1380  
 gtggagaaca tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac 1440  
 atggactccc ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg 1500  
 gtgcaggagc tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc 1560  
 agctcgggcc ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc 1620  
 atcaccaacg agaccggcca gccgctgatt gggaaagtat ggcccgggtc cactgccttc 1680  
 cccgacttca ccaacccccc agccctggcc tggggggagg acatggtggc tgagttccat 1740  
 gaccaggtgc ctttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcaga 1800  
 ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctgggggtg 1860  
 gttgggggga ccctccaggc ggccaccatc tgtgcctcca gccaccagt tctctccaca 1920  
 cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg 1980  
 gtgaaggctc gggggacacg cccatttgtg atctcccgcg cgaccttgc tggccacggc 2040  
 cgatacgccg gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc 2100  
 gtgccagaaa tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc 2160  
 ggcttcctgg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggaccagct gggggccttc 2220  
 tacccttca tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc 2280  
 agcgagccgg cccagcaggc catgaggaag gccctcacc tgcgctacgc actcctcccc 2340  
 cacctctaca cactgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc 2400  
 ttcttgaggt tccccaaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg 2460  
 gaggccctgc tcatcacccc agtctccag gccgggaagg ccgaagtgc tggctacttc 2520  
 cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca 2580  
 cccccacctg cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg 2640  
 ccggcccccc tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag 2700  
 ggccctggcc tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg 2760  
 accaagggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg 2820  
 ctggagcgag gggcctacac acaggtcatc ttctggcca ggaataacac gatcgtgaat 2880  
 gagctggtac gtgtgaccag tgaggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg 2940

ES 2 705 335 T3

ggcgtggcca cggcgcccca gcaggtcctc tccaacgggtg tccctgtctc caacttcacc 3000  
 tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt 3060  
 ctcgtcagct ggtgttagcc gggcggagtg tgttagtctc tccagagggg ggctggttcc 3120  
 ccaggggaagc agagcctgtg tgcgggcagc agctgtgtgc gggcctgggg gttgcatgtg 3180  
 tcacctggag ctgggcaacta accattccaa gccgccgat cgcttgtttc cacctcctgg 3240  
 gccggggctc tggccccaa cgtgtctagg agagctttct ccctagatcg cactgtgggc 3300  
 cggggcctgg agggctgctc tgtgttaata agattgtaag gtttgccctc ctcacctgtt 3360  
 gccggcatgc gggtagtatt agccaccccc ctccatctgt tcccagcacc ggagaagggg 3420  
 gtgctcaggt ggaggtgtgg ggtatgcacc tgagctcctg cttcgcgcct gctgctctgc 3480  
 cccaacgcga ccgcttcccg gctgcccaga gggctggatg cctgccggtc cccgagcaag 3540  
 cctgggaact caggaaaatt cacaggactt gggagattct aaatcttaag tgcaattatt 3600  
 ttaataaaag gggcatttgg aatc 3624

<210> 2

<211> 952

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys .  
 1 5 10 15  
 Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu  
 20 25 30  
 His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val  
 35 40 45  
 Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly  
 50 55 60  
 Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys  
 85 90 95  
 Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro  
 100 105 110  
 Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe  
 115 120 125

ES 2 705 335 T3

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser  
 130 135 140  
 Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu  
 165 170 175  
 Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu  
 180 185 190  
 Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu  
 195 200 205  
 Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg  
 210 215 220  
 Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe  
 225 230 235 240  
 Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr  
 245 250 255  
 Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser  
 260 265 270  
 Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly  
 275 280 285  
 Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly  
 290 295 300  
 Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val  
 305 310 315 320  
 Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile  
 325 330 335  
 Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln  
 340 345 350  
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly  
 355 360 365  
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr  
 370 375 380



ES 2 705 335 T3

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val  
 385 390 395 400  
 Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe  
 405 410 415  
 Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His  
 420 425 430  
 Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser  
 435 440  
 Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg  
 450 455 460  
 Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val  
 465 470 475 480  
 Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu  
 485 490 495  
 Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe  
 500 505 510  
 Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly  
 515 520 525  
 Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val  
 530 535 540  
 Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser  
 545 550 555 560  
 Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly  
 565 570 575  
 Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly  
 580 585 590  
 Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg  
 595 600 605  
 Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu  
 610 615 620  
 Ala ser ser val pro glu ile leu gln phe asn leu leu gly val pro



ES 2 705 335 T3

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly  
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala  
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr  
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly  
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys  
945 950

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende N-butil-1-desoxinojirimicina (NB-DNJ) o una sal de la misma para el uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, en la que se administra  $\alpha$ -glucosidasa ácida (Gaa) restitutiva en combinación y la NB-DNJ o la sal de la misma estabiliza la Gaa.
- 5 2. La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la Gaa restitutiva y la NB-DNJ o la sal de la misma se formulan en composiciones separadas.
3. La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma y la Gaa restitutiva se administran mediante la misma vía.
- 10 4. La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma y la Gaa restitutiva se administran mediante vías diferentes.
5. La composición para el uso según la reivindicación 4, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma se administra mediante administración oral y la Gaa restitutiva se administra mediante infusión intravenosa.
6. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma y la Gaa restitutiva se administran simultáneamente.
- 15 7. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma se administra antes o después de la Gaa restitutiva.
8. La composición para el uso según la reivindicación 1, en la que la Gaa restitutiva y la NB-DNJ o la sal de la misma se formulan en una sola composición.
- 20 9. La composición para el uso según la reivindicación 8, en donde la composición es adecuada para la administración parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea e intraperitoneal) o para la administración oral, intranasal o transdérmica.
10. La composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma se administra en una cantidad de 5 mg a 75 mg al día.
- 25 11. La composición para el uso según la reivindicación 5, en la que la NB-DNJ o la sal de la misma se administra durante un período de 0 horas a 6 horas antes de la Gaa restitutiva.

Ensayo de Potenciación con Células PM-11 Sometidas a Lisis

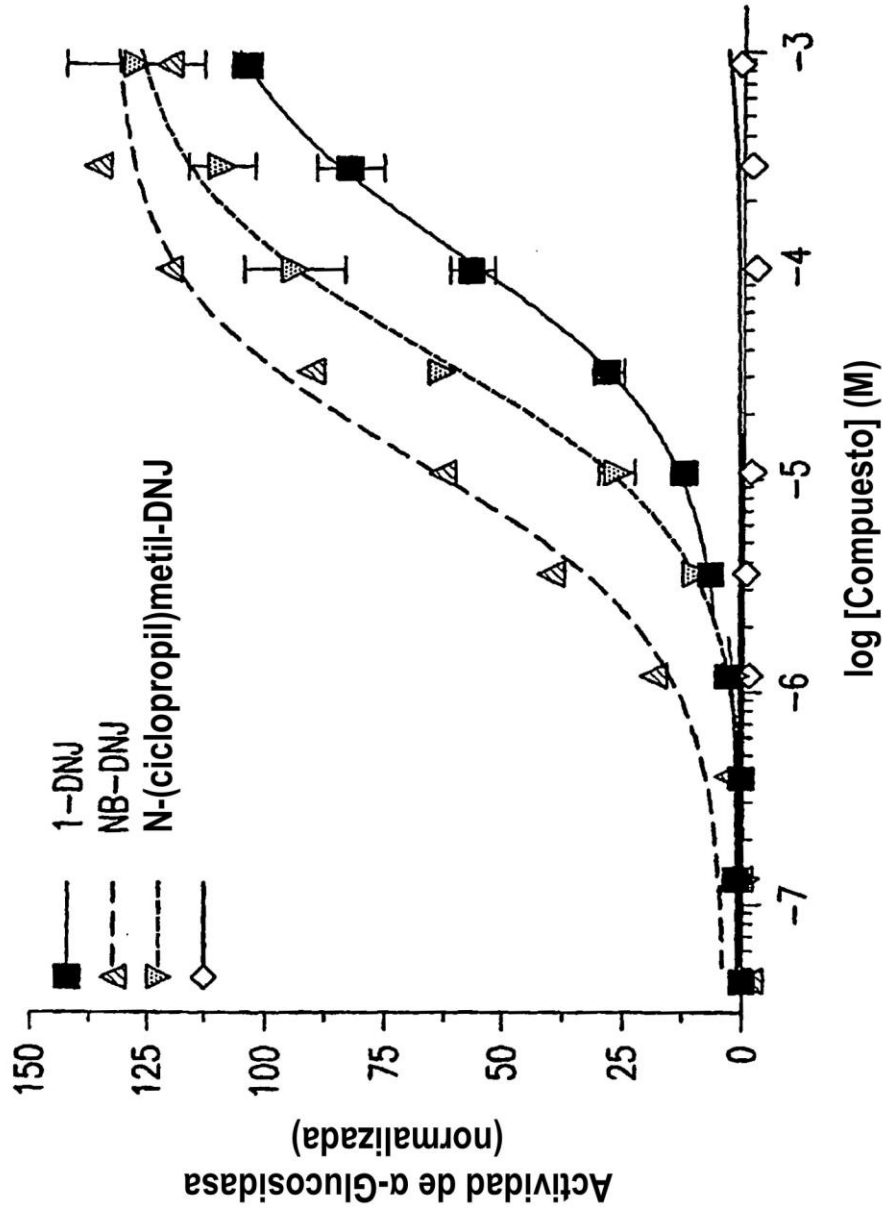


FIG.1

Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

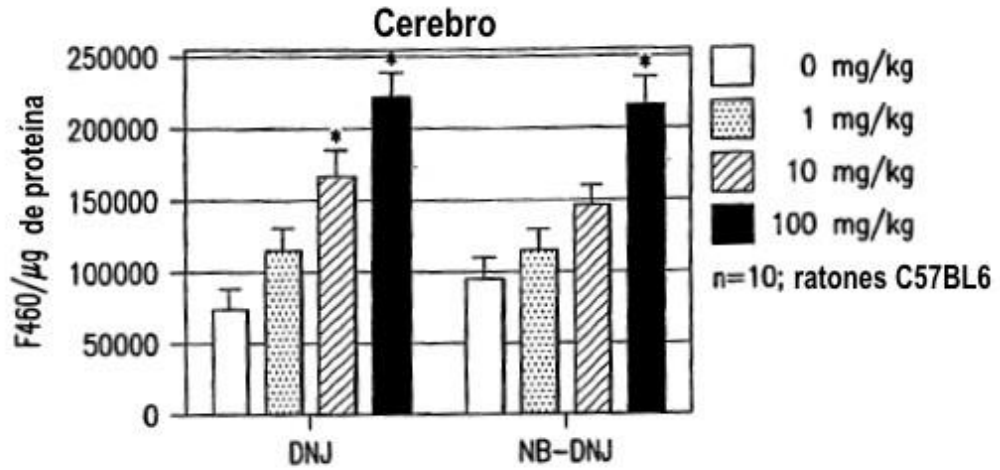


FIG.2A

Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

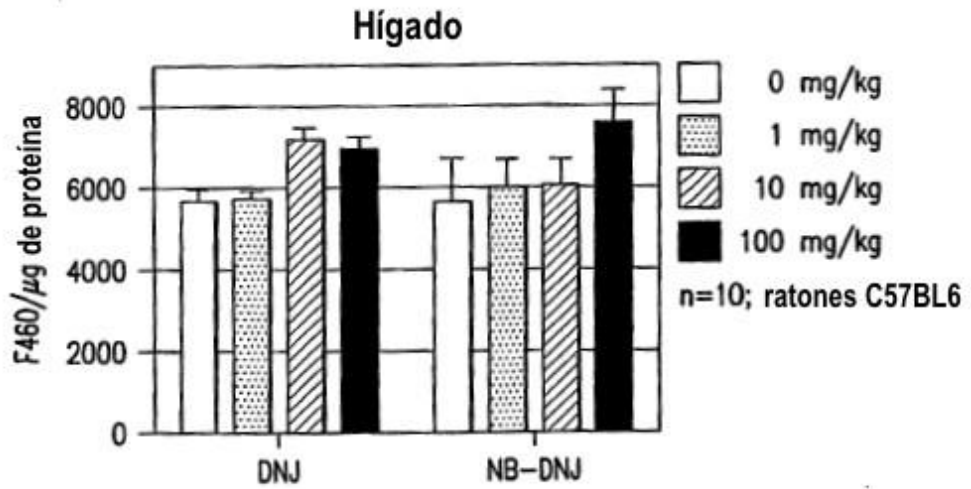
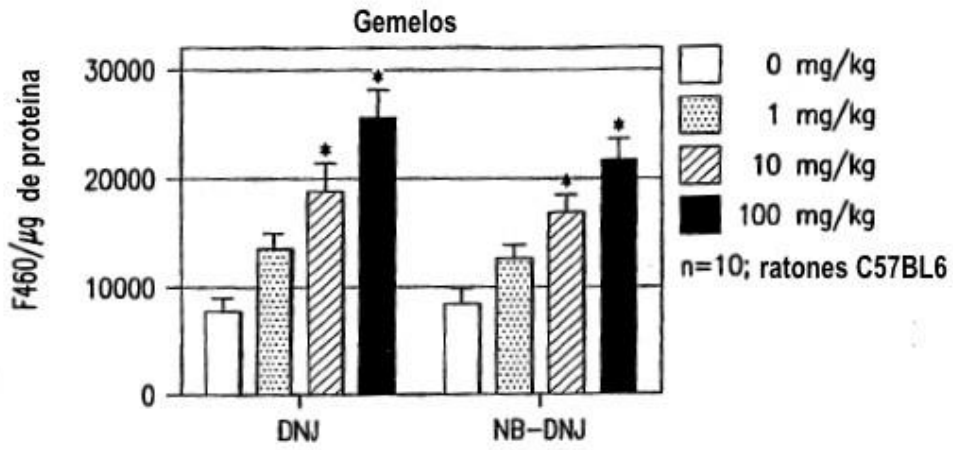


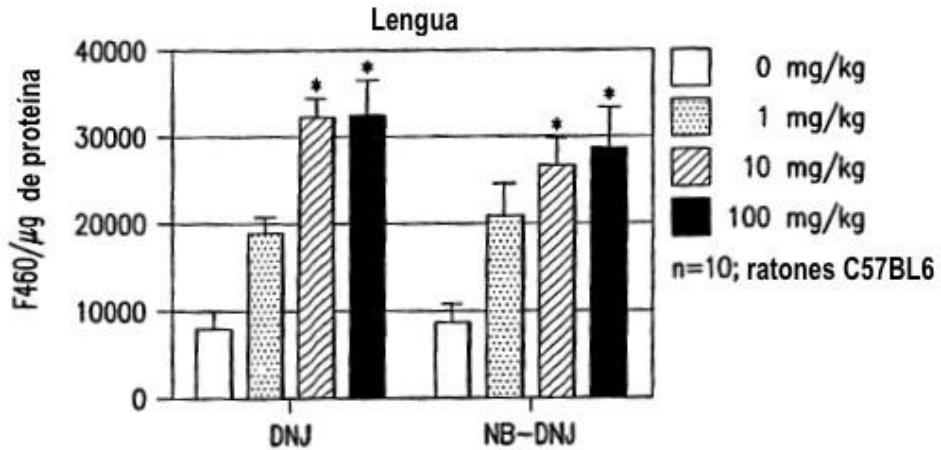
FIG.2B

**Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo**



**FIG.2C**

**Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo**



**FIG.2D**

Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

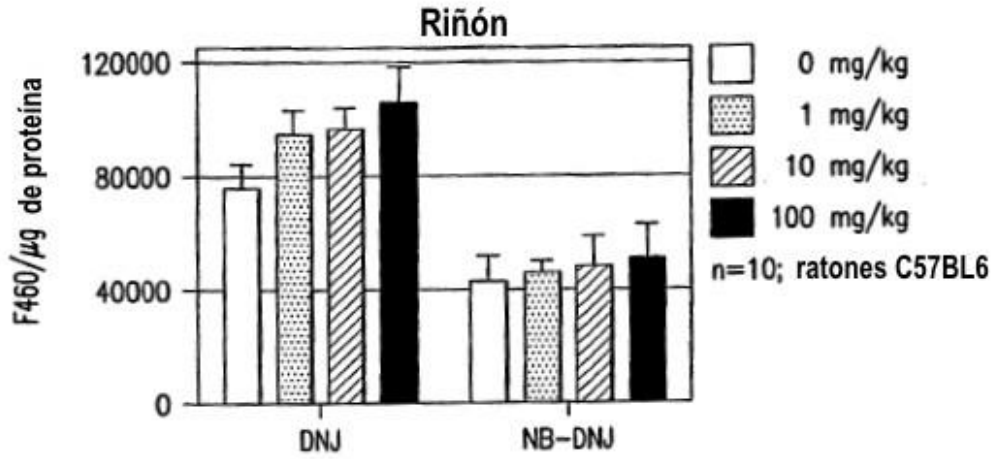


FIG.3A

Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

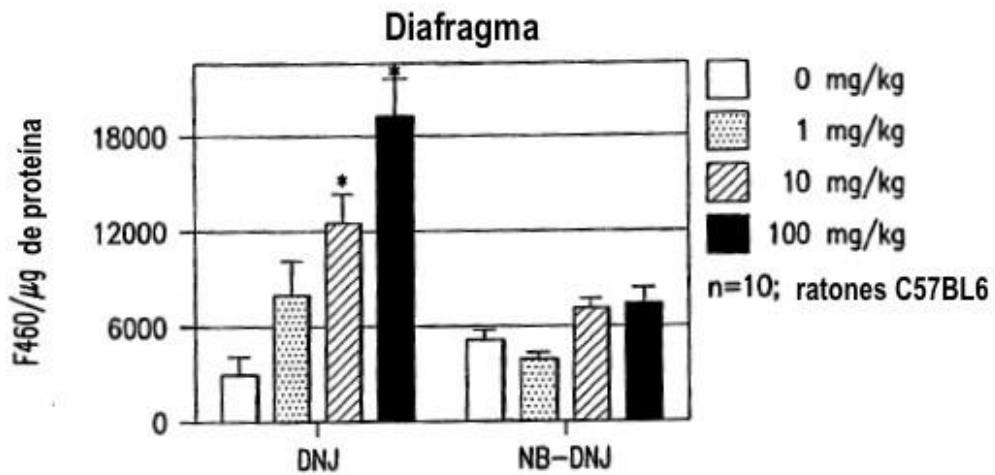
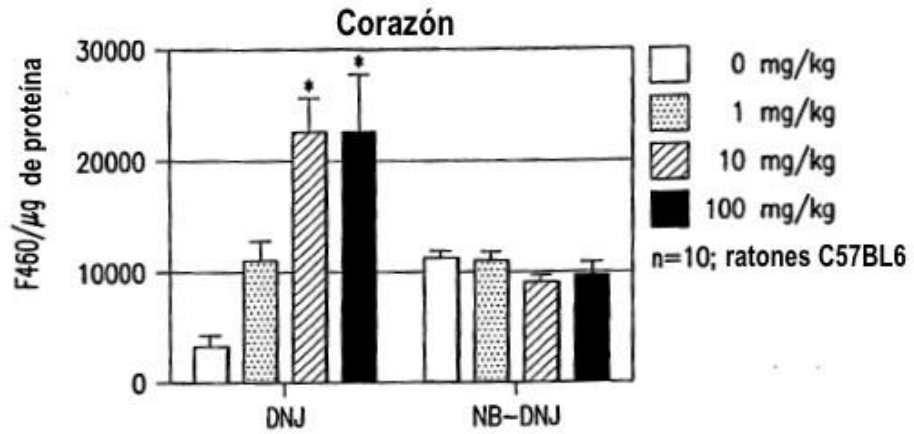


FIG.3B

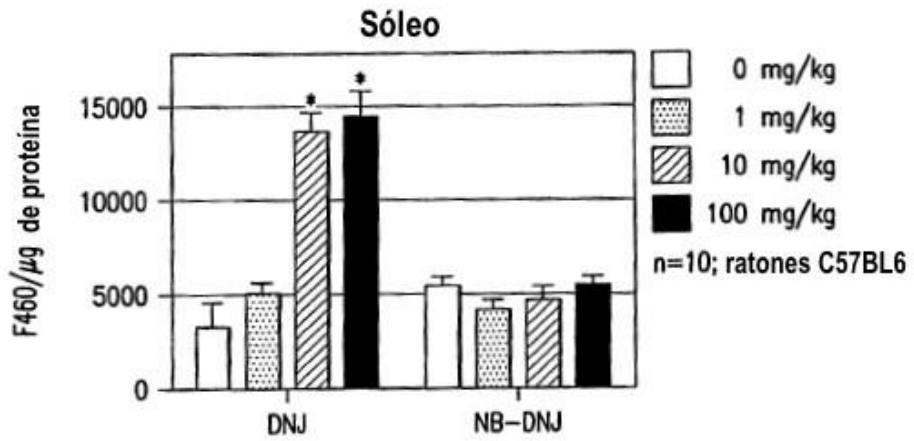


**Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo**



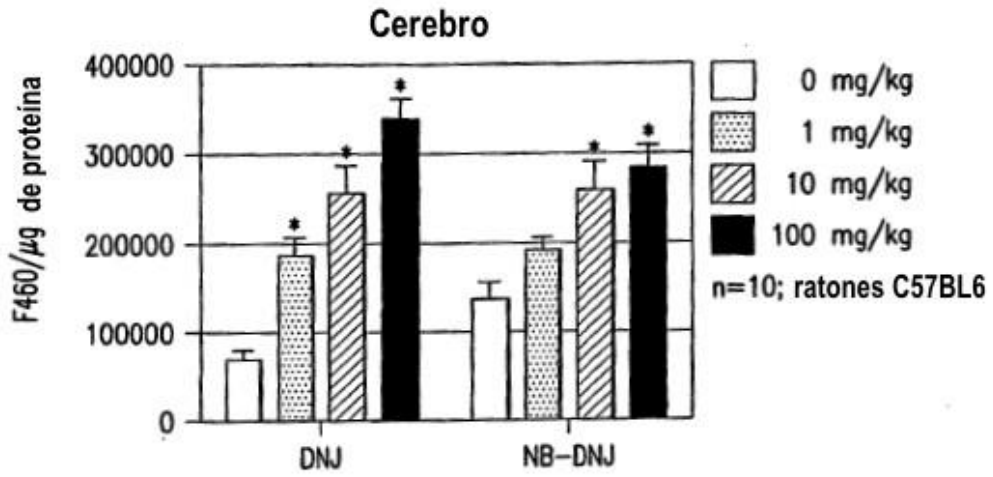
**FIG.3C**

**Comparación de tratamiento de 2 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo**



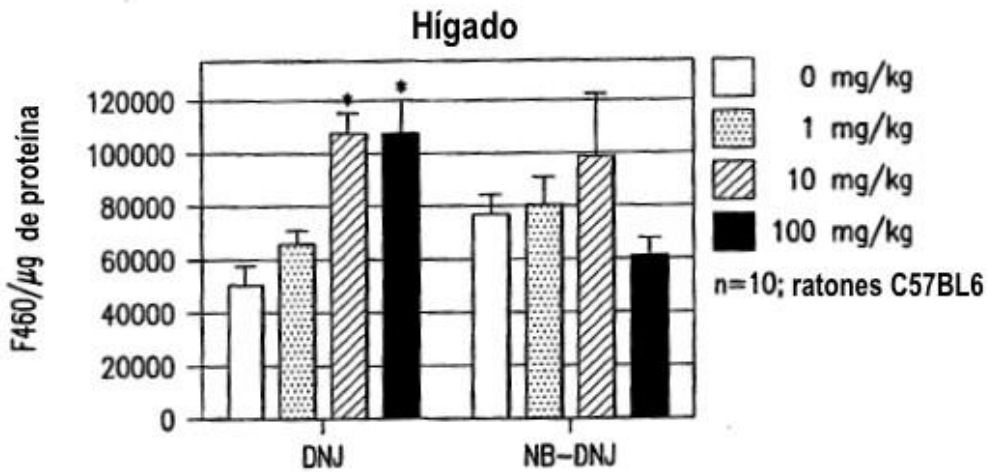
**FIG.3D**

**Comparación de tratamiento de 4 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo**



**FIG.4A**

**Comparación de tratamiento de 4 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo**



**FIG.4B**

Comparación de tratamiento de 4 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

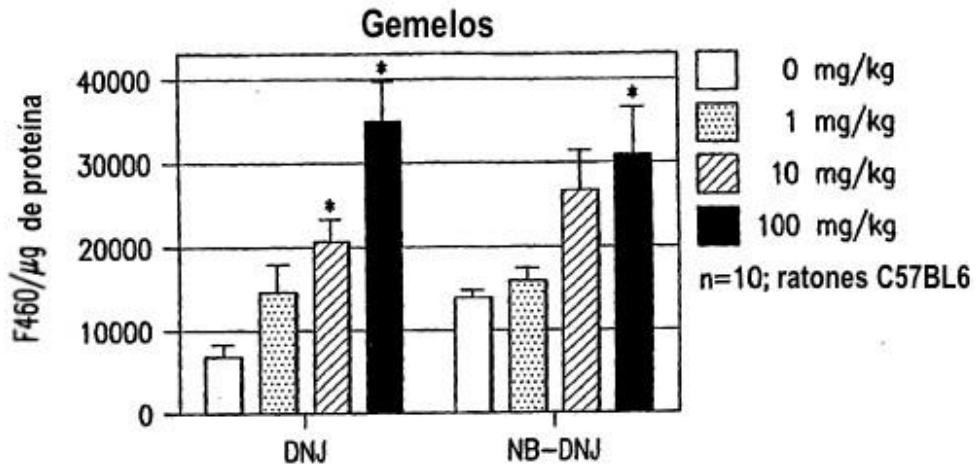


FIG.4C

Comparación de tratamiento de 4 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

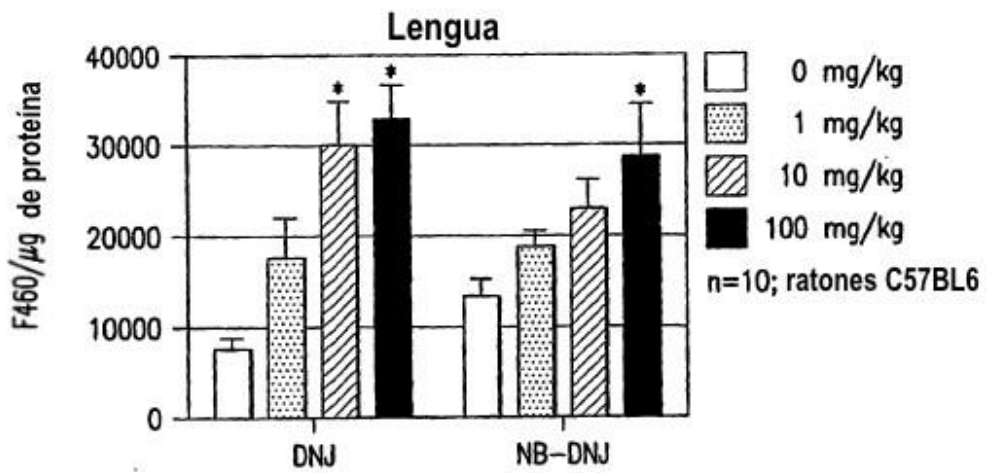


FIG.4D

Comparación de tratamiento de 4 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

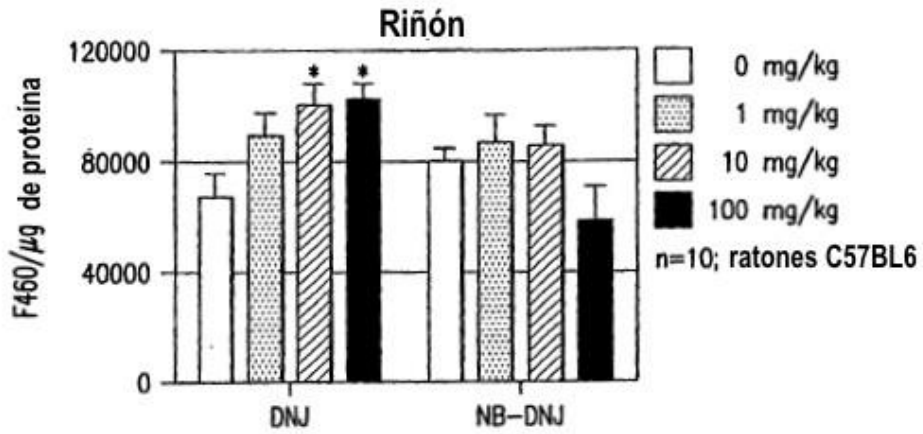


FIG. 5A

Comparación de tratamiento de 4 semanas de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo

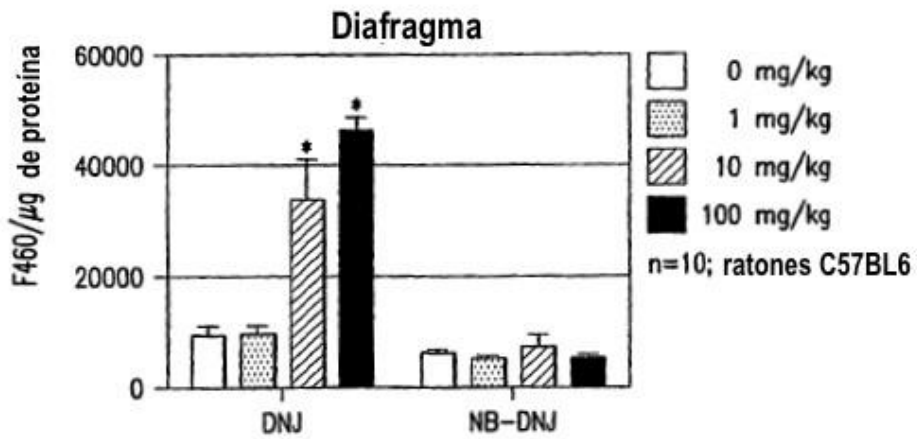


FIG. 5B

**Comparación de tratamiento de 4 semanas  
de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo  
Corazón**

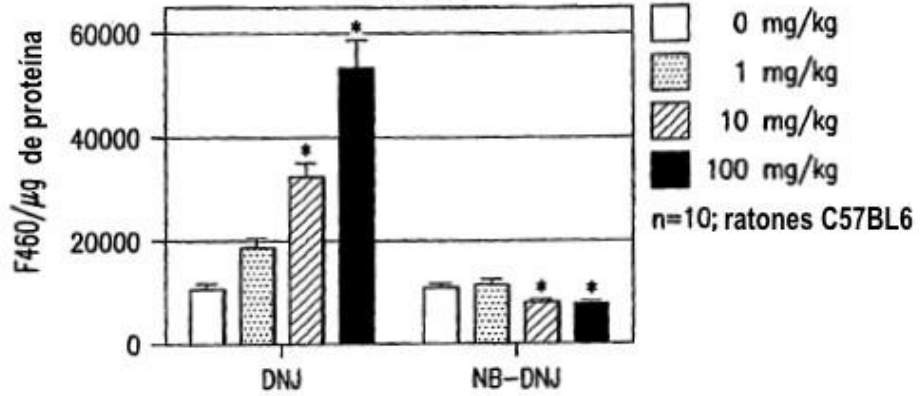


FIG.5C

**Comparación de tratamiento de 4 semanas  
de AT2220 y AT2221 sobre la actividad de Gaa in vivo  
Sóleo**

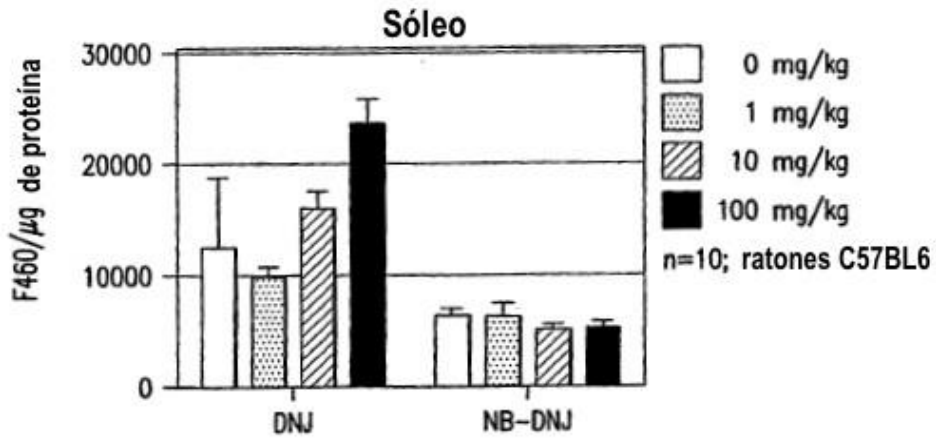


FIG.5D

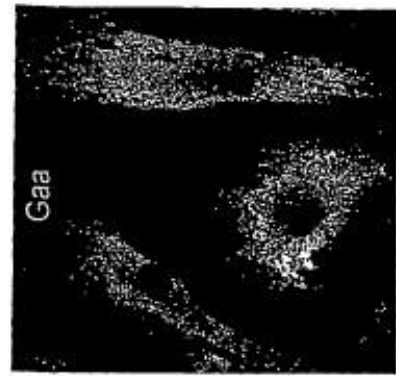


FIG.6B

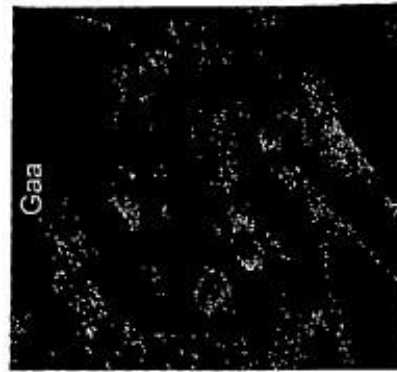


FIG.6D

PM8  
(defecto de corte  
y empalme)

Natural



FIG.6A



FIG.6C

PM8  
(defecto de corte  
y empalme)

Natural

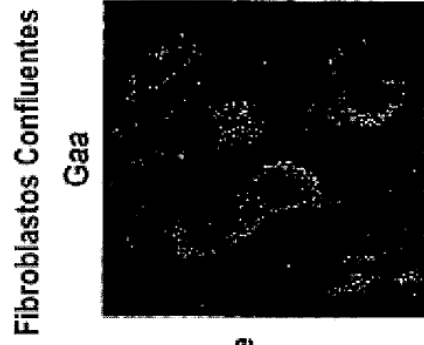


FIG.6F

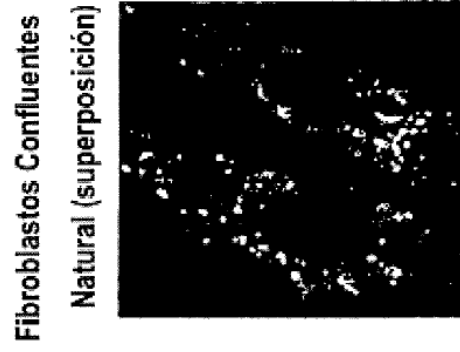


FIG.6H

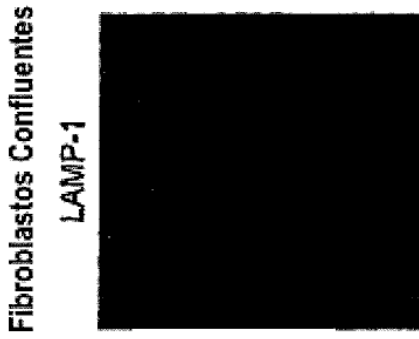


FIG.6E

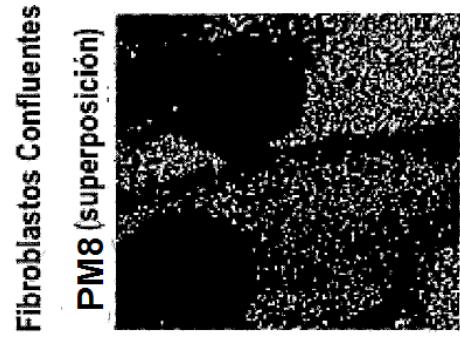


FIG.6G

PM8  
(defecto de corte  
y empalme)

PM8  
(defecto de corte  
y empalme)

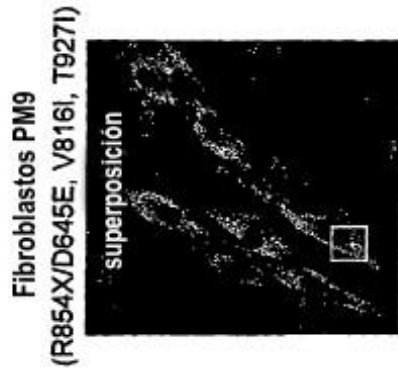


FIG.7A



FIG.7B

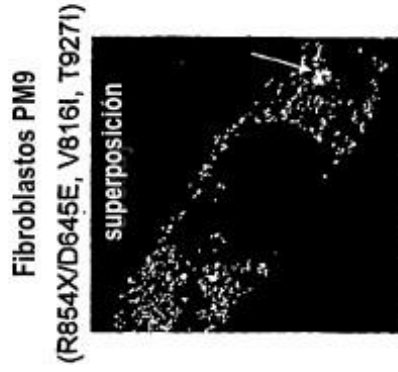


FIG.7C

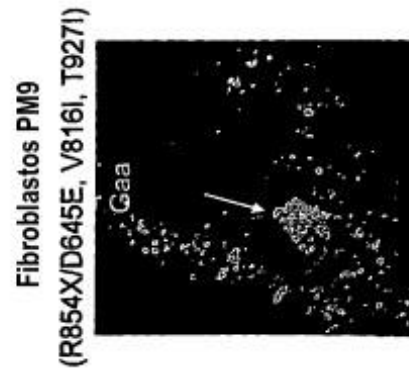


FIG.7D

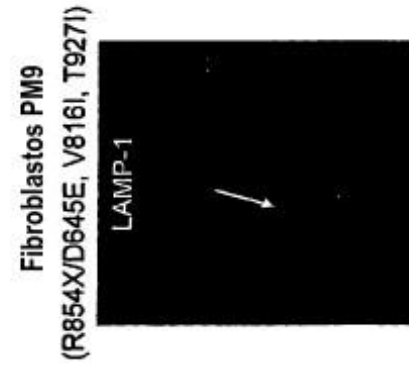


FIG.7E

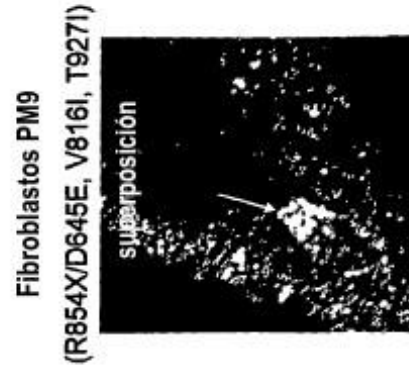
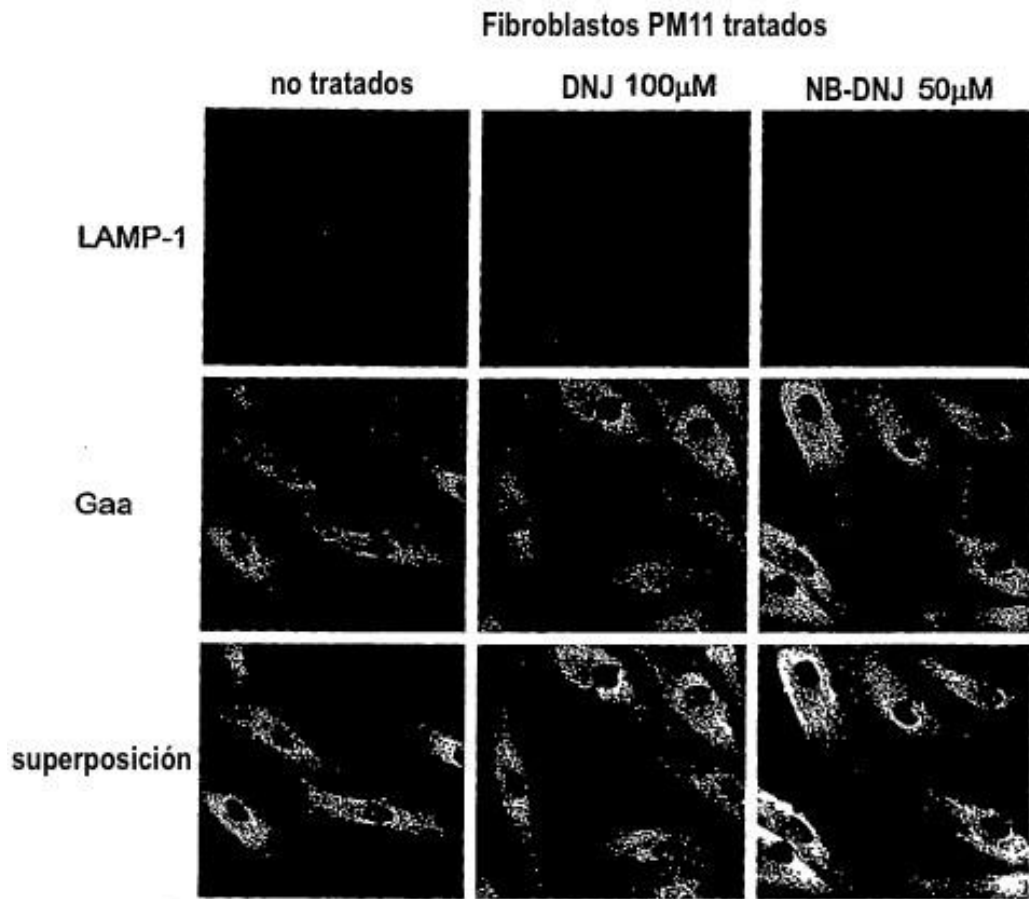


FIG.7F





**FIG.8**