

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 774**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/45 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/005363**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13091897**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12815644 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021 EP 2793872**

54 Título: **Combinación de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una enzima lisosomal y Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol**

30 Prioridad:

22.12.2011 EP 11010078

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.10.2021

73 Titular/es:

**CENTOGENE IP GMBH (100.0%)
c/o Centogene GmbH, Am Strande 7
18055 Rostock, DE**

72 Inventor/es:

**LUKAS, JAN;
PEWS-DAVTYAN, ANAHIT;
BELLER, MATTHIAS y
ROLFS, ARNDT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 864 774 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

Combinación de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una enzima lisosomal y Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol

5 La presente invención está relacionada con una combinación que comprende un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, la combinación para su uso en un método para el tratamiento de un sujeto, el uso de la combinación para la fabricación de un medicamento, una preparación farmacéutica que comprende un primer constituyente, un segundo constituyente, opcionalmente un constituyente adicional, en donde el primer constituyente es una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, un método para preparar la preparación farmacéutica, una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad, y Ambroxol o derivados del mismo para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad.

15 Las enfermedades por almacenamiento lisosomal, también denominadas en la presente memoria trastornos por almacenamiento lisosomal o LSD, son un grupo de trastornos metabólicos hereditarios raros que resultan de defectos en la función lisosomal (Winchester B et al. (2000), Biochem. Soc. Trans. 28 (2): 150-4). Un LSD se produce cuando un orgánulo específico en las células del cuerpo - el lisosoma - no funciona correctamente. El lisosoma procesa material no deseado a través de la actividad de proteínas, tales como enzimas, en sustancias que la célula puede utilizar. Algunos de los LSD más destacados son la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Fabry.

20 Los LSD están causados por una disfunción lisosomal generalmente como consecuencia de la actividad reducida o ausente de una sola proteína, tal como una enzima lisosomal, que se requiere para el metabolismo de lípidos, glicoproteínas o mucopolisacáridos.

25 Al igual que otras enfermedades genéticas, los individuos heredan típicamente un LSD de sus padres. Individualmente, un LSD ocurre con frecuencias de menos de aproximadamente 1:100.000 a 1:250.000, sin embargo, como grupo, la incidencia es de aproximadamente 1:5.000 - 1:10.000. La gran mayoría de estos trastornos se heredan de forma autosómica recesiva; solo unos pocos se heredan ligados al cromosoma X, tales como la enfermedad de Fabry y el síndrome de Hunter.

Aunque cada trastorno es el resultado de diferentes mutaciones génicas que se traducen en una deficiencia o reducción de la actividad de una proteína lisosomal, todos comparten una característica bioquímica común - casi todos los trastornos lisosomales se originan por una acumulación anormal de sustancias dentro del lisosoma que se debe a una deficiencia o reducción de la actividad de la proteína lisosomal particular.

30 Los LSD afectan principalmente a los niños y, a menudo, mueren a una edad temprana e impredecible, muchos a los pocos meses o años de nacer. Muchos niños mueren por esta enfermedad después de años de sufrir diversos síntomas de su trastorno particular. Los síntomas de los LSD varían, dependiendo del trastorno en particular y otras variables, como la edad de aparición, y pueden ser de leves a graves. Pueden incluir retraso en el desarrollo, trastornos del movimiento, convulsiones, demencia, sordera y/o ceguera. Algunas personas con LSD tienen hígados agrandados (hepatomegalia) y bazo agrandados (esplenomegalia), problemas pulmonares y cardíacos y huesos que se desarrollan de manera anormal.

40 Hasta ahora, no hay curas causales disponibles para los LSD. Las terapias que se han probado con diferente éxito al menos en modelos animales comprenden terapia de reemplazo enzimático, trasplante de médula ósea, terapia de reducción de sustrato, terapia génica y terapia con chaperonas farmacológicas. Aunque la técnica experimental de la terapia génica puede ofrecer dichas curas en el futuro, las terapias disponibles en la actualidad son principalmente sintomáticas.

45 En la terapia de reemplazo enzimático, también denominada en la presente memoria ERT, la enzima sintetizada o expresada de forma recombinante se administra por vía intravenosa, lo que compensa la deficiencia de la enzima afectada. Los receptores celulares median la captación de la enzima recombinante. La necesidad constante de tratamiento, los costes asociados con el mismo y, en particular, la dependencia de la captación mediada por el receptor celular, son desventajas en la ERT.

50 Se ha supuesto que el trasplante de médula ósea, también denominado en la presente memoria BMT, es una terapia para el tratamiento de los LSD. Sin embargo, la eficacia y efectividad de esta terapia es dudosa o puede ser insuficiente, ya que aún no se sabe si el número de células transferidas por BMT proporcionará suficiente enzima ausente para tratar con éxito a los pacientes que padecen un LSD en general.

En la terapia de reducción de sustrato, también denominada en la presente memoria SRT, la inhibición aguas arriba de las rutas biológicas da como resultado la reducción del sustrato producido para que la enzima lo procese. En SRT, los efectos adversos pueden resultar de la influencia de las sustancias aplicadas en otros procesos celulares.

55 La terapia con chaperonas farmacológicas, también denominada en la presente memoria PCT, es una técnica usada para estabilizar la proteína lisosomal que tiene una actividad reducida producida por los pacientes y se examinó para determinados LSD. La PCT se basa en el uso de moléculas chaperonas que ayudan al plegamiento de enzimas

mutadas y mejoran su estabilidad y transporte lisosomal.

En la enfermedad de Pompe se mostró que la desoxinojirimicina, un iminoazúcar también denominado en la presente memoria DNJ, aumenta la actividad de la α -glucosidasa ácida, la enzima mutada en la enfermedad de Pompe (Parenti G. et al., Mol Ther. 2007 marzo; 15 (3): 508-14. Epub 2007 9 de enero).

- 5 En la enfermedad de Fabry, que está causada por mutaciones de la alfa-galactosidasa A lisosomal, también denominada en la presente memoria GLA o α -Gal A, la 1-desoxigalactonojirimicina, también denominada en la presente memoria DGJ, AT1001 o Migalastat, un inhibidor de GLA, sirve como una chaperona farmacológica y aumenta la actividad de la enzima mutada (Asano N. et al., Eur J Biochem. 2000 jul; 267 (13): 4179-86).

10 Por tanto, los iminoazúcares tales como DGJ o DNJ pueden usarse selectivamente como chaperonas farmacológicas para ayudar a la reorganización de proteínas lisosomales que tienen actividad reducida, tales como proteínas lisosomales mutantes, y permitir el tratamiento de pacientes con LSD tal como la enfermedad de Fabry o la enfermedad de Pompe. La chaperona farmacológica administrada en una dosis efectiva puede causar un incremento de la actividad enzimática reducida por mutación. Sin embargo, un experto en la técnica reconocerá que la administración de chaperonas farmacológicas, tales como iminoazúcares, tales como, por ejemplo, la isofagomina aplicada en la enfermedad de Gaucher, debe dosificarse exactamente, por ejemplo, en un esquema en el que la dosificación va seguida de un período de descanso que permite que la célula y la enzima se deshagan temporalmente del inhibidor para mostrar un efecto beneficioso (Khanna et al; FEBS Journal 277 (2010) 1618-1638). También se reconocerá que la distinción entre concentraciones inhibitoras y subinhibidoras es difícil y debe evaluarse en estudios *in vivo*. Mientras se trata la enfermedad de Fabry, es decir, GLA mutante en un entorno libre de células, las dosificaciones muy por debajo de 1 μ M ya son inhibitoras (Asano et al., supra). Asano y colegas demostraron una disminución de la actividad de GLA en los linfoblastos de los pacientes mientras se excedía la concentración de DGJ 100 μ M. En un sistema de sobreexpresión de GLA basado en cultivo celular, las concentraciones de hasta 1mM (Wu et al., Hum Mutat, ago 2011; 32 (8): 965-77) se toleran sin ninguna inhibición detectable de la enzima mutante ensayada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que también se incluye un período de lavado en la configuración experimental allí descrita, es decir, dos horas antes de la realización del ensayo, se elimina el medio que contiene la chaperona farmacológica, lo que es indicativo de una alteración del ensayo por altas concentraciones de iminoazúcares, es decir, inhibición. De acuerdo con esto, también se reconocerá que una terapia que usa dosis más altas es difícil de establecer en pacientes y, por lo tanto, debe considerarse cuidadosamente en ensayos clínicos donde se reconoce que 10 μ M es una concentración clínicamente alcanzable.

30 La terapia con chaperona farmacológica tiene como objetivo restaurar la actividad de una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida. Sin embargo, el desarrollo del tratamiento con chaperonas farmacológicas de los LSD se encuentra todavía en una etapa temprana. Su fuerte dependencia del paciente particular que se va a tratar, más específicamente del LSD particular y su causa particular, por ejemplo, una mutación particular de la proteína lisosomal específica, afectan la eficacia y efectividad de dicha terapia.

35 Además, la administración exitosa de chaperonas farmacológicas contra los LSD se ve obstaculizada por el efecto inhibitor y la toxicidad potencial cuando se administran dosis altas de chaperonas farmacológicas (Wu et al., supra; Asano et al., supra y Khanna et al., supra).

WO 2007/137072 A2 se refiere a métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar si un paciente con enfermedad de Fabry responderá al tratamiento con una chaperona farmacológica específica.

40 Bendikov-Bar I et al. (Blood Cells, Molecules, and Diseases 46 (2011), p. 4-10) informan sobre la caracterización del proceso ERAD de la variante de glucocerebrosidasa mutante L444P.

Asano N et al. (Eur. J. Biochem. 267, 4179-4186) informan sobre la inhibición *in vitro* y el aumento intracelular de la actividad de la α -galactosidasa A lisosomal en los linfoblastos de Fabry por la 1-desoxigalactonojirimicina y sus derivados.

45 El problema subyacente a la presente invención es proporcionar un medio para el tratamiento de los LSD y métodos para el tratamiento de los LSD.

Otro problema subyacente a la presente invención es potenciar la actividad proteica de una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida.

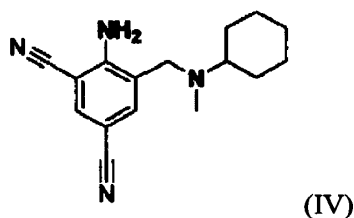
Otro problema más de la presente invención es aumentar la eficacia y efectividad de una terapia con chaperona farmacológica en el tratamiento de los LSD.

50 Estos y otros problemas subyacentes a la presente invención se resuelven mediante el contenido de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

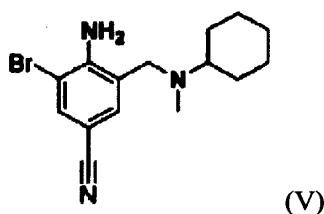
Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un primer aspecto mediante una combinación que comprende un primer constituyente y un segundo constituyente,

en donde el primer constituyente es una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona es un imino azúcar seleccionado del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetilglucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A₃, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y

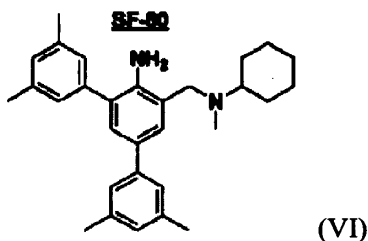
en donde el segundo constituyente es Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un compuesto de la fórmula (V)

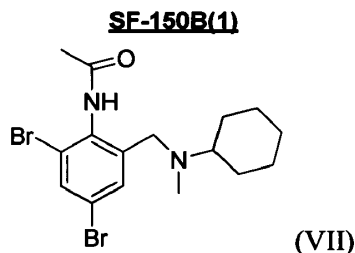


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un compuesto de fórmula (VI)



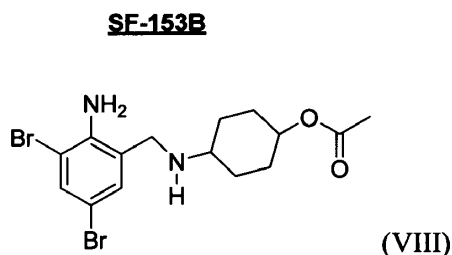
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

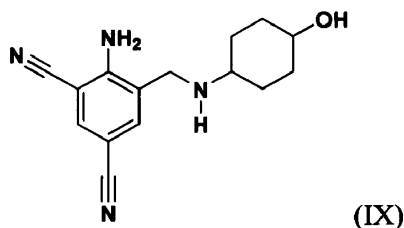
un compuesto de fórmula (VIII)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una realización del primer aspecto, la proteína lisosomal está afectada en una enfermedad, y en donde la proteína lisosomal se selecciona del grupo que consiste en alfa-galactosidasa A y alfa-glucosidasa.

En una realización del primer aspecto, la combinación es una combinación farmacéutica.

15 En una realización del primer aspecto, la combinación es adecuada o es para su uso en un método para el tratamiento de un sujeto que comprende la administración de la combinación al sujeto. En una realización del primer aspecto, el sujeto padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad, en donde la enfermedad se caracteriza por una enzima que tiene una actividad reducida, en donde la enzima que tiene una actividad reducida se selecciona del grupo que consiste en alfa-galactosidasa A y alfa-glucosidasa.

En una realización del primer aspecto, la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Schindler-Kanzaki, la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Parkinson.

20 En una realización del primer aspecto, la enzima es alfa-galactosidasa A y la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Schindler-Kanzaki y la enfermedad de Parkinson.

En una realización del primer aspecto, la enzima es alfa-glucosidasa y la enfermedad es la enfermedad de Pompe.

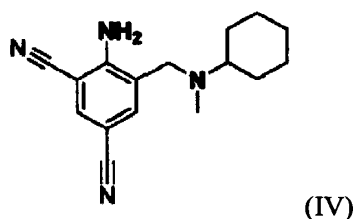
25 Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un segundo aspecto mediante el uso de la combinación según el primer aspecto, incluyendo cualquier realización de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad.

Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un tercer aspecto mediante una preparación farmacéutica que comprende un primer constituyente, un segundo constituyente opcionalmente un constituyente adicional,

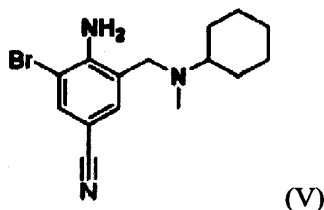
en donde el primer constituyente es una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en

5 donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina , alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butildesoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butildesoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ) , 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A₃, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 10 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamidogalanojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

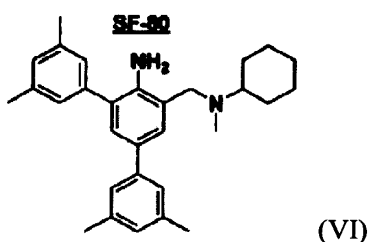
15 en donde el segundo constituyente es ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)



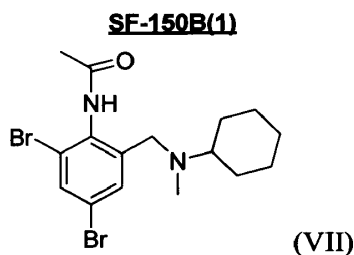
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de la fórmula (V)



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de fórmula (VI)

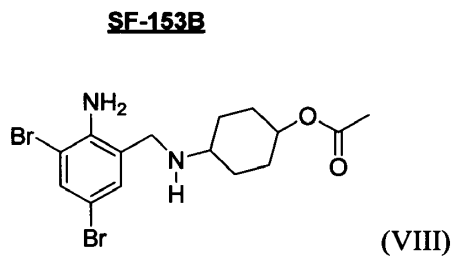


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de fórmula (VII)



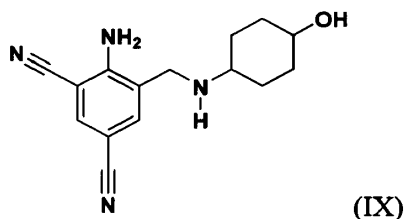
25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VIII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un agente farmacéuticamente activo, y

10 en donde preferiblemente la preparación farmacéutica incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal, y en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida.

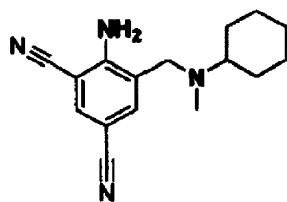
Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto mediante un método para preparar una preparación farmacéutica según el primer aspecto, incluyendo cualquier realización del mismo, que comprende las etapas de formular el primer constituyente y el segundo constituyente en una sola forma de dosificación o en dos formas de dosificación separadas, en donde en el caso de dos formas de dosificación separadas, una primera de las dos formas de dosificación separadas contiene el primer constituyente y una segunda de las dos formas de dosificación separadas contiene el segundo constituyente.

Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un quinto aspecto mediante una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal,

20 en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A3, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad,

30 en donde el método comprende administrar a un sujeto la chaperona y, antes, concomitantemente con o después Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)

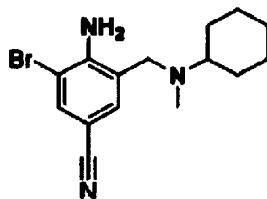
35



(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de la fórmula (V)



(V)

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

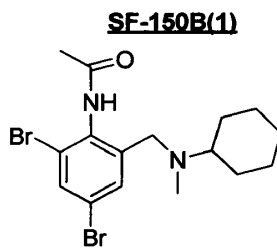
un compuesto de fórmula (VI)



(VI)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)

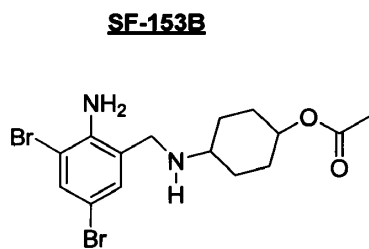


(VII)

10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VIII)

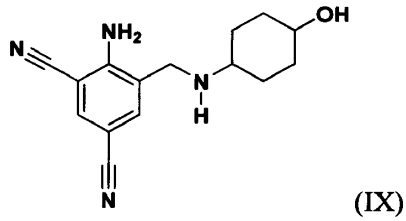


(VIII)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

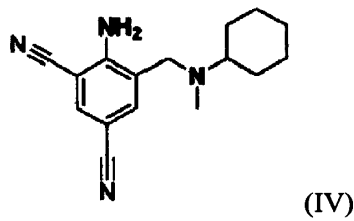
15

un compuesto de fórmula (IX)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

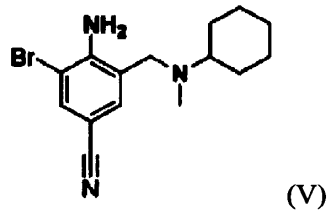
5 Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un sexto aspecto mediante Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV).



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

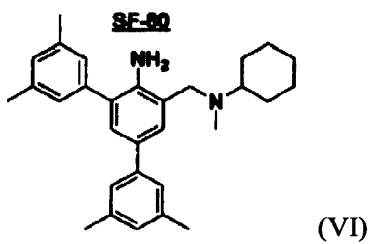
un compuesto de la fórmula (V)

10



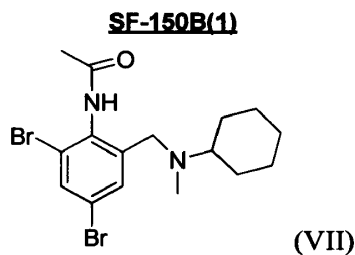
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VI)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

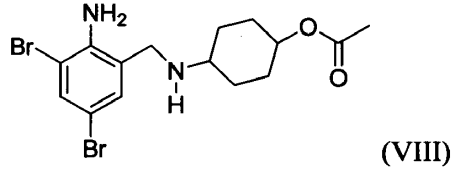
15 un compuesto de fórmula (VII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

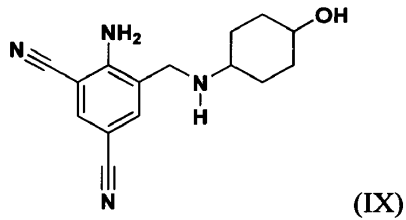
un compuesto de fórmula (VIII)

SF-153B



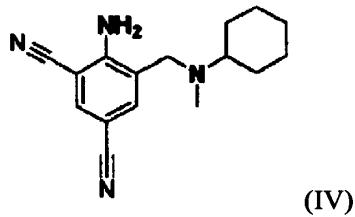
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)



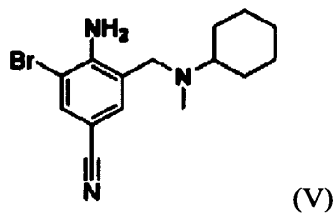
5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad, en donde el método comprende administrar a un sujeto ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)



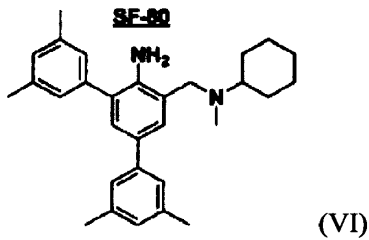
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de la fórmula (V)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

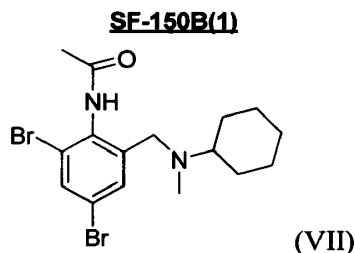
un compuesto de fórmula (VI)



15

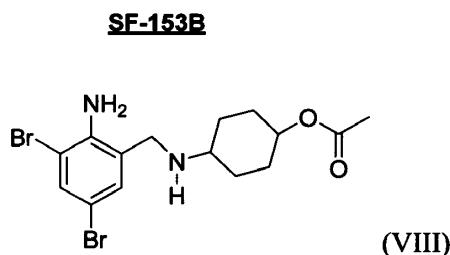
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

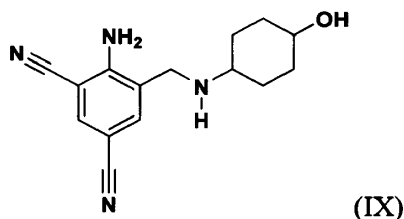
un compuesto de fórmula (VIII)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y, antes, concomitantemente con o después una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal,

15

en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A3, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25

Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve en un séptimo aspecto mediante una combinación según el primer aspecto, incluyendo cualquier realización del mismo, para su uso en un método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto, en donde el método comprende las siguientes etapas:

30

etapa a): determinar si en una muestra del sujeto la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, preferiblemente dicha actividad reducida resulta de una o más mutaciones de la proteína lisosomal en comparación con la proteína lisosomal de tipo salvaje;

etapa b): identificar un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, y en donde el compuesto es adecuado para o incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal; y

etapa c): administrar al sujeto el primer constituyente antes, concomitantemente con o después del segundo constituyente.

- En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es alfa-galactohomonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- 5 En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es alfa-alo-homonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- 10 En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es N-acetil-glucosaminatiazolina (NGT) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- 15 En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es N-butil-DNJ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- En una realización del primer, segundo, tercer y cuarto aspecto, el primer constituyente es desoxinojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo.
- 20 Se describe un método para el tratamiento de una enfermedad, en donde el método comprende administrar a un sujeto un primer constituyente como se define en uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención de la invención como se define en las reivindicaciones, antes de, concomitantemente con o después de un segundo constituyente como se define en uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, y/o una combinación según uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones.
- 25 También se describe un método para incrementar la actividad de una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el método comprende administrar a una célula un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal y ambroxol y/o un derivado del mismo.
- Igualmente se describe un método para incrementar la actividad de una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el método comprende administrar a un sujeto un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal, y ambroxol y/o un derivado del mismo, en donde el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal incrementa la actividad de la proteína lisosomal.
- 30 Se describe un método para incrementar la actividad de una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el método comprende, administrar a un sujeto un primer constituyente como se define en uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones y, antes de, concomitantemente con o después un segundo constituyente como se define en uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, y/o una combinación según uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones y/o una preparación farmacéutica según el tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, en donde la combinación y/o la preparación farmacéutica incrementa la actividad de la proteína lisosomal.
- 35 La presente descripción también se refiere a una combinación que comprende un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida en donde la actividad reducida se reduce debido a una mutación de la proteína lisosomal, y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado de Ambroxol, en donde la combinación es preferiblemente una combinación según uno cualquiera del primer, segundo y tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto, en donde el método comprende las siguientes etapas:
- 40 etapa a): determinar si en una muestra del sujeto la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, preferiblemente dicha actividad reducida resulta de una o más mutaciones de la proteína lisosomal en comparación con la proteína lisosomal de tipo salvaje;
- 45 etapa b): identificar un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, y en donde el compuesto es adecuado para o incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal; y
- etapa c): administrar al sujeto el primer constituyente antes, concomitantemente con o después del segundo constituyente.
- 50 La presente descripción también se refiere a una preparación farmacéutica que comprende un primer constituyente,

un segundo constituyente y opcionalmente un constituyente adicional,

en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde la actividad reducida se reduce debido a una mutación de la proteína lisosomal, y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado de Ambroxol, en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende excipientes farmacéuticamente aceptables y agentes farmacéuticamente activos, en donde la preparación farmacéutica es preferiblemente una preparación farmacéutica según el tercer aspecto de la invención como se define en las reivindicaciones, para su uso en un método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto, en donde el método comprende las siguientes etapas:

etapa a): determinar si en una muestra del sujeto la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, preferiblemente dicha actividad reducida resulta de una o más mutaciones de la proteína lisosomal en comparación con la proteína lisosomal de tipo salvaje;

etapa b): identificar un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, y en donde el compuesto es adecuado para o incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal; y

etapa c): administrar al sujeto el primer constituyente antes, concomitantemente con o después del segundo constituyente.

En una realización del primer, segundo, tercer, cuarto, sexto y séptimo aspecto, el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal es una chaperona.

En una realización del primer, segundo, tercer, cuarto, sexto y séptimo aspecto, la chaperona es una chaperona farmacológica o una sal, solvato o derivado farmacéuticamente aceptable de la misma.

Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que el uso combinado de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida y ambroxol o un derivado de Ambroxol es adecuado para el tratamiento de los LSD tales como la enfermedad de Fabry y la enfermedad de Pompe. En dicha combinación, preferiblemente el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida es una chaperona, preferiblemente una chaperona farmacológica.

Más específicamente, los presentes inventores cuando realizan experimentos en un sistema de cultivo celular que es un modelo reconocido para los LSD y la enfermedad de Fabry en particular (Ishii et al.; Biochem. J. (2007) 406, 285-295; Shin et al.; Pharmacogenet Genomics. sep 2008; 18 (9): 773-780; Parenti G et al., Mol Ther. 2007; 15: 508-14; Okumiya T et al., Mol Genet Metab 2007 ene; 90 (1): 49-57) han descubierto que cuando se administra DGJ de galactosa junto con ambroxol, la actividad de la alfa-galactosidasa A mutante se incrementa de forma sorprendente e inesperada en comparación con el efecto que surge de la administración de DGJ o galactosa solamente.

Al realizar estudios adicionales, los presentes inventores también descubrieron que cuando se administra NB-DNJ junto con ambroxol, la actividad de la α -glucosidasa ácida mutante se incrementa de forma sorprendente e inesperada en comparación con el efecto que surge de la administración de NB-DNJ solamente.

En conexión con esto, es particularmente digno de mención que, como también descubrieron los presentes inventores, la administración de ambroxol solo, es decir, sin DGJ, no exhibe ningún efecto potenciador sobre la actividad de la alfa-galactosidasa A en mutantes de la alfa-galactosidasa A que frecuentemente dan como resultado la enfermedad de Fabry, y que la administración de ambroxol solo, es decir, sin NB-DNJ, no exhibe ningún efecto potenciador sobre la actividad de la α -glucosidasa ácida en mutantes de la α -glucosidasa ácida que frecuentemente dan como resultado la enfermedad de Pompe.

Es el mérito de los presentes inventores haber descubierto que la administración de una combinación según la presente invención es ventajosa sobre el aumento de la actividad de la proteína lisosomal que tiene una actividad reducida con un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal solo. Más particularmente, la administración de ambroxol y/o un derivado de ambroxol en combinación con dicho compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal aumenta aún más la actividad de la proteína lisosomal que tiene una actividad proteica reducida en comparación con la administración de dicho compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal solo. Por tanto, la administración de una combinación de la presente invención es ventajosa sobre la administración del compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal solo porque se logra un aumento adicional de la actividad de la proteína que tiene una actividad reducida y/o puede administrarse una cantidad significativamente menor del compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal a un paciente dando como resultado el mismo o similar efecto beneficioso del tratamiento como si el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal se administrara solo a una concentración más alta o en una cantidad más alta.

Más particularmente, es el mérito de los presentes inventores haber descubierto que el uso combinado de una chaperona farmacológica y Ambroxol y/o un derivado de ambroxol es adecuado para incrementar la actividad de una proteína mutante en el tratamiento de un LSD tal como la enfermedad de Fabry en comparación con la aplicación de dicha chaperona farmacológica sola. La cantidad de chaperona farmacológica administrada a un sujeto puede

reducirse si la chaperona farmacológica se administra como el primer constituyente de la combinación según la presente invención y dará como resultado un nivel de actividad igual o similar o un nivel de actividad más alto de la proteína lisosomal como si la chaperona farmacológica se administrara sola en una cantidad más alta.

5 Además, una persona experta en la técnica reconocerá que cualquier característica, ventaja, realización y cualquier declaración hecha en la presente memoria en relación con una combinación de la presente invención se aplica igualmente a una preparación farmacéutica según la presente invención, un método según la presente invención, un uso según la presente invención, y viceversa.

10 Además, una persona experta en la técnica reconocerá que cualquier característica, ventaja, realización y cualquier declaración hecha en la presente memoria en relación con cualquier aspecto de la presente invención se aplica igualmente a todos y a cualquiera de los otros aspectos de la presente invención. El término "actividad reducida" de una proteína lisosomal tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significa que la actividad de una proteína lisosomal, p. ej., una proteína lisosomal que es una proteína lisosomal mutante resultante de una mutación, se reduce en comparación con un control, tal como una proteína control, por ejemplo, dicha proteína sin dicha mutación. En una realización, dicha actividad reducida es la actividad de una enzima que se reduce debido a una mutación de dicha enzima en comparación con una actividad de dicha enzima sin dicha mutación y en donde, preferiblemente, dicha actividad enzimática reducida da como resultado una enfermedad, p. ej., un LSD, tal como la enfermedad de Fabry.

20 Otra ventaja de la combinación según la presente invención es que la actividad de una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida, en donde el tratamiento con una chaperona farmacológica sola no da como resultado un incremento de la actividad de la proteína lisosomal mutante suficiente como para tratar a un sujeto, puede elevarse a un nivel suficiente para el tratamiento, preferiblemente el tratamiento terapéutico del sujeto. En otras palabras, en particular mutantes de proteínas lisosomales en donde el tratamiento con una chaperona farmacológica particular da como resultado un incremento de la actividad de las proteínas mutantes lisosomales, el incremento es demasiado bajo como para tratar al sujeto. Si la chaperona farmacológica se administra como un primer constituyente de la combinación según la presente invención, el incremento de la actividad de la proteína lisosomal mutante puede ser suficiente como para tratar al sujeto.

25 Un tratamiento suficiente tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente es un tratamiento que da como resultado la elevación y/o el incremento de la actividad de una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida debido a una mutación, es decir, una proteína mutante lisosomal, a un nivel del 20 %, preferiblemente del 25 %, de la actividad de la proteína lisosomal que no tiene la mutación y preferiblemente determinada en ausencia de tratamiento. En una realización, dicho tratamiento suficiente da como resultado un efecto terapéutico que incluye, pero no está limitado a, el tratamiento del LSD que padece el sujeto o al menos una mejora de los síntomas del sujeto que padece el LSD.

30 Una persona experta reconocerá inmediatamente que son conocidos por un experto en la técnica diversos métodos para determinar la actividad de una proteína, tal como la actividad de una enzima, y así determinar si dicha actividad se reduce en comparación con un control tal como una proteína sin mutación o mutaciones que da como resultado dicha actividad reducida y dependen particularmente de la proteína cuya actividad se determina y, preferiblemente, se compara con un control. Por ejemplo, la determinación de la actividad de α -galactosidasa A y/o α -glucosidasa se describe como medición enzimática de α -galactosidasa A y α -glucosidasa en el Ejemplo 1 de la presente memoria, respectivamente. Con el fin de determinar la actividad de la β -hexosaminidasa A/B y/o si dicha actividad se reduce se usa preferiblemente el ensayo como se describe en Wood et al. (Wood, S y Macdougall, BG Am J Hum Genet 28: 489-495, 1976). Con el fin de determinar la actividad de la beta-galactosidasa y/o si dicha actividad se reduce se usa preferiblemente el ensayo como se describe en Yang et al. (Yang et al., Journal of Biomedical Science 2010, 17:79).

35 Una persona experta en la técnica reconocerá que en ciertas enfermedades que resultan de la actividad reducida de una proteína lisosomal que típicamente resulta de una mutación de dicha proteína lisosomal, la administración de ambroxol solo da como resultado un aumento de la actividad de una/la proteína lisosomal mutante. Por lo tanto, es importante comprender que la presente invención se basa en el hallazgo de que el efecto de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína que tiene actividad reducida, tal como una chaperona farmacológica, aumenta cuando se administra junto con ambroxol y/o un derivado de ambroxol, en donde la administración de ambroxol y/o un derivado de ambroxol no potencia la actividad de la proteína que tiene actividad reducida cuando se administra solo. La administración de dicha combinación es, por tanto, ventajosa sobre la administración de dicho compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína que tiene actividad reducida solo, ya que ambroxol potencia la actividad de dicho compuesto.

45 En conexión con esto, un experto en la técnica reconocerá que cualquier derivado de Ambroxol y/o bromhexina que potencia la actividad de una/la proteína que tiene actividad reducida cuando se administra en combinación con dicho compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una/la proteína que tiene actividad reducida es adecuado para la práctica de la presente invención.

50 Un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significa una molécula pequeña que se une reversiblemente a la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, resultando dicha unión en un incremento de la actividad reducida, es decir, dicha

unión da como resultado una actividad que es más alta en comparación con la actividad de la proteína lisosomal sin el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una/la proteína lisosomal tiene actividad reducida. Preferiblemente, dicha unión corrige un defecto de plegamiento de la proteína que tiene actividad reducida mediante un efecto estabilizador. Más preferiblemente, dicha unión evita la degradación de dicha proteína. Una molécula pequeña tal y como se usa en la presente memoria es preferiblemente una molécula pequeña según la regla de cinco de Lipinski. En una realización de la combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones, el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida es preferiblemente una chaperona y más preferiblemente es una chaperona farmacológica. En una realización preferida de la combinación según la presente invención, un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, es capaz de incrementar y/o elevar la actividad reducida. En una realización adicional, un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal es un compuesto que es capaz de incrementar y/o elevar la actividad reducida independientemente de si dicho compuesto tiene la capacidad o no de reorganizar una proteína lisosomal, es decir, la actividad de la proteína lisosomal es más alta cuando el compuesto está presente en comparación con la actividad de la proteína lisosomal cuando el compuesto no está presente.

Una persona experta en la técnica reconocerá que una chaperona farmacológica, tal como un iminoazúcar, p. ej., DGJ o DNJ, interacciona con una enzima específica y/o una enzima específica que tiene una mutación. El uso de chaperonas farmacológicas en el tratamiento de los LSD se resume, p. ej., en Parenti et al., (Parenti et al., 2009 EMBO Mol Med 1, 268-279).

Por ejemplo, NB-DNJ pero no NB-DGJ produce el plegamiento de beta-glucocerebrosidasa (Butters TD et al., *Glycobiology* 2005, 15: 43R-52R). Sin embargo, ambos fármacos pueden inhibir la síntesis de esfingolípidos. Además, DNJ se usa a menudo como control negativo para ensayar fármacos putativos y no tiene ningún efecto sobre el aumento de la actividad de las proteínas en Fabry (Fan et al. 2003, *Methods in Enzymology*, vol. 363, p. 412-420) o Gaucher. Curiosamente, Parenti et al. mostraron un efecto de DNJ en el aumento de la actividad de las proteínas en la enfermedad de Pompe (Parenti et al. 2007 *Mol Ther.* 2007 mar; 15 (3): 508-14. Epub 2007 9 de ene).

Más ejemplos de la interacción específica de chaperonas farmacológicas se describen en Butters et al. (2005, supra) y Parenti et al. (2009, supra).

Los presentes inventores asumen, sin desear ceñirse a ninguna teoría, que la interacción específica y la ausencia de interacción, respectivamente, de las chaperonas farmacológicas con mutantes de proteínas lisosomales se debe a un impedimento estereoquímico, por ejemplo, con L-azúcares o con DNJ, que impide el acceso al sitio activo de la proteína lisosomal. Por consiguiente, la reorganización de la proteína lisosomal mutante es o no posible y, por lo tanto, se evita o no se evita el aumento del transporte y/o la actividad. Los presentes inventores asumen además que, debido a la interacción de la chaperona farmacológica con el sitio activo de la proteína lisosomal, se induce una reorganización de la proteína lisosomal que conduce a una estabilización de la proteína lisosomal mutante, similar al tipo salvaje. Por tanto, la proteína lisosomal mutante que ya no está mal plegada o menos mal plegada ya no es reconocida por la maquinaria de degradación celular y, en consecuencia, y preferiblemente, escapa a la degradación temprana. Como resultado, se aumenta el transporte al lisosoma. Aplicando diferentes ensayos y métodos Yam et al. (Yam et al., supra) e Ishii et al. (Ishii et al., supra) mostraron ambos la acumulación de la enzima después del tratamiento en el lisosoma en Fabry.

Además, es importante comprender que una enfermedad que resulta de una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida y en donde la actividad reducida se debe a una mutación de la proteína lisosomal puede ser en realidad el resultado de diferentes mutaciones, es decir, diferentes sujetos pueden padecer la misma enfermedad que tiene diferentes mutaciones de las proteínas lisosomales. A modo de ejemplo, hasta la fecha se conocen más de 400 mutaciones que dan lugar a la enfermedad de Fabry. En conexión con esto, una persona experta en la técnica reconocerá inmediatamente que, para el tratamiento exitoso de dicha enfermedad, debe incrementarse la actividad reducida de la proteína lisosomal que tiene actividad reducida. Más particularmente, la proteína lisosomal mutante particular tiene que ser una mutante que responda al tratamiento con un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida, tal como una chaperona farmacológica. Un "mutante respondedor" tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significa una proteína lisosomal que tiene una mutación particular, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida debido a la mutación y en donde el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida es adecuado para incrementar o está incrementado y/o potenciando la actividad reducida de modo que se incrementa la actividad de la proteína lisosomal.

En una realización de la combinación y/o preparación farmacéutica según la presente invención como se define en las reivindicaciones, la actividad de la proteína lisosomal se reduce debido a una mutación. En una realización adicional de la presente invención, la mutación es una mutación que responde a un/el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida. En una realización de la combinación y/o la preparación farmacéutica según la presente invención, el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, es adecuado y/o es capaz de incrementar la actividad de la proteína lisosomal.

Por tanto, un experto en la técnica también reconocerá que un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína que tiene una actividad reducida puede ser específicamente efectivo para aumentar la actividad de una

proteína específica en una enfermedad específica. En otras palabras, un determinado compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína que tiene una actividad reducida, tal como una determinada chaperona farmacológica, puede administrarse en una determinada enfermedad, ya que dicha chaperona farmacológica aumenta la actividad de una determinada proteína que tiene una actividad reducida en dicha determinada enfermedad.

- 5 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína que tiene una actividad reducida es una chaperona específica del sitio activo.

La siguiente tabla 1 está tomada de Fan et al. (Fan JQ et al., Biol Chem. 2008 ene; 389 (1): 1-11.) y comprende una lista de chaperonas específicas del sitio activo ejemplares, también denominadas en la presente memoria ASSC, y el LSD respectivo, en donde la actividad de la proteína afectada respectiva que tiene actividad reducida puede aumentarse tras el tratamiento con la ASSC indicada.

10

Tabla 1: compuestos que tienen la capacidad de reorganizar una proteína que tiene una actividad reducida útiles en el tratamiento del LSD respectivo mediante el aumento de la actividad de la proteína respectiva que tiene una actividad reducida. Además, la tabla 1 muestra los inhibidores competitivos de enzimas que se producen en un LSD si están mutadas.

Trastorno	Enzima deficiente	Inhibidores competitivos	Referencias
Enfermedad de Gaucher	β -Glucosidasa ácida o glucocerebrosidasa	isofagomina <i>N</i> -dodecil-DNJ calisteginas A ₃ , B ₁ , B ₃ , C, 6-nonil-isofagomina <i>N</i> -octil- β -valienamina (NOV)	Ogawa et al., 1998; Zhu et al., 2005; Chang et al., 2006
Enfermedad de Fabry	α -Galactosidasa A	1-desoxigalactonojirimicina α - <i>alo</i> -homonojirimicina α -galacto-homonojirimicina β -1-C-butyl-desoxinojirimicina calisteginas A ₃ , B ₂ <i>N</i> -metil calisteginas A ₃ , B ₂	Fan et al., 1999; Asano et al., 2000
G _{M1} -gangliosidosis	β -Galactosidasa ácida	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina	Fan e Ishii, 2003b
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina	Asano et al., 1994; Ichikawa et al., 1998
Enfermedad de Pompe	α -Glucosidasa	1-desoxinojirimicina (DNJ) α -homonojirimicina castanospermina	Asano et al., 1994; Pili et al., 1995; Asano et al., 1997
Enfermedad de Morquio B	β -Galactosidasa ácida	4- <i>epi</i> -isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina	Asano et al., 1994; Ichikawa et al., 1998
α -Manosidosis	α -Manosidasa ácida	1-desoximanojirimicina Swainsonina Manostatina A	Dorling et al, 1980 Aoyagj et al., 1989; Ichikawa et al., 1998
β -Manosidosis Fucosidosis	β -Manosidasa ácida α -L-Fucosidasa ácida	2-hidroxi-isofagomina 1-desoxifucono- <i>jirimicina</i> β -homofucono- <i>jirimicina</i> 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol	Ichikawa et al., 1998 Asano et al., 2001
Enfermedad de Sanfilippo B	α -N-Acetilglucosaminidasa	1,2-didesoxi-2-N-acetamido- <i>nojirimicina</i>	Ichikawa et al., 1998
Enfermedad de Schindler-Kanzaki	α -N-Acetilgalactosaminidasa	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galactono- <i>jirimicina</i>	Ichikawa et al., 1998
Enfermedad de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A	2- <i>N</i> -acetilamino-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido- <i>nojirimicina</i> nagstaína y sus derivados	Aoyagj et al., 1992; Tatsuta et al., 1995; Ichikawa et al., 1998; Asano et al., 2001
Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa B	2- <i>N</i> -acetamido-isofagomina	Aoyagj et al., 1992; Tatsuta et al., 1995;

Trastorno	Enzima deficiente	Inhibidores competitivos	Referencias
Enfermedad de Hurler-Scheie	α -L-Iduronidasa	1,2-didesoxi-2-acetamido- nojirimicina nagstaína y sus derivados 1-desoxiduronojirimicina 2-carboxi-3,4,5- tridesoxipiperidina	Ichikawa et al., 1998; Asano et al., 2001 Cenci di Bello et al., 1984; Ichikawa et al., 1998
Enfermedad de Sly	β -Glucuronidasa	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5- tridesoxipiperidina	Cenci di Bello et al., 1984; Ichikawa et al., 1998
Sialidosis	Sialidasa	ácido 2,6-didesoxi-2,6- imino-siálico Siastatina B	Umezawa et al., 1974; Ichikawa et al., 1998

Además, Sawkar et al. (Sawkar, A. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002, 99, 15428-15433) mostraron que NB-DNJ y NN-DNJ pueden funcionar como chaperonas farmacológicas en la enfermedad de Gaucher.

5 Una persona experta en la técnica reconocerá que, en una realización, un LSD se caracteriza por una disfunción
lisosomal que resulta de mutaciones genéticas que normalmente conducen a una actividad reducida, incluyendo la
deficiencia de la actividad proteica, de una proteína tal como una enzima, una proteína de transporte de membrana,
una proteína transmembrana o una proteína soluble no enzimática requerida o implicada preferiblemente en el
metabolismo de lípidos, glicoproteínas o mucopolisacáridos. Dicha proteína que tiene actividad reducida
preferiblemente es una proteína lisosomal y la actividad reducida de la misma resulta más preferiblemente del
10 plegamiento incorrecto de la proteína. La corrección de dicho plegamiento incorrecto de dicha proteína mediante la
reorganización que comprende la estabilización de dicha proteína lisosomal que tiene actividad reducida, da como
resultado un aumento de la actividad reducida de dicha proteína y, en una realización de la invención, es por tanto
adecuada para el tratamiento de una enfermedad, preferiblemente un LSD.

15 En biología molecular, las chaperonas son proteínas que ayudan al plegamiento o desplegamiento y al ensamblaje o
desensamblaje de otras estructuras macromoleculares, tales como las proteínas, pero no ocurren en estas estructuras
cuando estas últimas están realizando sus funciones biológicas normales. Sin embargo, las chaperonas no están
relacionadas estrictamente con el plegamiento de proteínas. Además, una chaperona puede ayudar en el ensamblaje
de, p. ej., nucleosomas a partir de histonas plegadas y ADN, y dichas chaperonas de ensamblaje, especialmente en
el núcleo, están relacionadas con el ensamblaje de subunidades plegadas en estructuras oligoméricas.

20 Las chaperonas, como se usan preferiblemente en la presente memoria, no transmiten necesariamente la información
estérica requerida para que las proteínas se plieguen. Una función principal de las chaperonas es evitar que tanto las
cadenas polipeptídicas recién sintetizadas como las subunidades ensambladas se agreguen en estructuras no
funcionales. Es por esta razón que muchas chaperonas, pero de ninguna manera todas, son también proteínas de
choque térmico porque la tendencia a agregarse se incrementa a medida que las proteínas se desnaturalizan por el
estrés. Muchas chaperonas son proteínas de choque térmico, es decir, proteínas expresadas en respuesta a
25 temperaturas elevadas u otros estreses celulares. La razón de este comportamiento es que el plegamiento de
proteínas se ve gravemente afectado por el calor y, por lo tanto, algunas chaperonas actúan para reparar el daño
potencial causado por el plegado incorrecto.

30 El término "afectado" tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significa "cambiar" o "ser cambiado"
y más preferiblemente se refiere a un comportamiento, estructura, actividad o condición cambiados. Por ejemplo, una
proteína afectada puede verse afectada de manera que su actividad cambie, es decir, incremente o disminuya, o como
un ejemplo adicional, una proteína afectada puede verse afectada de manera que su estructura o secuencia cambie
en comparación con la estructura o secuencia de la proteína en una etapa no afectada. El término "afectar" se refiere
35 en la presente memoria preferiblemente a una influencia que tiene un cambio en otra cosa. Por tanto, dicha proteína
que se ve afectada en una enfermedad significa que dicha actividad y/o estructura o secuencia cambiada se cambia
en comparación con la actividad y/o estructura o secuencia de dicha proteína en un paciente sano. En una realización
preferida del mismo, el cambio va junto con un cambio en la condición de un sujeto cuyo metabolismo de la proteína
lisosomal se ve afectado; más preferiblemente, dicho cambio va junto a una enfermedad o predisposición a una
enfermedad.

40 Otras chaperonas están implicadas en el plegamiento de proteínas recién creadas a medida que se extruyen del
ribosoma. Aunque la mayoría de las proteínas recién sintetizadas pueden plegarse en ausencia de chaperonas, una
minoría las requiere estrictamente.

45 Otros tipos de chaperonas están implicadas en el transporte a través de las membranas, por ejemplo, las membranas
de las mitocondrias y el retículo endoplásmico (RE) en eucariotas. Las chaperonas bacterianas específicas de la
translocación mantienen las cadenas polipeptídicas precursoras recién sintetizadas en un estado competente para la

translocación (generalmente desplegadas) y las guían hacia el translocón.

5 Las chaperonas moleculares, tal y como se usan en la presente memoria, están implicadas preferiblemente en el plegamiento de proteínas y proporcionan otras funciones además de la estabilización. Las chaperonas moleculares reconocen los elementos proteicos desplegados, tales como los parches hidrófobos expuestos, y se unen a las proteínas desplegadas y evitan la agregación o proporcionan estabilización durante el plegado, después de lo cual la proteína plegada se disocia. Las chaperonas moleculares también dirigen proteínas que no se pliegan correctamente a las vías de degradación.

Las chaperonas químicas, tal y como se usan en la presente memoria, inducen preferiblemente efectos estabilizantes por unión no específica. Las chaperonas químicas incluyen, pero no están limitadas a, glicerol.

10 Las funciones de las chaperonas también comprenden, entre otras, la asistencia en la degradación de proteínas, la actividad de adhesión bacteriana y la respuesta a enfermedades ligadas con la agregación de proteínas.

15 El plegamiento incorrecto de proteínas se reconoce como una causa fisiopatológica importante de deficiencia de proteínas o actividad reducida en muchos trastornos genéticos, especialmente en los LSD. Las mutaciones heredadas pueden interrumpir el plegamiento de proteínas nativas, produciendo de esta manera proteínas con conformaciones con plegamiento incorrecto. En consecuencia, estas proteínas con plegamiento incorrecto son retenidas y degradadas por degradación asociada al retículo endoplásmico, aunque de otro modo serían catalíticamente total o parcialmente activas. La falta de función proteica o la actividad reducida de las proteínas lisosomales da como resultado la acumulación de sustrato, el transporte deficiente de iones o moléculas y la interrupción de las vías biosintéticas.

20 Recientemente, se descubrió que los inhibidores competitivos potentes de las enzimas asociadas con los LSD aumentan la actividad de dichas enzimas en las células cuando se administran en concentraciones inferiores a las requeridas normalmente para inhibir la actividad enzimática intracelular. El efecto es particularmente significativo sobre ciertas enzimas defectuosas o mutantes, pero también ocurre en células que contienen el tipo de enzima normal, preferiblemente la enzima no defectuosa y/o la enzima no mutante. El uso de dichas chaperonas farmacológicas, tales como DGJ, en PCT de un LSD preferiblemente da lugar a la estabilización de la proteína mutante lisosomal que tiene actividad reducida por la unión selectiva de la chaperona farmacológica a dicha proteína mutante en su estado con plegamiento incorrecto. Más preferiblemente, dicha unión da como resultado un estado más estable de la proteína y el incremento de la estabilidad conduce a una disminución de la degradación por degradación asociada al retículo endoplásmico. Una chaperona farmacológica es preferiblemente un inhibidor competitivo dirigido a un sitio activo o una chaperona de un sitio específico. Dichas chaperonas específicas de sitio activo actúan preferiblemente como inhibidores reversibles que se unen eficazmente a la proteína mutante en el retículo endoplásmico y facilitan el plegamiento y/o estabilización de la proteína mutante dando como resultado que se procese y transporte más proteína a la ubicación correcta, por ejemplo, el lisosoma. Por tanto, la chaperona farmacológica actúa preferiblemente como un aglutinante reversible y se disocia en la ubicación correcta donde se logra un nivel más alto de actividad proteica residual. No obstante, una persona experta en la técnica reconocerá que altas concentraciones de chaperonas farmacológicas darán como resultado un efecto 35 inhibidor sobre la actividad de la proteína mutante (Asano et al., supra; Khanna et al., supra).

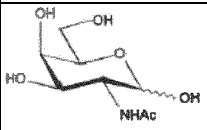
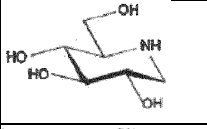
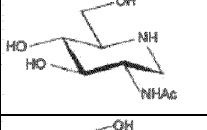
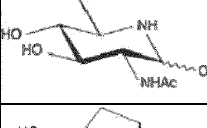
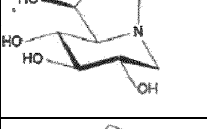
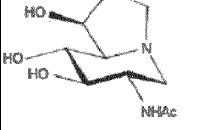
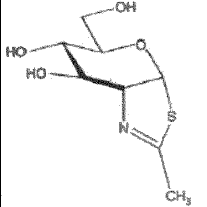
40 Por consiguiente, las chaperonas farmacológicas se aplican preferiblemente en una concentración subinhibidora, en donde la estabilización de la proteína mutante después del rescate del retículo endoplasmático también da como resultado preferiblemente una semivida más larga de la proteína mutante. Las chaperonas de sitio específico, en contraste con las chaperonas de sitio activo, no se unen al sitio activo de la proteína mutante. Por lo tanto, las chaperonas de sitios específicos pueden permanecer unidas a la proteína mutante siempre que no se inhiba la función de dicha proteína.

Las chaperonas farmacológicas usadas en la combinación de la presente invención preferiblemente tienen al menos una característica farmacéutica seleccionada del grupo que comprende baja toxicidad, buena solubilidad y penetración de la barrera hematoencefálica.

45 Las chaperonas farmacológicas, tal y como se usan en la presente memoria, se seleccionan preferiblemente del grupo que comprende azúcares e iminoazúcar y derivados de los azúcares e iminoazúcar, así como las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

50 La siguiente tabla 2 está tomada de Toprak et al. (Toprak et al., 2004, The Journal of Biological Chemistry, vol. 279, No. 14, edición del 2 de abril, p.13478-13487, 2004) y muestra ejemplos ilustrativos, pero no limitantes de imino azúcares útiles como chaperonas farmacológicas en la combinación según la presente invención, preferiblemente en donde la proteína lisosomal es hexosaminidasa A.

Tabla 2: imino azúcares- chaperonas farmacológicas

Estructura	Nombre	Ki/CI ₅₀
	N-Acetil-galactosamina (GalNAc)	Ki = 1,9 mM ¹
	Desoxinojirimicina (DNJ)	N/A
	2-Acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ)	Ki = 700 nM ²
	2-Acetamido-2-desoxinojirimicina (ADNJ)	Ki = 5 nM ²
	Castanospermina (CAS)	N/A
	6-Acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS)	CI ₅₀ = 500 nM ¹
	N-Acetil-glucosamina-tiazolina (NGT)	Ki = 280 nM ² Ki = 300 nM ¹

Las chaperonas farmacológicas tal y como se usan en la presente memoria se seleccionan del grupo que comprende 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butyl-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butyl-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butyl-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A₃, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Una persona experta en la técnica conocerá otras chaperonas farmacológicas que pueden aplicarse para la terapia de chaperonas farmacológicas de los LSD.

Preferiblemente, una chaperona farmacológica tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida, resultando preferiblemente dicha actividad reducida de una mutación y siendo la o una causa de un LSD.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la combinación comprende una sal farmacéuticamente aceptable de una chaperona farmacológica. En una realización de la invención, la sal

farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo que comprende un ácido orgánico y una sal inorgánica. En una realización de la presente invención, se selecciona un ácido orgánico del grupo que comprende citrato, acetato, benzoato y tartrato, preferiblemente tartrato de isofagomina. En una realización de la combinación según la presente invención, se selecciona una sal inorgánica del grupo que comprende hidrocloreuro e hidrobromuro, es decir, HCl y HBr, como por ejemplo DGJ-HCl.

Una persona experta en la técnica reconocerá que los síntomas de los LSD varían, dependiendo del trastorno o enfermedad particular, y otras variables tales como la edad de aparición, y pueden ser de leves a graves. Pueden incluir retraso en el desarrollo, trastornos del movimiento, convulsiones, demencia, sordera y/o ceguera. Algunas personas con un LSD tienen hígados agrandados (hepatomegalia) y bazo agrandados (esplenomegalia), problemas pulmonares y cardíacos y huesos que crecen de manera anormal.

Para el diagnóstico de un LSD, la mayoría de los pacientes se criban inicialmente mediante un ensayo enzimático, que es el método más eficaz para llegar a un diagnóstico definitivo. En otros casos, por ejemplo, en algunas familias donde se conocen las mutaciones que causan la enfermedad y en ciertos aislados genéticos, se puede realizar un análisis de mutaciones. Además, después de que se realiza un diagnóstico por medios bioquímicos, se puede realizar un análisis de mutación para ciertos trastornos.

A continuación, se describen ejemplos representativos, no limitativos, de LSD.

La enfermedad de Fabry, también denominada en la presente memoria enfermedad de Fabry, enfermedad de Anderson-Fabry, angioqueratoma corporis diffusum y deficiencia de alfa-galactosidasa A, es un LSD raro hereditario ligado al cromosoma X, que puede causar una amplia gama de síntomas sistémicos (James, William D.; Berger, Timothy G.; et al. (2006). *Andrews' Diseases of the Skin: clinical Dermatology*. Saunders Elsevier. p. 538, ISBN0-7216-2921-0). Una deficiencia de la enzima alfa galactosidasa A, también denominada en la presente memoria a-GAL A, GAL, GLA o alfa-Gal A, debida a una mutación provoca que un glicolípido conocido como globotriaosilceramida, también denominado en la presente memoria Gb3, GL-3 o ceramida trihexósido se acumule dentro de los vasos sanguíneos, otros tejidos y órganos (Karen JK et al., 2005 *Dermatol. En línea J.* 11 (4): 8). Esta acumulación conduce a un deterioro de su funcionamiento apropiado. Las mutaciones del ADN que causan la enfermedad están ligadas al cromosoma X. La afección afecta a hombres hemicigotos, así como a mujeres homocigotas y potencialmente heterocigotas, las llamadas portadoras. Si bien los hombres suelen experimentar síntomas graves, las mujeres pueden variar desde estar asintomáticas hasta tener síntomas graves. Se cree que esta variabilidad se debe a patrones de inactivación de X durante el desarrollo embrionario de la hembra (James, William D. supra).

Por lo general, los síntomas se experimentan por primera vez en la infancia temprana y pueden ser muy difíciles de comprender; la rareza de la enfermedad de Fabry para muchos médicos a veces conduce a diagnósticos erróneos. Las manifestaciones de la enfermedad generalmente aumentan en número y gravedad en edades individuales. Las complicaciones renales son un efecto común y grave de la enfermedad; la insuficiencia renal y el fallo renal pueden empeorar a lo largo de la vida. La proteinuria, que causa orina espumosa, es a menudo el primer signo de afectación renal. El fallo renal en etapa terminal en los hombres generalmente puede ocurrir en la tercera década de la vida y es una causa común de muerte debido a la enfermedad.

La enfermedad de Fabry está indicada cuando hay síntomas asociados y puede diagnosticarse mediante un análisis de sangre para medir el nivel de actividad de la alfa-galactosidasa. El análisis cromosómico del gen de la alfa-galactosidasa A es el método de diagnóstico más preciso y se han observado muchas mutaciones que causan la enfermedad.

Naturalmente, es probable que la a-Gal A esté presente solo en niveles muy bajos en la sangre, particularmente en los hombres. En las mujeres, debido a los patrones de inactivación de X, los niveles suelen ser normales incluso si el paciente no es asintomático.

La enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, también denominada en la presente memoria enfermedad de Pompe, enfermedad de Pompe o deficiencia de maltasa ácida es un trastorno metabólico autosómico recesivo que daña las células nerviosas y musculares de todo el cuerpo. Es la única enfermedad por almacenamiento de glucógeno con un defecto en el metabolismo lisosomal.

La enfermedad de Pompe está causada por una acumulación de glucógeno en el lisosoma debido a la deficiencia de la enzima lisosomal alfa-glucosidasa ácida, que es una hidrolasa lisosomal. La enzima degrada los enlaces alfa -1,4 y alfa -1,6 en el glucógeno, maltosa e isomaltosa y es necesaria para la degradación del 1-3 % del glucógeno celular. La deficiencia de esta enzima da como resultado la acumulación de glucógeno estructuralmente normal en los lisosomas y el citoplasma de los individuos afectados. La acumulación de glucógeno causa debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a diversos tejidos corporales, particularmente en el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso. El almacenamiento excesivo de glucógeno dentro de los lisosomas puede interrumpir el funcionamiento normal de otros orgánulos y provocar daño celular.

La deficiencia de la enzima está causada por una mutación en un gen, concretamente de la alfa-glucosidasa ácida, también denominada en la presente memoria maltasa ácida, en el brazo largo del cromosoma 17 en 17q25.2-q25.3 (pares de bases 75.689.876 a 75.708.272). El número de mutaciones descritas en 2010 fue de 289, siendo 67

mutaciones no patógenas y siendo 197 mutaciones patógenas. El resto todavía está siendo evaluado para determinar su asociación con la enfermedad. La mayoría de los casos parecen deberse a tres mutaciones. Una mutación de transversión (T → G) es la más común entre los adultos con este trastorno. Esta mutación interrumpe un sitio de corte y empalme.

5 Los síntomas asociados a la enfermedad de Pompe incluyen falta grave de tono muscular, debilidad, un hígado agrandado (hepatomegalia) y un corazón agrandado (cardiomegalia). La función mental no se ve afectada. El desarrollo parece normal durante las primeras semanas o meses, pero disminuye lentamente a medida que la enfermedad progresa. La deglución puede resultar difícil y la lengua puede sobresalir y agrandarse. La mayoría de los niños mueren por complicaciones respiratorias o cardíacas antes de los 2 años de edad.

10 Los síntomas de aparición juvenil aparecen en la infancia temprana a tardía e incluyen debilidad progresiva de los músculos respiratorios del tronco, diafragma y miembros inferiores, así como intolerancia al ejercicio. La inteligencia es normal.

Los síntomas de aparición en la edad adulta también implican debilidad muscular generalizada y atrofia de los músculos respiratorios del tronco, extremidades inferiores y diafragma. Muchos pacientes refieren dificultad respiratoria, cefalea nocturna o al despertar, disminución de los reflejos tendinosos profundos y debilidad de los músculos proximales, tales como dificultad para subir escaleras. El intelecto no se ve afectado. Un pequeño número de pacientes adultos vive sin síntomas ni limitaciones importantes.

La enfermedad de Pompe es una de las causas infiltrativas de la cardiomiopatía restrictiva. La forma infantil suele acudir a la atención médica durante los primeros meses de vida. Las características de presentación habituales son cardiomegalia (92 %), hipotonía (88 %), cardiomiopatía (88 %), dificultad respiratoria (78 %), debilidad muscular (63 %), dificultades para alimentarse (57 %) y retraso del crecimiento (53 %). Los principales hallazgos clínicos incluyen apariencia de bebé flácido, retraso en los hitos motores y dificultades para alimentarse. Puede estar presente hepatomegalia moderada. Los rasgos faciales incluyen macroglosia, boca abierta, ojos muy abiertos, aleteo nasal (debido a la dificultad respiratoria) y tono deficiente de los músculos faciales. La afectación cardiopulmonar se manifiesta por el aumento de la frecuencia respiratoria, uso de músculos accesorios para la respiración, infecciones torácicas recurrentes, disminución de la entrada de aire en la zona inferior izquierda (por cardiomegalia), arritmias y evidencia de insuficiencia cardíaca. La edad media de muerte en los casos no tratados es de 8,7 meses y suele deberse a insuficiencia cardiorrespiratoria.

Las investigaciones iniciales habituales de esta forma de la enfermedad incluyen radiografía de tórax, electrocardiograma y ecocardiografía. Los hallazgos típicos son los de un corazón agrandado con defectos de conducción inespecíficos. Las investigaciones bioquímicas incluyen la creatina quinasa sérica (típicamente aumentada 10 veces) con elevaciones menores de la aldolasa sérica, aspartato transaminasa, alanina transaminasa y deshidrogenasa láctica. El diagnóstico se realiza estimando la actividad de la alfa glucósido ácida en una biopsia de piel (fibroblastos), una biopsia de músculo (células musculares) o en glóbulos blancos. La elección de la muestra depende de las instalaciones disponibles en el laboratorio de diagnóstico.

La enfermedad puede ser diferente de una enfermedad por almacenamiento lisosomal. Dicha enfermedad puede ser una enfermedad asociada con un LSD. Dicha enfermedad puede ser un trastorno neurodegenerativo. En una realización de la combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones, el trastorno neurodegenerativo se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Parkinson. En conexión con esto, debe entenderse que se ha descubierto recientemente que existe un vínculo entre mutaciones en enzimas lisosomales y trastornos neurológicos diferentes de una enfermedad por almacenamiento lisosomal.

Como un ejemplo, existe un vínculo bien establecido entre las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa y la enfermedad de Parkinson. Más específicamente, aunque la enfermedad de Parkinson es el resultado de la acumulación de sinucleína, las mutaciones en el gen de la glucocerebrosidasa se producen en pacientes con Parkinson con una frecuencia 6 veces mayor (Sidransky et al., NEJM, 2009). Por consiguiente, la enfermedad de Parkinson es una enfermedad asociada con un LSD, más particularmente con la enfermedad de Gaucher. Más particularmente, se ha mostrado que la beta glucocerebrosidasa se colocaliza con la alfa sinucleína, que es el material formador de placas en la enfermedad de Parkinson. (Sidransky et al., NEJM, 2009). Por tanto, los presentes inventores asumen actualmente que el pegamiento incorrecto de la glucocerebrosidasa mutante en Gaucher puede potenciar la acumulación de sinucleína. Por consiguiente, la combinación según la presente invención en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la glucocerebrosidasa mutante, en donde la glucocerebrosidasa mutante tiene una actividad reducida y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado de ambroxol es adecuada para o es para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En una realización de la invención, tal como se define, la proteína lisosomal es la glucocerebrosidasa y la enfermedad preferiblemente es la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson, también denominada en la presente memoria enfermedad de Parkinson o EP, es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que a menudo afecta las habilidades motoras, el habla y otras funciones del paciente (Jankovic J et al., abril de 2008, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr. 79 (4): 368-76).

La enfermedad de Parkinson, también denominada en la presente memoria preferiblemente EP, pertenece a un grupo de afecciones llamadas trastornos del movimiento.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por rigidez muscular, temblor, ralentización del movimiento físico (bradiquinesia) y pérdida del movimiento físico (aquinesia) en casos extremos. Los síntomas primarios son el resultado de una estimulación disminuida de la corteza motora por los ganglios basales, normalmente causada por la formación y acción insuficientes de la dopamina, que se produce en las neuronas dopaminérgicas del cerebro, específicamente la sustancia negra. Los síntomas secundarios pueden incluir disfunción cognitiva de alto nivel y problemas sutiles del lenguaje. La EP es crónica y progresiva. La EP es la causa más común de parkinsonismo crónico progresivo, un término que se refiere al síndrome de temblor, rigidez, bradiquinesia e inestabilidad postural. Si bien muchas formas de parkinsonismo son idiopáticas, los casos "secundarios" pueden deberse a la toxicidad, sobre todo de fármacos, traumatismo craneoencefálico u otros trastornos médicos.

El término parkinsonismo se usa para los síntomas de temblor, rigidez y ralentización del movimiento provocados por la pérdida de dopamina. "Enfermedad de Parkinson" es el sinónimo de "parkinsonismo primario", es decir, parkinsonismo aislado debido a un proceso neurodegenerativo sin ninguna causa sistémica secundaria. En algunos casos, sería inexacto decir que la causa es "desconocida", porque una pequeña proporción está causada por mutaciones genéticas. Es posible que a un paciente se le diagnostique inicialmente la enfermedad de Parkinson, pero luego desarrolle características adicionales que requieran una revisión del diagnóstico (National Institute for Health and Clinical Excellence. Directriz clínica 35: Enfermedad de Parkinson. Londres, junio de 2006).

Los medicamentos habituales contra el Parkinson suelen ser menos eficaces o completamente ineficaces para controlar los síntomas; los pacientes pueden ser extremadamente sensibles a los medicamentos neurolépticos como el haloperidol, por lo que es importante un diagnóstico diferencial correcto. El temblor esencial puede confundirse con la enfermedad de Parkinson, pero carece de todas las demás características además del temblor, y tiene características particulares que lo distinguen de la enfermedad de Parkinson, tal como la mejora con betabloqueantes y bebidas alcohólicas. La EP no se considera una enfermedad mortal en sí misma, pero progresa con el tiempo. La esperanza de vida promedio de un paciente con EP es generalmente más baja que la de las personas que no padecen la enfermedad. En las últimas etapas de la enfermedad, la EP puede causar complicaciones tales como asfisia, neumonía y caídas que pueden provocar la muerte. La progresión de los síntomas en la EP puede tardar 20 años o más. En algunas personas, sin embargo, la enfermedad progresa más rápidamente. No hay forma de predecir qué curso tomará la enfermedad para una persona en particular. Con el tratamiento apropiado, la mayoría de las personas con EP pueden llevar una vida productiva durante muchos años después del diagnóstico. Hay algunos indicios de que la EP adquiere resistencia al tratamiento farmacológico al evolucionar hacia un trastorno más Parkinson, generalmente demencia con cuerpos de Lewy, aunque no se desconocen las transiciones a la parálisis supranuclear progresiva o la atrofia multisistémica (Apaydin H. et al., enero de 2002, Archives of Neurology 59 (1): 102-12; Spanaki C. et al., octubre de 2006, Neurology 67 (8): 1518-9.).

Las enfermedades de Niemann-Pick son enfermedades genéticas que se clasifican en un subgrupo de LSD llamados esfingolipidosis o trastornos por almacenamiento de lípidos en los que se acumulan cantidades nocivas de compuestos grasos, o lípidos, en el bazo, el hígado, los pulmones, la médula ósea y el cerebro. En la variante infantil clásica de tipo A, una mutación con cambio de sentido causa deficiencia de esfingomielinasa. La esfingomielina es un componente de la membrana celular, incluyendo la membrana de los orgánulos, por lo que la deficiencia de la enzima bloquea la degradación de los lípidos, lo que da como resultado la acumulación de esfingomielina dentro de los lisosomas en el linaje de fagocitos de macrófagos-monocitos. Las células afectadas aumentan de tamaño, a veces hasta 90 micrómetros de diámetro, como consecuencia de la distensión de los lisosomas con esfingomielina y colesterol.

Los síntomas están relacionados con los órganos en los que se acumulan los compuestos grasos o lípidos. El agrandamiento del hígado y el bazo (hepatoesplenomegalia) puede causar disminución del apetito, distensión abdominal y dolor, así como trombocitopenia secundaria a esplenomegalia. La acumulación de esfingomielina en el sistema nervioso central, incluyendo el cerebelo, da como resultado una marcha inestable (ataxia), dificultad para hablar (disartria) y deglución descoordinada (disfagia). La disfunción de los ganglios basales provoca una postura anormal de las extremidades, el tronco y la cara (disonía) y la enfermedad del tronco encefálico superior da como resultado una alteración de los movimientos oculares rápidos voluntarios (parálisis supranuclear de la mirada). Una enfermedad más extendida que implica la corteza cerebral y las estructuras subcorticales es responsable de la pérdida gradual de la capacidad intelectual causando demencia y convulsiones. También se observan trastornos relacionados con el sueño, incluyendo la cataplejía gelástica, que significa una pérdida repentina del tono muscular asociada con la risa, y la inversión del sueño, lo que significa somnolencia durante el día y vigilia por la noche.

Los tratamientos para la enfermedad de Niemann-Pick son limitados y la atención es principalmente de apoyo. Como anécdota, el trasplante de órganos se ha intentado con un éxito limitado. Las perspectivas futuras incluyen el reemplazo de enzimas y la terapia génica. Se ha intentado el trasplante de médula ósea para el tipo B. La atención de apoyo a través de la nutrición, la medicación, la fisioterapia y el seguimiento por especialistas pueden ayudar con la calidad de vida.

El fármaco Zavesca que comprende Miglustat como ingrediente activo, proporcionado por Actelion, ha sido aprobado al menos en la Unión Europea para el tratamiento de manifestaciones neurológicas progresivas en pacientes adultos

y pacientes pediátricos con enfermedad de Niemann-Pick tipo C, también denominada en la presente memoria NPC.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la proteína lisosomal que tiene actividad reducida se ve afectada en un LSD.

5 Un experto en la técnica conocerá otros LSD que se pueden tratar con PCT y a los que se puede aplicar la combinación según la presente invención.

Un LSD, como se usa preferiblemente en la presente memoria, se caracteriza por al menos uno de los siguientes:

10 a) un metabolismo defectuoso de glicosaminoglicanos tal como, p. ej., en mucopolisacaridosis, también denominada en la presente memoria preferiblemente MPS, que comprende entre otros MPS I, tal como Hurler, Hurler-Scheie, Scheie; MPS II, tal como Hunter; MPS III tal como el síndrome de Sanfilippo tipo A, el síndrome de Sanfilippo tipo B, el síndrome de Sanfilippo tipo C y el síndrome de Sanfilippo tipo D; MPS IV tal como Morquio tipo A y B; MPS VI tal como Maroteaux-Lamy; MPS VII tal como Sly; MPS IX tal como deficiencia de hialuronidasa, deficiencia de sulfatasa múltiple;

b) una degradación defectuosa de la parte glicano de glicoproteínas, tal como, entre otras, en la aspartilglucosaminuria; fucosidosis, tipo I y II; manosidosis; sialidosis, tipo I y II;

c) una degradación defectuosa del glucógeno tal como, p. ej., en la enfermedad de Pompe;

15 d) una degradación defectuosa de componentes esfingolípidos tal como, entre otros, en la deficiencia de esfingomielinasa ácida tal como Niemann-Pick A y B; enfermedad de Fabry; enfermedad de Farber; enfermedad de Gaucher tipo I, II y III, gangliosidosis GM1, tipo I, II y III; gangliosidosis GM2 tal como Tay-Sachs tipo I, II, III y Sandhoff; enfermedad de Krabbe; leucodistrofia metacromática, tipo I, II y III;

e) una degradación defectuosa de polipéptidos tal como, p. ej., en picnodisostosis;

20 f) una degradación o transporte defectuoso de colesterol, ésteres de colesterol u otros lípidos complejos tal como, p. ej., en lipofuscinosis ceroide neuronal, tipo I, II, III y IV;

g) múltiples deficiencias de enzimas lisosomales tal como, p. ej., en galactosialidosis, enfermedad de Danon, gangliosidosis GM2, mucopolisidosis tipo II y mucopolisidosis III; y

25 h) defectos de transporte y tráfico tal como, p. ej., en cistinosis; enfermedad de Danon; mucopolisidosis tipo IV; Niemann-Pick tipo C; enfermedad infantil por almacenamiento de ácido siálico; enfermedad de Salla.

En el caso en el un LSD sea un LSD que tiene una degradación defectuosa de un componente esfingolípido, un experto en la técnica entenderá que cuando una degradación de un componente esfingolípido es defectuosa, preferiblemente también puede ser defectuosa la degeneración de diversos componentes esfingolípidos.

30 La proteína lisosomal puede seleccionarse del grupo que comprende una enzima, una proteína de transporte de membrana, una proteína transmembrana o una proteína soluble no enzimática. Preferiblemente, la actividad reducida se reduce como resultado de al menos una mutación en de la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica la proteína lisosomal. El producto génico de dicho gen mutante es más preferiblemente la proteína que tiene actividad reducida. Lo más preferiblemente, dicha actividad reducida da como resultado un LSD y/o la actividad reducida se reduce debido a una mutación de la secuencia de aminoácidos de la proteína lisosomal.

35 Siendo la proteína lisosomal una enzima, dicha enzima lisosomal puede seleccionarse del grupo que comprende una hidrolasa lisosomal y una fosfotransferasa.

La fosfotransferasa puede seleccionarse del grupo que comprende N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa.

40 La enfermedad por almacenamiento lisosomal es una enfermedad por almacenamiento lisosomal que tiene una degradación defectuosa de una porción de glicano de una glicoproteína. En conexión con esto, se reconocerá que las proteínas N-glicosiladas, en principio, pueden verse afectadas por una falta o una reducción de la degradación dando como resultado un almacenamiento lisosomal. En el caso de la aspartilglucosaminuria, por ejemplo, las unidades Asn-GlcNAc se acumulan en el lisosoma, mientras que en el caso de las manosidasa se forman los oligosacáridos $\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$, $\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$ y $\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 2)\text{Man}(\alpha 1 \rightarrow 3)\text{Man}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$ (DeGasperi R et al., J Biol Chem 1991, 266: 16556-16563.). Se entenderá que en el último caso, se ven afectadas con preferencia las proteínas altamente manosiladas. En cuanto a la fucosidosis, los azúcares que contienen fucosa se degradan. Se entenderá que la fucosa es un azúcar que es capaz de formar el último resto de una cadena o es capaz de unir dos azúcares diferentes.

Un experto en la técnica reconocerá que, por ejemplo, las proteínas lisosomales, las proteínas secretoras y las proteínas de membrana, tales como las proteínas de adhesión y/o las proteínas transportadoras, pueden glicosilarse.

50 La enfermedad por almacenamiento lisosomal puede ser una enfermedad por almacenamiento lisosomal que tiene una degradación defectuosa de los polipéptidos. En conexión con esto, se entenderá que la catepsina K es una cisteína

proteasa. Por consiguiente, todas las proteínas que comprenden un residuo de cisteína y un aminoácido cercano que tiene una cadena lateral básica son candidatas para la degradación por la catepsina K. También se reconocerá que las cisteína proteasas llevan a cabo diversas tareas en diferentes procesos fisiológicos de la célula.

5 La enfermedad por almacenamiento lisosomal puede ser una enfermedad por almacenamiento lisosomal que tiene una degradación o transporte defectuoso de colesterol, ésteres de colesterol y/u otros lípidos complejos. Un lípido complejo tal y como se usa en la presente memoria se refiere preferiblemente a lípidos que comprenden lipofuscina. En conexión con esto, se entenderá que la lipofuscina se acumula en los NCL y comprende un resto de proteína, un resto de lípido, preferiblemente un azúcar y preferiblemente un ion metálico, en donde el resto de lípido resulta de la oxidación de ácidos grasos insaturados.

10 La enfermedad por almacenamiento lisosomal puede ser una enfermedad por almacenamiento lisosomal que tiene múltiples deficiencias de enzimas lisosomales. En una realización, la enfermedad por almacenamiento lisosomal que tiene múltiples deficiencias de enzimas lisosomales se selecciona del grupo que comprende galactosialidosis, enfermedad de Danon (LAMP2), picnodisostosis (catepsina K), deficiencia de sulfatasa múltiple (enzima generadora de Fgly), gangliosidosis GM2 (activador de GM2), mucopolipidosis tipo II y mucopolipidosis tipo III (N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa). En conexión con esto, "múltiples deficiencias" tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significa al menos dos deficiencias de al menos dos actividades enzimáticas diferentes en el lisosoma, preferiblemente de al menos dos enzimas diferentes. Como ejemplo, el gen CTSA está mutado en la galactosialidosis. CTSA codifica la catepsina A (CatA), que es un factor que forma complejos con otras hidrolasas lisosomales (beta-galactosidasa). En otras palabras, CatA es importante para el funcionamiento de diferentes hidrolasas. Si no está presente, varios procesos de degradación no funcionarán correctamente. Por consiguiente, se producen múltiples deficiencias. En el caso de la mucopolipidosis se aplica el mismo principio: en la mucopolipidosis II está mutada la enzima N-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa, que es responsable de marcar las enzimas lisosomales para su transporte al interior del lisosoma. La mutación en dicho gen que conduce a una actividad reducida de la proteína/producto génico da como resultado múltiples deficiencias de las actividades enzimáticas que se producen en el lisosoma. En otras palabras, los genes mutados cuya mutación da como resultado múltiples deficiencias asiste a otras enzimas en el procesamiento correcto y asisten a dichas enzimas en su función catalítica, respectivamente.

La proteína lisosomal puede ser una enzima, más preferiblemente, la enzima se selecciona del grupo que comprende α -galactosidasa A mutante que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Fabry, α -glucosidasa ácida mutante que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Pompe, esfingomielinasa ácida mutante que preferiblemente da como resultado las enfermedades de Niemann-Pick de tipo A o B, N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa mutante que preferiblemente da como resultado mucopolipidosis tipo II y IIIA, beta-hexosaminidasa A/B mutante que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Tay-Sachs o Sandhoff, beta galactosidasa mutante que preferiblemente da como resultado gangliosidosis GM1, lipasa ácida mutante que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Wolman y/o CESD, galactosilceramidasa mutante que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Krabbe, arilsulfatasa B mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Maroteaux-Lamy, es decir, mucopolisacaridosis VI, alfa-L iduronidasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Hurler, es decir, mucopolisacaridosis I, alfa-manosidasa mutante que preferiblemente da como resultado alfa-manosidosis, beta-glucuronidasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Sly, arilsulfatasa A mutante que preferiblemente da como resultado leucodistrofia metacromática, proteína NPC1 mutante que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Niemann-Pick tipo C, α -L-iduronidasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Hurler-Scheie, α -L-iduronidasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Scheie, iduronasulfatasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Hunter, α -N-acetilglucosamidasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Sanfilippo tipo B, acetil-CoA: α -glucosaminid-N-acetiltransferasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Sanfilippo tipo C, N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa mutante que preferiblemente da como resultado el síndrome de Sanfilippo tipo D, N-acetil-glucosamina-6-sulfatasa mutante que preferiblemente da como resultado Morquio tipo A, β -galactosidasa mutante que preferiblemente da como resultado Morquio tipo B, N-acetilgalactosamina-4-sulfato-sulfatasa mutante que preferiblemente da como resultado Maroteaux-Lamy, β -glucuronidasa mutante que preferiblemente da como resultado Sly, hialuronidasa mutante que preferiblemente da como resultado una deficiencia de hialuronidasa; N-acetilglucosamina-1-fosfatotransferasa mutante que preferiblemente da como resultado N-acetilglucosamina-1-fosfato transferasa mucopolipidosis III gamma y mutación de múltiples enzimas sulfatasa que preferiblemente dan como resultado una deficiencia múltiple de sulfatasa.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es castegina A3 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es α -galactosidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Fabry.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es castegina B2 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es α -galactosidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Fabry.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-metil calistegina A3 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es α -galactosidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Fabry.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-metil calistegina B2 o una sal farmacéutica aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es α -galactosidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Fabry.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2-N-acetilamino-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-hexosaminidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Tay-Sachs.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-hexosaminidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Tay-Sachs.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es nagastaína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-hexosaminidasa A, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Tay-Sachs.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer

- constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es nagastaína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-hexosaminidasa B, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o
- 5 prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Sandhoff.
- 10 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2-N-acetilamino-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-hexosaminidasa B, preferiblemente la combinación es para su
- 15 uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Sandhoff.
- 20 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-hexosaminidasa B, preferiblemente la combinación es para su
- 25 uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Sandhoff.
- 30 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 4-epi-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-galactosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su
- 35 uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es gangliosidosis GM1.
- 40 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 4-epi-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-galactosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su
- 45 uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Morquio B.
- 50 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 4-epi-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es galactocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso
- 55 en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Krabbe.
- 60 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína

lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-galactosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es gangliosidosis GM1.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-galactosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Morquio B.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1-desoxigalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es galactocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Krabbe.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1-desoximanojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-manosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es alfa-manosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es swainsonina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-manosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es alfa-manosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es manostatina A o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-manosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es alfa-manosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2-hidroxi-isofagomina o una sal

farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-manosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es beta-manosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1-desoxifuconojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-fucosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es fucosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es beta-homofuconojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-fucosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es fucosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-fucosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es fucosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-fucosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es fucosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-fucosidasa ácida, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es fucosidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado

del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-N-acetilglucosaminidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Sanfilippo B.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1,2-didesoxi-2-N-acetilgalactonojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-N-acetilgalactosaminidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Schindler-Kanzaki.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 1-desoxiduronojirimicina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-L-iduronidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Hurler-Scheie.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es alfa-L-iduronidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Hurler-Scheie.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 6-carboxi-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-glucuronidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Sly.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es beta-glucuronidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Sly.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del

mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es sialidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es sialidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es siastina B o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es sialidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es sialidosis.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-nonil-desoxinójirimicina (NN-DNJ) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-octil-2,5- anhidro-2,5-imino-D-glucitol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-octil-isofagomina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-octil-beta-valienamina (NOV) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es isofagomina (IFG) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso

enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

5 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es alfa-1-C-octil-1-DNJ o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el
10 tratamiento o prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

15 La combinación puede comprender un primer constituyente y un segundo constituyente, en donde el primer constituyente es un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, en donde el primer constituyente es N-butil-DNJ o un sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado del mismo, preferiblemente la proteína lisosomal es glucocerebrosidasa, preferiblemente la combinación es para su uso en el tratamiento o
20 prevención de una enfermedad, por lo que la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, gangliosidosis GM1, enfermedad de Pompe, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Morquio B, alfa-manosidosis, beta-manosidosis, fucosidosis, enfermedad de San filippo B, enfermedad de Schindler-Kanzaki, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Hurler-Scheie, enfermedad de Sly, sialidosis y enfermedad de Parkinson, más preferiblemente la enfermedad es la enfermedad de Parkinson.

25 Se entenderá que una persona experta en la técnica conocerá otras proteínas que tienen actividad reducida en los respectivos LSD, que pueden tratarse con la combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones o como se describe en la presente memoria.

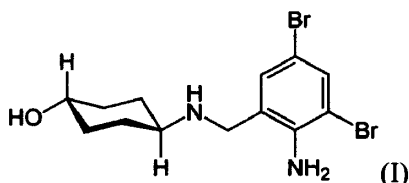
La proteína lisosomal puede ser una proteína transmembrana seleccionada del grupo que comprende NPC1 mutante lo que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Nieman-Pick tipo C1.

30 La proteína lisosomal puede ser una proteína soluble no enzimática seleccionada del grupo que comprende NPC2, lo que preferiblemente da como resultado la enfermedad de Niemann-Pick tipo C2.

Se entenderá que una persona experta en la técnica conocerá otras proteínas que tienen actividad reducida en los respectivos LSD, que pueden tratarse con la combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones o como se describe en la presente memoria.

35 El Ambroxol, también denominado en la presente memoria 2-amino-3,5-dibromo-N-[trans-4-hidroxi ciclohexil]bencilamina, es un fármaco de la clase expectorante usado ampliamente para aumentar la secreción de tensioactivo en el pulmón y para disminuir la viscosidad del moco (Disse, B.G. et al., 1987, Eur. J. Respir. Dis. 153, 255-262). Se ha informado que el Ambroxol protege al inhibidor de la alfa-1-proteinasa de la inactivación oxidativa e
40 inhibe la generación de especies reactivas de oxígeno a partir de fagocitos activados in vitro (Rozniecki, J. y Nowak, D., 1987, Lu Resp. 4, 14-15; Winsel, K. y Becher, G., 1922, Eur. Resp. J. 5, 289). Además, los experimentos de radiólisis de pulso mostraron que el Ambroxol es un buen secuestrador de las especies de radicales de agua primarios, particularmente radicales e_{ac}^- y OH (Tamba, M. y Torreffiani, A. 2001, Rad. Phys. And Chem. 60, 43-52).

El Ambroxol, tal y como se usa en la presente memoria, tiene preferiblemente la fórmula según la fórmula (I):



45 El Ambroxol es el ingrediente activo de Mucosolvan, Ambrosan o Mucoangin. El compuesto es un fármaco mucoactivo con varias propiedades que incluyen acciones secretolíticas y secretomotoras que restauran los mecanismos fisiológicos de depuración del tracto respiratorio que juegan un papel importante en los mecanismos naturales de defensa del cuerpo. Estimula la síntesis y liberación de tensioactivo por neumocitos tipo II. Los tensioactivos actúan como factores anti-pegamento reduciendo la adhesión del moco a la pared bronquial, mejorando su transporte y
50 proporcionando protección frente a infecciones y agentes irritantes (Sanderson RJ et al. Respir Phys 1976; 27: 379-392.; Kido H et al. Biol Chem 2004; 385: 1029-1034). Además, el Ambroxol está indicado como terapia secretolítica en enfermedades broncopulmonares asociadas con secreción anormal de moco y alteración del transporte de moco.

Promueve la eliminación del moco, facilita la expectoración y alivia la tos productiva, lo que permite que los pacientes respiren libre y profundamente (Malerba y Ragnoli, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008; 4 (8): 1119-1129). Se han desarrollado muchas formulaciones diferentes desde la primera autorización de comercialización en 1978. Un producto principal es el jarabe con dos concentraciones del compuesto, 30 mg/ml y 315 mg/ml, que se puede administrar a adultos y niños a partir de 1 año de edad en adelante e incluso desde bebé en la última concentración. Otras formulaciones son comprimidos que contienen 30 mg o 60 mg y una pastilla para chupar con 15 mg de ambroxol. También existe una forma de liberación sostenida con 75 mg para administrar una vez al día. El Ambroxol también está disponible en sobres de polvo seco, disolución para inhalación, gotas y ampollas, así como comprimidos efervescentes. El Ambroxol también proporciona alivio del dolor en el dolor de garganta agudo. El dolor en la garganta irritada es el sello distintivo de la faringitis aguda (de Mey et al., *Arzneimittelforschung* 2008; 58 (11): 557 - 568).

El Ambroxol es un inhibidor muy potente de los canales neuronales de Na⁺ (Weiser T., *Neurosci Lett.* 2006; 395: 179 - 184). Esta propiedad condujo al desarrollo de un comprimido para chupar que contenía 20 mg de Ambroxol. Muchos estudios clínicos de vanguardia (de Mey et al., *supra*) han demostrado la eficacia de Ambroxol para aliviar el dolor en el dolor de garganta irritada agudo, con un inicio de acción rápido y un efecto de larga duración de al menos 3 horas. Las propiedades antiinflamatorias adicionales de Ambroxol son de relevancia clínica ya que el tratamiento conduce a una reducción marcada del enrojecimiento de la garganta irritada del paciente.

Las proteínas lisosomales que tienen actividad reducida, tales como las hidrolasas lisosomales mutantes, tales como la alfa-galactosidasa A afectada en la enfermedad de Fabry o la α -glucosidasa ácida afectada en la enfermedad de Pompe, forman un grupo heterogéneo de enzimas y además las chaperonas farmacológicas tales como DGJ o NB-DNJ, actúan específicamente sólo en relación con un determinado LSD, es decir, en relación con una enzima particularmente específica, como ya se ha señalado anteriormente.

Además, el tratamiento con DGJ tampoco aborda todas las mutaciones de la alfa-galactosidasa A (alfa-Gal A) relacionadas con la enfermedad de Fabry, lo que inhibe la amplia aplicación del compuesto en uso clínico. Esto se mostró cuando se cultivaron células T derivadas de pacientes con Fabry en presencia de DGJ. La actividad de la alfa-Gal A aumentó más del 50 % de lo normal en varias mutaciones, pero no se vio afectada en otras. (Shin SH et al., *Pharmacogenet Genomics.* 2008 sep; 18 (9): 773-80.).

Por lo tanto, es una creencia común en el campo de la terapia de LSD que la respuesta de una determinada enzima mutante afectada en un LSD a una determinada chaperona farmacológica depende de la enzima afectada, de (a) cierta mutación o mutaciones de la enzima y, por tanto, de ciertos pacientes (Wu et al., *supra*).

Por tanto, es el mérito de los presentes inventores haber descubierto que el uso combinado de una chaperona farmacológica y Ambroxol es adecuado para aumentar la actividad de una proteína mutante en el tratamiento de un LSD tal como la enfermedad de Fabry en comparación con la aplicación de dicha chaperona farmacológica sola.

Al menos en la medida en la que la presente invención se aleja de las enseñanzas de la técnica anterior en el sentido de que la administración de Ambroxol es útil independientemente del LSD particular y de la chaperona farmacológica particular, ya que Ambroxol se administra además de una chaperona farmacológica específica para la enfermedad tratada particular que causa un aumento de la actividad de una enzima mutante en comparación con la administración de dicha chaperona farmacológica sola, aunque, preferiblemente, el Ambroxol no provoca un aumento de la actividad de dicha enzima mutante cuando se administra solo.

Una persona experta en la técnica reconocerá inmediatamente que la combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones es capaz de extender el uso de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida, tal como una chaperona farmacológica, p. ej., un iminoazúcar tal como DGJ, a una gama más amplia de indicaciones como si se administrara solo, ya que el tratamiento con la combinación según la presente invención permite el tratamiento de la proteína que tiene actividad reducida debido a (a) mutación o mutaciones particulares que pueden ser sólo tratadas de manera insuficiente con el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida, tal como DGJ, solo. Más específicamente, la aplicación adicional de Ambroxol, bromhexina y/o un derivado de los mismos comprendido en la combinación de la presente invención puede aumentar la actividad de la proteína mutante que tiene una actividad reducida a un nivel suficiente como para evitar que el paciente tenga síntomas, desde el inicio de la enfermedad o al menos que padezca síntomas menos graves. Por el contrario, la capacidad de respuesta de una proteína mutante que tiene dicha mutación particular al tratamiento con DGJ solo puede no ser suficiente para inducir un efecto terapéutico.

Valenzano et al. (Valenzano et al., *Assay Drug Dev Technol.* junio de 2011; 9 (3): 213-35), por ejemplo, describen que en la mayoría de los LSD, se ha estimado que del 1 % al 6 % de la actividad normal es suficiente para retrasar o prevenir la aparición de la enfermedad o producir una forma más leve de la enfermedad. Por ejemplo, se ha informado del 1 % al 2 % de la actividad normal de la α -iduronidasa en casos leves de MPS I (Hopwood y Muller, *Clin Sci (Lond)* sep de 1979; 57 (3): 265-72); se ha informado <1 % de la actividad GCasa normal en la enfermedad de Gaucher leve (Desnick RJ y Fan JQ, en: Futerman AH, editor; Zimran A, editor. *Gaucher Disease.* CRC Press; Boca Raton, FL: 2006. p. 544); se ha informado del 6 % de la actividad normal de la β -galactosidasa en la gangliosidosis GM1 de inicio tardío (Suzuki Y et al., *Perspect Med Chem.* 2009; 3: 7-19); se ha informado del 2-4 % de la actividad normal de la β -hexosaminidasa en la forma adulta de gangliosidosis GM2 (Conzelmann et al. *Am J Hum Genet.* sep de 1983; 35 (5):

900-13); y el 10 % de la actividad enzimática normal parece prevenir conjuntamente las gangliosidosis GM1 y GM2 (Leinekugel P. et al., Hum Genet. 1992; 88: 513-523; Mahuran DJ., Biochim Biophys Acta. 1999; 1455: 105-138).

Por tanto, una persona experta en la técnica reconocerá que el 10 %, preferiblemente el 20 % y más preferiblemente el 25 % de la actividad de la proteína en comparación con la actividad de la proteína de tipo salvaje se considera suficiente para un tratamiento terapéuticamente efectivo, es decir, un tratamiento suficiente para inducir un efecto terapéutico y/o un aumento de la actividad de la proteína mutante que tiene una actividad reducida a un nivel suficiente como para prevenir que el paciente tenga síntomas, desde el inicio de la enfermedad o al menos que padezca síntomas menos graves.

Por ejemplo, el aumento de la actividad de una proteína mutante en comparación con la actividad de la proteína de tipo salvaje hasta un 5 % administrando DGJ solo, siendo la actividad de la proteína mutante del 1 % sin ningún tratamiento, no será suficiente para prevenir la aparición de la enfermedad, es decir, el tratamiento no será terapéuticamente efectivo. Por el contrario, la aplicación de la combinación según la presente invención, junto con la aplicación adicional de Ambroxol, bromhexina y/o un derivado de los mismos, puede potenciar aún más la actividad de la proteína mutante hasta un 20 %, siendo así terapéuticamente efectivo y prevenir que el paciente padezca los síntomas, o al menos puede causar síntomas menos graves.

En otras palabras, los presentes inventores encontraron que la aplicación de DGJ y Ambroxol en combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones es capaz de incrementar la actividad de la proteína mutante medida según el sistema de cultivo celular como se describe en la presente memoria hasta un nivel que induciría a un médico capacitado a evaluar el estado de salud del paciente como "saludable", es decir, que tiene una actividad de la proteína mutante que generalmente no da lugar a síntomas causados de otro modo por la actividad reducida de la proteína mutante, mientras que el tratamiento con DGJ solo da lugar a la actividad de la proteína de la proteína mutante que induciría al médico experto a evaluar el estado de salud del paciente como "poco claro" o como "enfermo".

Los presentes inventores también observaron sorprendentemente un aumento en la actividad de una proteína mutante tras el tratamiento con la combinación según la presente invención como se define en las reivindicaciones en comparación con la actividad de la proteína mutante tras el tratamiento con el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida solo.

Se sabe comúnmente en la técnica que una determinada proteína que tiene una actividad reducida debido a una determinada mutación responderá mejor al tratamiento con un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida que otras proteínas que tienen otras mutaciones. Por tanto, la eficacia del tratamiento puede permitir distinguir entre mutaciones respondedoras y mutaciones no respondedoras de la proteína que tiene una actividad reducida.

Los presentes inventores observaron que las mutaciones más respondedoras, es decir, proteínas que tienen mutaciones en las que el aumento de la actividad de la proteína debido a la administración del compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene una actividad reducida fue más alta, también exhibieron un efecto más fuerte en el aumento adicional de la actividad de dicha proteína que tiene dicha determinada mutación aplicando la combinación según la presente invención. Hasta la fecha, la restauración de la actividad de una proteína lisosomal cuya actividad se reduce en una enfermedad y más específicamente una enfermedad por almacenamiento lisosomal hasta una actividad de al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 20 % y más preferiblemente al menos el 25 % de la proteína lisosomal de tipo salvaje y/o de la proteína lisosomal en un sujeto sano, se considera preferiblemente como un tratamiento, preferiblemente como un tratamiento de la enfermedad.

Por ejemplo, y como también se puede tomar de la Fig. 3 y del Ejemplo 3 de la presente descripción, se puso observar un efecto más fuerte en el aumento adicional de la actividad de ciertas mutaciones de GLA, que exhiben una fuerte capacidad de respuesta al tratamiento con DGJ solo (véase también la tabla 3), cuando se aplicaba la combinación según la presente invención. Más específicamente, dichas mutaciones de GLA son, por ejemplo, E59K (14,2 veces), A156V (3,9 veces) y R301Q (5,6 veces) mientras que el efecto de potenciar la actividad de las proteínas mutantes fue menos fuerte con respecto a las proteínas menos respondedoras al tratamiento con DGJ. R356W (3,7 veces) y R363H (1,8 veces) muestran adicionalmente una actividad residual relativamente fuerte, es decir, alta actividad proteica sin tratamiento.

En conexión con esto, es importante tener en cuenta que otros estudios, p. ej., relacionados con el tratamiento de la enfermedad de Gaucher con receptores de rianodina (RyR), ya consideraron un aumento de 1,3 veces en comparación con la actividad residual de la enzima mutante como clínicamente relevante (Wang et al., ACS Chemical Biology, 2011).

Además, Wu et al. (Wu et al., supra) mostraron que una proteína que tiene una mutación particular y que responde al tratamiento con una chaperona farmacológica in vitro no responde cuando se ensaya en un paciente que tiene dicha forma mutante de la proteína, por lo que el paciente fue tratado con DGJ 10 μ M, y mientras que en todos los demás pacientes ensayados, la capacidad de respuesta de las mutaciones de dichos pacientes ensayados en el sistema de cultivo de células HEK representó la capacidad de respuesta en la aplicación clínica.

Por tanto, es una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones que la actividad de la proteína que tiene actividad reducida se reduce debido a una mutación de dicha proteína, en donde la mutación

responde al tratamiento con un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene una actividad reducida cuando se administra solo, es decir, la actividad de la proteína que tiene una actividad reducida aumenta debido al tratamiento con un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal.

5 En una realización más preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, la proteína que tiene actividad reducida responde al tratamiento con un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida en un paciente, en donde el aumento de la actividad de dicha la proteína da como resultado una actividad proteica de preferiblemente el 5 % y más preferiblemente el 10 % en comparación con la actividad de la proteína de tipo salvaje.

10 Como el Ambroxol se usa ampliamente en relación con diferentes enfermedades y síntomas, incluyendo el dolor agudo, tal como el dolor de muelas, dolor postoperatorio o dolor inducido por herpes zóster, así como infección craneal, accidente cerebrovascular, quemaduras, pancreatitis o trauma, cólicos y dolor de cabeza, un experto la técnica reconocerá que una dosificación aplicada en el tratamiento de un paciente que padece o está en riesgo de padecer una enfermedad lisosomal, tal como la enfermedad de Fabry, tendrá en cuenta las dosificaciones ya aprobadas que se administrarán en relación con dichas enfermedades para las que el Ambroxol ha sido aprobado por las autoridades sanitarias. Por consiguiente, las dosificaciones de Ambroxol varían preferiblemente de 30 a 4.000 mg por día como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. 11/856280 usando p. ej., comprimidos de Ambroxol que comprenden 150-1.200 mg como se describe esencialmente en la solicitud de patente de EE. UU. 10/888362 presentada el 9 de julio, 2004 por Boehringer Ingelheim International GmbH o un comprimido para chupar como se describe en la patente de EE. UU. 6.663.889 presentada el 23 de abril, 2002 por Boehringer Ingelheim International GmbH. Una persona experta en la técnica también reconocerá que se aplican hasta 20 g de Ambroxol por paciente para la desintoxicación de pacientes que padecen insuficiencia hepática.

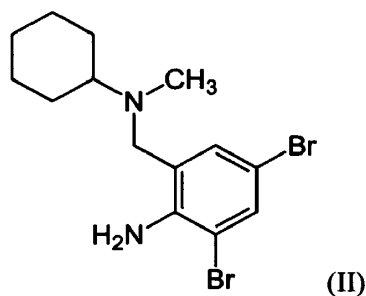
20 En el sistema de cultivo celular usado preferiblemente en relación con la presente invención, una cantidad de Ambroxol que da como resultado un aumento de la actividad de la alfa-galactosidasa A está preferiblemente en un rango de 20 a 60 μM , preferiblemente 40 μM , con el fin de lograr un efecto estable, y también puede tomarse de la Fig. 2 y del Ejemplo 3 como se describe en la presente memoria.

25 Una persona experta en la técnica reconocerá además que una dosificación que se administrará a un paciente con el fin de tratar un LSD particular, que dicho paciente padece o corre el riesgo de desarrollarlo, dependerá del LSD particular que se va a tratar, así como de la combinación particular según la presente invención y más particularmente del compuesto particular que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida tal como una chaperona particular, y del derivado particular de Ambroxol tal como bromhexina o Ambroxol contenido en dicha composición, y de la afección particular del paciente a ser tratado. Por consiguiente, un experto en la técnica aplicará una dosificación de Ambroxol a la luz de lo que se ha señalado anteriormente, empezando a partir de una dosificación baja de Ambroxol y variando dicha dosificación dependiendo del éxito del tratamiento, por lo que se puede monitorizar el éxito del tratamiento y controlarlo evaluando regularmente la actividad de la proteína lisosomal que tiene una actividad reducida afectada en el LSD particular.

30 Cuando se realizan experimentos en el sistema de cultivo celular como se describe en la presente memoria, los presentes inventores también han encontrado que cuando se administra DGJ junto con bromhexina en lugar de Ambroxol, la actividad de la alfa-galactosidasa A también aumenta en comparación con el efecto que surge de DGJ solo.

35 En conexión con esto, es importante señalar que Leet et al. (Lee et al. Pharmacol Res. ene de 2004; 49 (1): 93-8) mostraron que se podía alcanzar una concentración máxima de Ambroxol en el plasma humano tan alta como 61,5 ng/ml, que corresponde a 0,15 μM . Con respecto a la Bromhexina, Bechgaard et al. (Bechgaard et al. Biopharm Drug Dispos. 1982 oct-dic; 3 (4): 337-44) describen una concentración de bromhexina de 0,08 μM . Un experto en la técnica reconocerá que cuando se administra un comprimido de 32 mg (77,6 μmoles) se produce una absorción intestinal del 22-27 %. Con referencia al volumen de sangre y después de restar la pérdida por metabolismo de primer paso, esto debería resultar en aproximadamente 0,7 μM , es decir, que se refiere a un aumento de 10 veces. En ensayos clínicos, se ha reconocido que DGJ 10 μM es una concentración clínicamente alcanzable (Wu et al., 2011, Hum Mutat).

40 Una persona experta en la técnica reconocerá que el Ambroxol es un metabolito de la bromhexina. La bromhexina, también denominada en la presente memoria 2,4-dibromo-6-[[ciclohexil(metil)amino]metil]anilina es un agente mucolítico usado en el tratamiento de trastornos respiratorios asociados con moco viscoso o excesivo. La bromhexina, como se refiere en la presente memoria, tiene preferiblemente la fórmula:



Además, la bromhexina tiene propiedades antioxidantes. La bromhexina apoya así los propios mecanismos naturales del cuerpo para eliminar la mucosidad del tracto respiratorio. Es secretolítica, es decir, aumenta la producción de moco seroso en el tracto respiratorio y hace que la flema sea más fina y menos pegajosa. Esto contribuye a un efecto secretomotor, es decir, ayuda a los cilios - pequeños pelos que recubren el tracto respiratorio - a transportar la flema fuera de los pulmones. Por esta razón, a menudo se añade a algunos jarabes antitusivos (tos).

La bromhexina es un derivado sintético del ingrediente activo herbal vasicina. Se ha mostrado que aumenta la proporción de secreción bronquial serosa, haciéndola más fácil de expectorar. La bromhexina también aumenta el transporte de moco al reducir la viscosidad del moco y al activar el epitelio ciliado. En estudios clínicos, la bromhexina mostró efectos secretolíticos y secretomotores en el área del tracto bronquial lo que facilita la expectoración y alivia la tos. Está indicada como "terapia secretolítica en enfermedades broncopulmonares asociadas con secreción anormal de moco y alteración del transporte de moco". La bromhexina está contenida en varias formulaciones, jarabes de alto y bajo contenido de 8 mg/5 ml, 4 mg/5 ml, comprimidos y comprimidos solubles (ambos con 8 mg de bromhexina) y disolución para uso oral de 10 mg/5 ml. La posología varía con la edad, pero hay productos para todos los grupos de edad desde bebés en adelante. La bromhexina es un producto bien establecido y bien tolerado en su indicación conocida. Una persona experta estará de acuerdo en que un programa de dosificación de 8-16 mg administrados tres veces al día servirá como un buen punto de partida para una terapia, en donde se aplicará la combinación de la presente invención.

Es particularmente digno de mención que el uso de Ambroxol y/o un derivado del mismo, tal como bromhexina en relación con la presente invención, es ventajoso para la aplicación clínica de la combinación de la presente invención ya que el Ambroxol y la bromhexina constituyen fármacos bien tolerados aprobados para otros usos clínicos.

Se sabe que la aplicación de altas concentraciones de chaperonas farmacológicas produce un efecto inhibitor sobre la actividad de la proteína mutante y también puede presentar toxicidad. Como también se describirá en la presente memoria en relación con las Figuras 5A y 5B, el uso combinado de una dosis de una chaperona farmacológica, preferiblemente una dosis subinhibidora, y Ambroxol y/o un derivado tal como la bromhexina es una ventaja adicional ya que pueden usarse dosis sustancialmente más bajas de la chaperona farmacológica con el fin de lograr el mismo efecto. En otras palabras, el tratamiento con una combinación de la presente invención puede sustituir la aplicación de una dosis alta de la chaperona farmacológica con el fin de lograr el mismo efecto, es decir, el mismo aumento en la actividad de la enzima mutante.

Según la invención como se define en las reivindicaciones, la combinación comprende un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida y Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol. En una realización, dicho derivado de Ambroxol es bromhexina. Por tanto, también es una realización de la presente invención que una combinación según la invención comprenda bromhexina y Ambroxol; Ambroxol; bromhexina; Ambroxol y bromhexina y opcionalmente al menos un derivado de bromhexina distinto de Ambroxol; Ambroxol y/o al menos un derivado de bromhexina distinto de Ambroxol y/o bromhexina; y/o al menos un derivado de bromhexina distinto de Ambroxol y/o bromhexina.

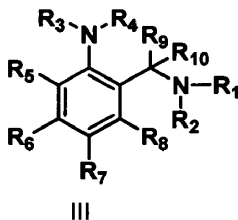
En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la sal de Ambroxol o bromhexina se deriva de un ácido orgánico o inorgánico. En una realización de la combinación de la presente invención, la sal de Ambroxol o bromhexina se deriva de un ácido orgánico o inorgánico seleccionado del grupo que comprende hidrohaluros tales como HCl, HBr, H₃PO₄, así como ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido benzoico, ácido tartárico y ácido cítrico.

Un derivado tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significa cualquier sal, solvato, éster o amida farmacéuticamente aceptable, o sal o solvato de dicho éster o amida, de un compuesto comprendido en una combinación de la presente invención o cualquier otro compuesto que, tras la administración al receptor, sea capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el compuesto o un metabolito activo o residuo del mismo, p. ej., un profármaco. Los derivados farmacéuticamente aceptables preferidos según la invención son cualesquiera sales, solvatos o profármacos farmacéuticamente aceptables.

Una persona experta en la técnica reconocerá inmediatamente que el Ambroxol es un metabolito de la bromhexina y, por consiguiente, que el Ambroxol es un derivado de la bromhexina, así como viceversa, preferiblemente la bromhexina es un derivado del Ambroxol. En una realización preferida de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol, o el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida es un derivado farmacéuticamente activo y farmacéuticamente aceptable. En otras palabras, el

derivado es preferiblemente menos tóxico, más preferiblemente no tóxico, y aumenta la actividad de la proteína que tiene actividad reducida cuando se aplica en la combinación según la presente invención.

Un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol puede ser un compuesto de fórmula (III):



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

10 cada uno y cualquiera de R1, R2, R3 y R4 se selecciona individual e independientemente de un átomo de hidrógeno, un grupo de carbono alifático con 1 a 12 átomos de carbono, en el que este grupo de carbono alifático puede ser lineal o cíclico, opcionalmente con uno o más sustituyentes O, N, S, P y/o haluro en el grupo de carbono alifático, y un grupo aromático o heteroaromático, en el que este grupo aromático o heteroaromático constituye de 2 a 18 átomos de carbono, opcionalmente con uno o más átomos de N, O, S o haluro adicionales;

15 cada uno y cualquiera de R5, R6, R7 y R8 se selecciona individual e independientemente de un átomo de hidrógeno, sustituyentes haluro tales como I, Br, Cl, F, sustituyentes de oxígeno tales como OH, Oalquilo, Oarilo, derivados del ácido alquilcarboxílico tales como CN, CO₂alquilo, CO₂arilo, CONH₂, CONHalquilo, CONHarilo, CON(alquilo)₂, CON(arilo)₂, sustituyentes de acilo tales como C(O)alquilo, C(O)arilo, sustituyentes de azufre tales como SH, Salquilo, Sarilo, SOalquilo, SOarilo, SO₂alquilo, SO₂arilo, SO₃alquilo, SO₃arilo, sustituyentes de nitrógeno tales como NH₂, NHalquilo, NHarilo, Nalquilo₂, Narilo₂, N(alquilo)arilo, NHSO₂alquilo, NHSO₂arilo, N(alquilo)SO₂alquilo, N(alquilo)SO₂arilo, N(arilo)SO₂alquilo, N(arilo)SO₂arilo, en el que alquilo representa un grupo de carbono alifático lineal o cíclico de C1 a C6 con sustituyentes O, N, S, P y/o haluro adicionales en el grupo de carbono alifático, y en el que arilo representa un grupo aromático o heteroaromático con 2 a 18 átomos de carbono, opcionalmente con uno o más átomos de N, O, S o haluro adicionales; y

20

cada uno y cualquiera de R9 y R10 se selecciona individual e independientemente de un átomo de hidrógeno y un grupo de carbono alifático de C1-C4, opcionalmente con uno o más sustituyentes O, N y/o haluro adicionales.

Un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol puede ser un compuesto de fórmula (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

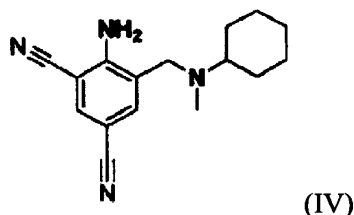
25 cada uno y cualquiera de R1, R2, R3 y R4 se selecciona individual e independientemente de un átomo de hidrógeno, un grupo de carbono alifático con 1 a 6 átomos de carbono, en el que el grupo de carbono alifático puede ser lineal o cíclico, opcionalmente con uno o más sustituyentes O, N, y/o haluro en el grupo de carbono alifático, y un grupo aromático o heteroaromático, en el que el grupo aromático o heteroaromático constituye de 3 a 9 átomos de carbono, opcionalmente con uno o más átomos de N, O o haluro adicionales;

30 cada uno y cualquiera de R5, R6, R7 y R8 se selecciona individual e independientemente de un átomo de hidrógeno, sustituyentes de haluro tales como I, Br, Cl, F, sustituyentes de oxígeno tales como OH, Oalquilo, Oarilo, alquilo, derivados de ácido carboxílico tales como CN, CO₂alquilo, CONH₂, CONHalquilo, CONHarilo, sustituyentes de acilo tales como C(O)arilo, sustituyentes de nitrógeno tales como NH₂, NHalquilo, NHarilo, NHSO₂alquilo, NHSO₂arilo, en el que alquilo representa un grupo de carbono alifático lineal o cíclico de C1 a C4, opcionalmente con uno o más sustituyentes O, N y/o haluro en el grupo alquilo, y en el que arilo representa un grupo aromático o heteroaromático con 3 a 9 átomos de carbono, opcionalmente con uno o más átomos de N, O o haluro adicionales; y

35

cada uno y cualquiera de R9 y R10 se selecciona individual e independientemente de un átomo de hidrógeno y un grupo de carbono alifático de C1-C4, opcionalmente con uno o más sustituyentes O, N y/o haluro.

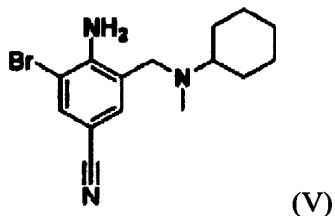
40 En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol es un compuesto de fórmula (IV)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la fórmula (IV) también se denomina en la presente memoria preferiblemente SF-54B.

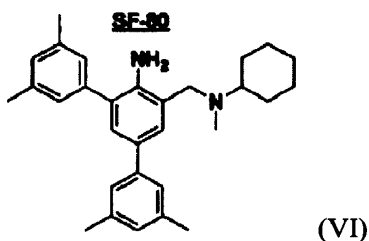
En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol es un compuesto de fórmula (V)



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la fórmula (V) también se denomina en la presente memoria preferiblemente SF-55C.

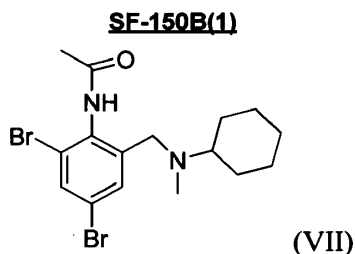
En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol es un compuesto de fórmula (VI)



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la fórmula (VI) también se denomina en la presente memoria preferiblemente SF-80.

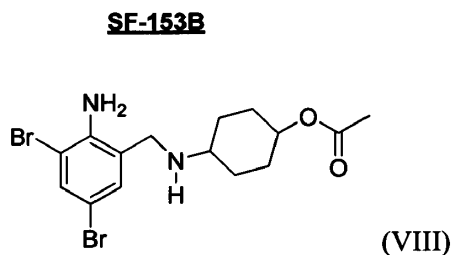
En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol es un compuesto de fórmula (VII)



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de fórmula (VII) también se denomina preferiblemente en la presente memoria SF-150B o SF-150B(1).

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol es un compuesto de fórmula (VIII)



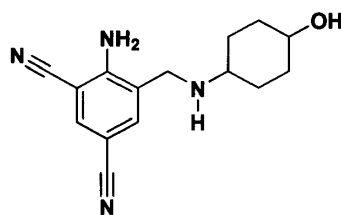
20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de fórmula (VIII) también se denomina en la presente memoria preferiblemente SF-153B.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, un derivado de la bromhexina y/o Ambroxol

es un compuesto de fórmula (IX).

SF-124B



IX

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de fórmula (IX) también se denomina en la presente memoria preferiblemente SF-124B.

- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos comprendidos en una combinación de la presente invención, más particularmente, de Ambroxol, de un derivado de Ambroxol, tal como bromhexina o de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal que tiene actividad reducida, incluyen sales ácidas, por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio y tetraalquilamonio y similares, o sales mono o dibásicas con el ácido apropiado, por ejemplo, ácidos carboxílicos orgánicos tales como ácidos acético, láctico, tartárico, málico, isetiónico, lactobiónico y succínico; ácidos sulfónicos orgánicos tales como ácidos metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico y p-toluenosulfónico y ácidos inorgánicos tales como ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico y sulfámico y similares. Algunos de los compuestos de esta invención pueden cristalizarse o recristalizarse en disolventes tales como disolventes acuosos y orgánicos. En dichos casos, se pueden formar solvatos. La presente invención abarca dentro de su alcance solvatos estequiométricos que incluyen hidratos, así como compuestos que contienen cantidades variables de agua que pueden producirse mediante procesos tales como liofilización.

En una realización del método para preparar una preparación farmacéutica de la invención como se define en las reivindicaciones, el método comprende la etapa de formular como primer constituyente un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, y como segundo constituyente Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol en una forma de dosificación única o en dos formas de dosificación separadas. En una realización del mismo, una primera de las dos formas de dosificación separadas contiene el primer constituyente y una segunda de las dos formas de dosificación separadas contiene el segundo constituyente. En una realización adicional del mismo, el primer constituyente y el segundo constituyente se formulan en una única forma de dosificación.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, se selecciona una forma de dosificación del grupo que comprende comprimidos, cápsulas, polvo, mezcla, comprimidos efervescentes y disoluciones.

25 Una persona experta en la técnica entenderá de inmediato que en una realización del método para preparar una preparación farmacéutica de la invención como se define en las reivindicaciones, en donde el primer constituyente y el segundo constituyente se formulan en una única forma de dosificación, tanto el primer constituyente como el segundo constituyente están comprendidos, por ejemplo, en un único comprimido, una única cápsula, un único polvo, una única mezcla, un único comprimido efervescente o una única disolución. Por consiguiente, en una realización del método para preparar una preparación farmacéutica, en donde una primera de las dos formas de dosificación separadas contiene el primer constituyente y una segunda de las dos formas de dosificación separadas contiene el segundo constituyente, el primer constituyente se formula en una primera forma de dosificación, y el segundo constituyente se formula en una segunda forma de dosificación, en donde preferiblemente la primera forma de dosificación y la segunda forma de dosificación, se seleccionan cada una e individualmente, del grupo que comprende comprimidos, cápsulas, polvo, mezcla, comprimidos efervescentes y disoluciones. Por consiguiente, el primer constituyente se formula, por ejemplo, en una primera forma de dosificación, en donde la forma de dosificación es un comprimido y el segundo constituyente se formula en una segunda forma de dosificación, en donde la segunda forma de dosificación es un comprimido, una cápsula, un polvo, una mezcla, un comprimido efervescente o una disolución. Está dentro de la presente invención que el primer constituyente y el segundo constituyente de la composición de la invención pueden estar contenidos en la misma forma de dosificación, en la que el primer constituyente y el segundo constituyente están contenidos en la misma entidad física de dicha forma de dosificación, por ejemplo, en el mismo comprimido o en la misma disolución; en dicha realización, el primer y el segundo constituyentes se pueden mezclar entre sí o se pueden separar física o químicamente entre sí dentro de dicha entidad física.

45 Un sujeto como se refiere en la presente memoria preferiblemente significa un individuo, preferiblemente un ser humano, al que la combinación según la presente invención y/o la preparación farmacéutica según la presente invención y/o el compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal según la presente invención y/o Ambroxol y/o un derivado del mismo según la presente invención se va a administrar y/o se administra y/o se ha administrado independientemente del estado de salud del individuo y/o del estado genético del individuo. En una realización de los diversos aspectos de la presente invención, un sujeto es un paciente. Paciente, tal y como se usa en la presente memoria, preferiblemente significa un sujeto, en donde el sujeto padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la combinación de la invención como se define en las reivindicaciones es para su uso en un método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto. En conexión con esto, debe entenderse que un médico experto categorizará el estado de salud de un paciente, tal como el estado de un hombre humano, como "enfermo" si, por ejemplo, se determina un valor de actividad de GLA en una muestra de dicho paciente que es menor que un valor de corte de 5 nmoles de MU/mg de proteína total/h. Una persona experta reconocerá que la decisión de si la combinación según la presente invención se administrará o no a un paciente depende preferiblemente únicamente del estado genético del paciente, es decir, de la mutación particular de la proteína lisosomal respectiva. Más particularmente, dicho método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto comprende preferiblemente las siguientes etapas:

5 etapa a): determinar si en una muestra del sujeto la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, preferiblemente dicha actividad reducida resulta de una o más mutaciones contenidas en la proteína lisosomal en comparación con la proteína lisosomal de tipo salvaje;

10 etapa b): identificar un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, y en donde el compuesto es adecuado para incrementar o está incrementando la actividad reducida de la proteína lisosomal; y

15 etapa c): administrar al sujeto la preparación farmacéutica, en donde el primer constituyente es el compuesto adecuado para o incrementar la actividad reducida de la proteína lisosomal identificada en la etapa b) y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol.

20 Por consiguiente, si un paciente muestra menos de 5 nmoles MU/mg/h de actividad de GLA, dicho paciente debe tener una "mutación respondedora" tal como la descrita en la tabla 3 de la presente memoria, mientras que el estado de salud de un paciente que tiene un valor de actividad de GLA de más de 5 nmoles de MU/mg de proteína total pero menos de 10 nmoles de MU/mg de proteína total/h se clasificarán como "no claro".

25 Si, según la invención como se define en las reivindicaciones, se dice que una proteína, polipéptido o péptido, incluyendo, pero no limitado a, una enzima, tiene una mutación, esto significa preferiblemente que la secuencia de aminoácidos de la proteína, polipéptido o péptido está cambiada, más preferiblemente cambiada en comparación con el aminoácido de la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje y/o la secuencia de aminoácidos de un sujeto sano.

En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, el término "en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida" significa "en donde la proteína lisosomal tiene actividad reducida".

30 Tal y como se usa preferiblemente en la presente memoria, la referencia a un rango definido por un límite superior y un límite inferior describe todos y cualquiera de los números enteros contenidos dentro del límite superior y el límite inferior, incluyendo el valor/cifra del límite superior y el valor/cifra inferior. Por ejemplo, de 1 a 6 átomos de carbono significa según esto, 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, 4 átomos de carbono, 5 átomos de carbono y 6 átomos de carbono.

35 La presente invención se ilustra ahora adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos de los que se pueden extraer características, realizaciones y ventajas adicionales.

Más específicamente:

40 La Fig. 1 es un diagrama que muestra la actividad de GLA de mutantes de GLA como están presentes en la enfermedad de Fabry y de GLA de tipo salvaje con y sin la administración de Ambroxol 40 μ M. El eje y indica la actividad de GLA normalizada al cien por cien de la actividad de GLA de tipo salvaje (WT) en ausencia de tratamiento con Ambroxol o chaperona farmacológica. En el eje x se indica la mutación de los respectivos mutantes de GLA analizados, cuya actividad se determinó con (barras grises) y sin (barras blancas) la adición de Ambroxol 40 μ M. El experimento subyacente se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1; el análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la T de Student bilateral. Las barras de error se indican como error estándar de la media. Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

45 La Fig. 2 es un diagrama que muestra una relación de respuesta a la dosis de la actividad de GLA como una función de la concentración de Ambroxol. El eje y indica el porcentaje de actividad de GLA de tipo salvaje normalizado a la actividad de GLA de tipo salvaje en ausencia de tratamiento con Ambroxol o una chaperona farmacológica. El eje x indica la concentración de Ambroxol que se añadió a la muestra respectiva. La actividad de GLA de tipo salvaje se determinó mediante la adición de las concentraciones representadas de Ambroxol. El experimento subyacente se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1. Las barras de error se indican como error estándar de la media.

50 La Fig. 3A es un diagrama que muestra la actividad de GLA de mutantes de alfa-galactosidasa (GLA) sin la adición de Ambroxol o DGJ, después de la adición de DGJ 20 μ M y después de la adición de DGJ 20 μ M y Ambroxol 40 μ M (indicado de izquierda a derecha para cada mutante). El eje y indica la actividad de GLA normalizada al cien por cien de la actividad de GLA de tipo salvaje (WT) en ausencia o presencia de tratamiento con una chaperona farmacológica o la combinación de una chaperona farmacológica (DGJ) y Ambroxol. En el eje x se indica la mutación de los respectivos mutantes de GLA analizados, cuya actividad se determinó después de la adición de DGJ 20 μ M (barras

grises), la adición de DGJ 20 μ M y Ambroxol 40 μ M y sin la adición de Ambroxol o DGJ (barras blancas). El experimento subyacente se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1. El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la T de Student bilateral. Las barras de error se indican como error estándar de la media. Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

5 La Fig. 3B es un diagrama que muestra la actividad de GLA de mutantes de alfa-galactosidasa (GLA) sin la adición de galactosa o Ambroxol, después de la adición de galactosa y después de la adición de galactosa y Ambroxol (indicado de izquierda a derecha para cada mutante). El eje y indica la actividad de GLA normalizada al cien por cien de la actividad de GLA de tipo salvaje (WT) en ausencia o presencia de tratamiento con una chaperona farmacológica o la combinación de una chaperona farmacológica y Ambroxol, en el que la chaperona farmacológica es el azúcar galactosa. En el eje x se indica la mutación de los respectivos mutantes de GLA analizados, cuya actividad se determinó mediante la adición de galactosa 100 mM (barras grises claro), la adición de galactosa 100 mM y Ambroxol 40 μ M (barras grises oscuro) y sin la adición de Ambroxol o galactosa (barras blancas). El experimento se ha llevado a cabo 2 veces, por lo tanto, los valores se proporcionan como media \pm SD.

10 La Fig. 4 es el resultado de un análisis de transferencia Western que muestra los niveles de proteína de GLA en células transfectadas con los mutantes de GLA indicados, en el que las células no fueron tratadas (indicado por "-"), tratadas con DGJ (indicado por "DGJ") o tratados con DGJ y Ambroxol (indicado por "DGJ/ABX"). El Experimento se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

15 La Fig. 5A es un diagrama que muestra una relación de respuesta a la dosis de la actividad de GLA mutante que tiene la mutación A156V, también denominada en la presente memoria GLA[A156V], como una función de la concentración de DGJ en ausencia de Ambroxol y con Ambroxol 40 μ M, respectivamente. El eje y indica la actividad de GLA[A156V] como veces de incremento de la actividad de GLA[A156V] sin tratamiento con/adición de DGJ que se estableció en 1,0. En el eje x se indica la concentración de DGJ aplicada. El experimento subyacente se llevó a cabo cuatro veces como se describe en el Ejemplo 1, con y sin la aplicación de Ambroxol 40 μ M, como se indica. Las barras de error se indican como error estándar de la media. Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

20 La Fig. 5B es un diagrama que muestra una relación respuesta a la dosis de la actividad de GLA mutante que tiene la mutación R301G, también denominada en la presente memoria GLA[R301G], como una función de la concentración de DGJ en ausencia de Ambroxol y con Ambroxol 40 μ M, respectivamente. El eje y indica la actividad de GLA[R301G] como veces de incremento de la actividad de GLA[R301G] sin tratamiento con/adición de DGJ que se estableció en 1,0. En el eje x se indica la concentración de DGJ aplicada. El experimento subyacente se llevó a cabo cuatro veces como se describe en el Ejemplo 1, con y sin la aplicación de Ambroxol 40 μ M, como se indica. Las barras de error se indican como error estándar de la media. Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

25 La Fig. 6 es un diagrama que muestra la actividad de alfa-galactosidasa (GLA) de varios mutantes de GLA después de la adición de (de izquierda a derecha para cada mutación) ni DGJ ni Ambroxol o Bromhexina, Bromhexina sola, DGJ sola, DGJ y Ambroxol y DGJ y Bromhexina. El eje y indica la actividad de GLA normalizada al cien por cien de la actividad de GLA de tipo salvaje (WT) en ausencia o presencia de tratamiento con Bromhexina, chaperona farmacológica o la combinación de chaperona farmacológica y Ambroxol o Bromhexina, respectivamente, con la chaperona farmacológica siendo DGJ. En el eje x se indica la mutación de los respectivos mutantes de GLA analizados, cuya actividad se determinó (de izquierda a derecha para cada mutación) después de la adición de ni Ambroxol ni DGJ (barras blancas), después de la adición de Bromhexina 40 μ M (barras grises claras), después de la adición de DGJ 20 μ M (barras grises oscuro), después de la adición de DGJ 20 μ M y Ambroxol 40 μ M (barras grises oscuro con líneas verticales), y después de la adición de DGJ 20 μ M y Bromhexina 40 μ M (barras blancas con líneas diagonales). El experimento se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1, el análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la T de Student bilateral. Las barras de error se indican como error estándar de la media. Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$. Las estrellas indicadas muestran las significancias del tratamiento con DGJ solo en comparación con el tratamiento con una combinación de Bromhexina y DGJ.

30 La Fig. 7A es un diagrama que muestra la actividad de la α -glucosidasa ácida (GAA) de varios mutantes de GAA que se encuentran en la enfermedad de Pompe después de la adición de (de izquierda a derecha para cada mutación) ni Ambroxol ni NB-DNJ, Ambroxol, NB-DNJ y NB-DNJ y Ambroxol. El eje y indica la actividad de la α -glucosidasa ácida normalizada al cien por cien de la actividad de la α -glucosidasa ácida de tipo salvaje (WT) en ausencia o presencia de tratamiento con Ambroxol, chaperona farmacológica o la combinación de chaperona farmacológica y Ambroxol siendo la chaperona farmacológica NB-DNJ. En el eje x se indica la mutación de los respectivos mutantes de α -glucosidasa ácida analizados, cuya actividad se determinó (de izquierda a derecha para cada mutación) después de la adición de ni Ambroxol ni NB-DNJ (barras blancas), después de la adición de Ambroxol 40 μ M (barras grises claro), después de la adición de NB-DNJ 20 μ M (barras grises oscuro), y después de la adición de NB-DNJ 20 μ M y Ambroxol 40 μ M (barras negras). El experimento subyacente se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1. Las barras de error se indican como error estándar de la media.

35 La FIG. 7B es un diagrama que muestra la actividad de la α -glucosidasa ácida de varios mutantes de α -glucosidasa ácida después de la adición de (de izquierda a derecha para cada mutación) ni DNJ ni Ambroxol (barras blancas), después de la adición de DNJ 20 μ M (barras grises claro) y después de la adición de DNJ 20 μ M y Ambroxol 40 μ M (barras grises oscuro). El diseño es similar al de la Fig. 7A, el iminoazúcar usado en este experimento es DNJ en lugar de NB-DNJ.

La Fig. 8 es un diagrama que muestra la actividad de la α -galactosidasa A como una función de la concentración de DGJ y como una función de la concentración de DGJ con una concentración constante de Ambroxol de 40 μ M. El eje y indica la actividad de la α -galactosidasa A normalizada al cien por cien de la actividad de la α -galactosidasa A de tipo salvaje (WT) en ausencia de tratamiento con Ambroxol, chaperona farmacológica o la combinación de chaperona farmacológica y Ambroxol siendo la chaperona farmacológica DGJ. En el eje x se indica la concentración de DGJ. El Experimento se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1. Las barras de error se indican como error estándar de la media (Microsoft, Redmont, Washington, EE. UU.). El inserto de la Fig. 8 muestra la actividad de la α -galactosidasa A como una función de la concentración de Ambroxol a un pH de 4,5 y a un pH de 6,7, en el que la actividad es la actividad normalizada de la α -galactosidasa A no tratada.

Las Fig. 9A y 9B son diagramas que muestran la actividad de la α -galactosidasa A ácida en presencia de DGJ solo, Ambroxol, Bromhexina y varios compuestos, en el que en el caso de Ambroxol, Bromhexina y los diversos compuestos, se añadió DGJ de manera que la concentración de DGJ fuera 20 μ M, mientras que la concentración de Ambroxol, Bromhexina y los diversos compuestos fue (de izquierda a derecha para cualquiera de Ambroxol, Bromhexina y los diversos compuestos) 100 nM (barras blancas), 1 μ M (barras grises), 10 μ M (barras grises oscuro) y 40 μ M (barras grises claro). El eje y indica la actividad de la α -galactosidasa A normalizada al cien por cien de la actividad de la α -galactosidasa A de tipo salvaje (WT) en ausencia o presencia de Ambroxol (ABX), Bromhexina (BHX) o los compuestos indicados en el eje x en combinación con la chaperona farmacológica DGJ. Los diversos compuestos son derivados de Ambroxol y Bromhexina, respectivamente.

La Fig. 10 es un panel de diagramas que muestra la actividad de la α -galactosidasa A mutante [A156V], también denominada GLA[A156V] como una función de la concentración de Ambroxol denominado ABX (A), Bromhexina denominada BHX (B), compuesto SF-54B (C), compuesto SF-55C (D), compuesto SF-150 B (E) y compuesto SF-153B (F), añadiéndose DGJ a cada reacción como chaperona farmacológica. El eje y indica la actividad de la α -galactosidasa A normalizada al cien por cien de la actividad de la α -galactosidasa A de tipo salvaje (WT) en ausencia de tratamiento con la chaperona farmacológica DGJ. En el eje x se indica la concentración de Ambroxol, Bromhexina y los demás compuestos. El experimento se llevó a cabo al menos 3 veces (excepto para E y F como se indica en la figura donde n era 2) como se describe en el Ejemplo 1. Las barras de error se indican como error estándar de la media (o desviación estándar cuando N <3). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$. Las estrellas indicadas muestran las significancias del tratamiento con DGJ solo en comparación con el tratamiento con una combinación de ABX, BHX o el compuesto mencionado y DGJ. BHX (B) y especialmente SF-55C (D) mostraron un efecto tóxico sobre las células a una concentración de 80 μ M.

La Fig. 11A es un diagrama que indica la actividad de la α -glucosidasa ácida del mutante de α -glucosidasa ácida Y455F presente en la enfermedad de Pompe después de la adición de (de izquierda a derecha) ni DNJ ni Bromhexina (BHX), compuesto SF-54C y SF-55C, después de la adición de DNJ, después de la adición de DNJ y Bromhexina (BHX), después de la adición de DNJ y el compuesto SF-54B, y después de la adición de DNJ y el compuesto SF-55C. El imino azúcar usado como chaperona es DNJ. El diseño del experimento subyacente fue similar al subyacente a la Fig. 7A. La concentración de DNJ fue de 20 μ M; la concentración de cada uno y uno cualquiera de Bromhexina, el compuesto SF-54B y el compuesto SF-55C fue 40 μ M. Los experimentos subyacentes se llevaron a cabo al menos 3 veces (a menos que se indique lo contrario). Las barras de error se indican como error estándar de la media (o desviación estándar cuando N <3). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

La Fig. 11B es un diagrama que indica la actividad de la α -glucosidasa ácida de los mutantes de α -glucosidasa ácida Y455F y L552P presentes en la enfermedad de Pompe después de la adición de (de izquierda a derecha) ni DNJ ni ninguno cualquiera del compuesto SF-124B, compuesto SF-150B y SF-153B, después de la adición de DNJ, después de la adición de DNJ y el compuesto SF-124B, después de la adición de DNJ y el compuesto SF-150B, y después de la adición de DNJ y el compuesto SF-153B. El imino azúcar usado como chaperona es DNJ. El diseño del experimento subyacente fue similar al subyacente a la Fig. 7B. La concentración de DNJ fue de 20 μ M; la concentración de cada uno y uno cualquiera de Bromhexina, el compuesto SF-54B y el compuesto SF-55C fue 40 μ M. Los experimentos subyacentes se llevaron a cabo al menos 3 veces (a menos que se indique lo contrario). Las barras de error se indican como error estándar de la media (o desviación estándar cuando N <3). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Clonación de α -galactosidasa A en un vector de sobreexpresión

Un clon bacteriano que contenía el ADNc de longitud completa de la α -galactosidasa A (IRAU969H0320D, alineado con el no. de acceso NM 000169.2 (GeneBank)) se recibió de lmaGenes GmbH, Berlín, Alemania. La amplificación se realizó con los cebadores 5'-AGGTCGGATCCG ACAATGCAGCTGAGGAACC-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'-GGTGTTCGAATTAAGTAAGTCTTTAATGACATCTGCA-3' (SEQ ID NO: 2) introduciendo sitios de restricción únicos para BamHI y BstBI. La PCR se llevó a cabo usando ADN polimerasa Pfu clonada (Stratagene). El ADNc se subclonó en el vector pGEM-T Easy (Promega). Antes de la ligación, el inserto de ADNc se incubó con polimerasa Taq (Qiagen) para añadir un saliente de poli (A) en el extremo 3' para la clonación TA. Para la expresión, el ADNc de la α -Gal A se ligó en el vector diana pcDNA3.1/V5-His6 (Invitrogen).

Clonación de la α -glucosidasa ácida en un vector de sobreexpresión

Un clon bacteriano que contenía el ADNc de longitud completa de la α -galactosidasa A (IRATp970C0971D, alineado con el no. de acceso NM_000152.3, GeneBank) se recibió de ImaGenes GmbH, Berlín, Alemania. La amplificación se realizó con los cebadores 5'-TAG GAG CTG TCC AGG CCA TC-3' (SEQ ID NO: 3) y 5'-GAG AGA CTA ACA CAC TCC GC-3' (SEQ ID NO: 4). La PCR se llevó a cabo usando la ADN Polimerasa iProof (BioRad). El ADNc se subclonó en el vector pCRII TA TOPO (Invitrogen). Antes de la ligación, el inserto de ADNc se incubó con la polimerasa Taq (Qiagen) para añadir un saliente de poli (A) en el extremo 3' para la clonación TA. Para la expresión, el ADNc de GAA se ligó en el vector diana pcDNA3.1/V5-His6 (Invitrogen) usando ligación de extremos pegajosos usando sitios de restricción únicos (HindIII, XhoI) ofrecidos por los sitios de clonación múltiples de ambos vectores.

10 Mutagénesis dirigida a sitio de la α -galactosidasa A

Se generaron vectores de expresión que contenían mutaciones en α -Gal A y glucosidasa ácida mediante mutagénesis por PCR dirigida a sitio (Andreotti et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 2011, 6:66) usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange® II XL (Stratagene). Los intercambios, deleciones o inserciones de nucleótidos se introdujeron individualmente mediante amplificación por PCR usando la ADN polimerasa PfuUltra, el vector plasmídico pcDNA3.1/GLA y pcDNA3.1/GAA que contenía la secuencia de tipo salvaje de los genes nombrados se usó como molde y un conjunto de cebadores de 27-33 mer, con cebadores con sentido y antisentido que portaban una de las modificaciones de secuencia respectivas en el medio de su secuencia. Cada plásmido mutante obtenido se sometió a análisis de secuenciación en un analizador genético 3130 xl (Applied Biosystems)

Cultivo celular

20 Las células HEK293H se mantuvieron en DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco, GIBCO - 31966) suplementado con FBS al 10 % (suero bovino fetal; PAA - A11-151) y penicilina/estreptomina al 1 % (GIBCO - 15140). Todas las células se incubaron en una incubadora con camisa de agua (Binder, Tuttlingen, ALEMANIA) a 37 °C bajo 5 % de CO₂. Se recibieron DGJ, Ambroxol y Bromhexina de Sigma Aldrich (Munich, ALEMANIA) y se añadieron al medio de cultivo a partir de una disolución madre acuosa (10 mM). La Bromhexina se obtuvo de Sigma Aldrich (Hidrocloruro de Bromhexina 17343 - $\geq 98,0$ %).

Expresión transitoria de enzimas mutantes en células HEK293H

Se sembraron $1,5 \times 10^5$ células 24 horas antes de la transfección en cada pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos usando 500 μ l de medio DMEM (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal (PAA) al 10 %. La expresión transitoria de las enzimas mutantes en las células HEK293H se llevó a cabo usando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Típicamente, antes de la transfección, se incubó una mezcla de ADN plasmídico (0,8 μ g) y el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (2 μ l) en 100 μ l de medio DMEM u Opti-MEM sin suero (GIBCO) a temperatura ambiente (20-25 °C). C) durante 20 min y posteriormente se aplicó a las células. Posteriormente, las células se incubaron durante 6 horas a 37 °C, se eliminó el medio que contenía el reactivo de transfección y se añadieron 500 μ l de DMEM fresco. En esta etapa, los compuestos se añadieron donde se pretendía. Las células se incubaron durante otras 48 horas y se recogieron.

Medición enzimática de la α -galactosidasa A

Típicamente, 48 horas después de la transfección con los vectores plasmídicos que contenían el ADNc de GLA que porta la mutación respectiva, las células se homogeneizaron en 200 μ l de agua bidestilada y se sometieron a 5 ciclos de congelación-descongelación usando nitrógeno líquido. El sobrenadante recogido después de la centrifugación del homogenado a 10.000 x g durante 5 min se usó en ensayos enzimáticos. La concentración de proteínas se midió con el kit de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific) de acuerdo con el manual del fabricante. Se ensayaron 10 μ l de los lisados celulares con una concentración de 50 μ g/ml con 20 μ l de 4MU- α -D-galactopiranosido (4MU- α -Gal, 2 mM) en tampón de citrato de fosfato 0,06 M (pH 4,7) con algunas adaptaciones del método original descrito por Desnick et al. (J Lab. Clin Med 81: 157, 1973). Las reacciones enzimáticas se terminaron después de 1 hora de incubación a 37 °C mediante la adición de 0,2 ml de tampón de glicina 1,0 M (pH 10,5), preparado ajustando el pH usando NaOH 1,0 M. Las 4MU liberadas se determinaron mediante medición de fluorescencia a 360 y 465 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente, en un lector de fluorescencia de microplacas (Tecan, Männedorf, SUIZA). La actividad enzimática medida se calculó primero como nm de MU/mg de proteína/h y se normalizó al cien por cien de la actividad de tipo salvaje. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces, el análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la T de Student bilateral. Las barras de error se indican como error estándar de la media usando el software Excel (Microsoft, Redmont, Washington, EE. UU.). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$

Medición enzimática de la α -glucosidasa

La preparación de las muestras se llevó a cabo de forma análoga a los registros de la α -galactosidasa A. Como sustrato, se usó una disolución de 1,3 mg de 4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido/ml (en tampón de acetato de sodio, pH 4,0) y se añadieron 5 μ g de muestra/reacción. La reacción se incubó durante 60 minutos a 37 °C y se detuvo con glicina-NaOH 1 M, pH 10,5. Las 4MU liberadas se determinaron mediante medición de fluorescencia a 360 y 465 nm como longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente, en un lector de fluorescencia de microplacas

(Tecan, Männedorf, SUIZA). La actividad enzimática medida se calculó primero como nm de MU/mg de proteína/h y se normalizó al cien por cien de la actividad de tipo salvaje. Los experimentos se realizaron al menos 3 veces, el análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la T de Student bilateral. Las barras de error se indican como error estándar de la media usando el software Excel (Microsoft, Redmont, Washington, EE. UU.). Los valores de p son

5 * = $p < 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$

Análisis por transferencia Western

El análisis por transferencia Western para la detección de la proteína α -Gal A se realizó usando un anticuerpo policlonal anti- α -Gal A de conejo disponible comercialmente ([H-104] Santa Cruz). Además, se usó un anticuerpo monoclonal GAPDH de ratón ([6C5] abcam) como control de carga interno.

10 Los lisados de las células HEK293H se generaron aspirando el medio de las placas de cultivo de 24 pocillos, lavando las células una vez con 1 x PBS (Biochrom AG) y aplicando 200 μ l de tampón RIPA enfriado en hielo suplementado con tabletas de mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) a las células antes de una incubación de 20 minutos en hielo. A continuación, las células se retiraron por lavado de los pocillos, se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se usó para el análisis. Después de la determinación de la concentración de proteína, se mezclaron 50 μ g de proteína con un volumen adecuado de tampón de carga de 5 x Laemmli, se hirvió durante 5 minutos en un agitador térmico (Eppendorf), se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos a 4 °C y se cargó en un gel prefabricado Criterion de 4-15 % Tris-HCl (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL) (GE Healthcare). La membrana se bloqueó con leche en polvo descremada al 5 % (p/v) en TBS-Tween 20 [Tris/HCl 10 mM (pH 7,5) con NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,1 %] a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se trató con un anticuerpo primario contra GAPDH diluido 1:10.000 en una disolución de leche/transferencia [leche desnatada en polvo descremada al 3 % (p/v) en TBS-Tween 20] a 4 °C durante la noche. Después de lavar la transferencia tres veces con exceso de TBS-Tween 20, la membrana se trató durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo primario contra α -Gal A diluido 1: 500 en la disolución de leche/transferencia al 3 %. Después de otro procedimiento de lavado, se aplicó una mezcla de anticuerpo secundario de un anticuerpo IgG anti-conejo 680 marcado con Alexa Fluor producido en cabra (Molecular Probes) y un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con IRDye800 producido en cabra (Rockland) ambos diluidos 1:10.000 en la disolución de leche/transferencia al 3 % a la membrana. Después de un lavado extenso con TBS-Tween 20, las bandas de proteínas se visualizaron con un generador de imágenes por infrarrojos Odyssey (Li-Cor) y se cuantificaron usando el software Odyssey.

30 Inhibición de la agalsidasa alfa (Replagal®, Shire Pharmaceuticals)

Se diluyó Replagal a 10 nM en tampón citrato-fosfato (0,06 M) ajustado a diferentes valores de pH (4,5; 6,7). Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de los compuestos (DGJ, Ambroxol) que variaban desde 0-1 mM. Finalmente, se añadió el sustrato 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (1 mM) para iniciar una incubación de 15 minutos en un baño de agua a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 200 μ l de tampón de glicina-NaOH (1 M, pH 10,5). La medición de la fluorescencia se llevó a cabo en un lector de fluorescencia de microplacas (Tecan, Männedorf, SUIZA) de acuerdo con el método anterior.

35

Ejemplo 2: Efecto del Ambroxol sobre la actividad de la enzima GLA

Se prepararon diversos mutantes de GLA indicados en la Fig. 1 como se describe en el Ejemplo 1. A la preparación enzimática para el mutante individual se le proporcionó Ambroxol 40 μ M. Los resultados se indican en la Fig. 1.

40 La Fig. 1 es un diagrama que indica la actividad enzimática de GLA para GLA de tipo salvaje y las formas de GLA mutantes indicadas con y sin Ambroxol. La actividad se normalizó con la actividad observada para la GLA de tipo salvaje que se estableció como 100 %.

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 1 al menos 3 veces; el análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de la T de Student bilateral. Las barras de error se indican como error estándar de la media usando el software Excel (Microsoft, Redmont, Washington, EE. UU.). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

45 Como puede tomarse de la Fig. 1, la adición de Ambroxol dio como resultado un aumento de la actividad enzimática de la GLA del tipo salvaje. En contraste con esto, el Ambroxol no tuvo ningún efecto sobre las formas mutantes de GLA.

Los presentes inventores usaron el sistema establecido por Asano et al. (Asano et al., 2000 supra) y pudieron reproducir los resultados con respecto al efecto potenciador de DGJ cuando se administra solo. Más importante aún, los presentes inventores también encontraron que GLA no se inhibía por Ambroxol en dicho ensayo libre de células.

50

La siguiente tabla 3 enumera la capacidad de respuesta de proteínas sobreexpresadas que tienen mutaciones que dan como resultado la enfermedad de Fabry con respecto a la terapia con DGJ solo, así como el efecto adicional en términos de potenciar la actividad enzimática cuando se aplica Ambroxol según la presente invención.

Tabla 3: lista de mutantes de GLA respondedores a DGJ.

No.	mutación	Referencia para ensayo positivo del efecto de la chaperona (DGJ)	Ensayado internamente	No respondedor (datos propios)	efecto aditivo del Ambroxol demostrado
1	A20P	Ishii et al., 2007			
2	N34S	Benjamin et al., 2008			
3	P40S	Benjamin et al., 2008			
4	T41I	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008			
5	H46P		X		
6	R49C	Shin et al., 2008	X	X	
7	R49L				
8	M51K	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008	X		(*)
9	M51I		X		**
10	E59K	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008	X		****
11	S65I		X		(*)
12	E66Q	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008			
13	M72V	Ishii et al., 2007			
14	A73V		X		(*)
15	I91T	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008			
16	W95S	Benjamin et al., 2008			
17	A97V	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2007, 2008			
18	R100K	Benjamin et al., 2008			
19	R112C	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2007, 2008	X	X	
20	R112H	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2007, 2008	X		(*)
21	F113L	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008			
22	L120V		X		
23	S126G		X		
24	D136E		X		
25	N139S		X		
26	A143T	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2007, 2008	X		
27	G144V	Benjamin et al., 2008			
28	P146S	Ishii et al., 2007			
29	S148N	Benjamin et al., 2008			
30	A156V	Ishii et al., 2007	X		****
31	D165H		X		
32	L166V	Ishii et al., 2007			
33	D170V	Benjamin et al., 2008			
34	C172Y	Benjamin et al., 2008	X	X	
35	D175N		X		

ES 2 864 774 T3

No.	mutación	Referencia para ensayo positivo del efecto de la chaperona (DGJ)	Ensayado internamente	No respondedor (datos propios)	efecto aditivo del Ambroxol demostrado
36	G183D	Benjamin et al., 2008			
37	G183V		X		
38	S201F	Shin et al. 2008			
39	P205R	Benjamin et al., 2008			
40	P205T	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008			
41	Y207C	Benjamin et al., 2008			
42	Y207S	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008			
43	N215S	Ishii et al., 2007, Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008	X		
44	I219T		X		
45	R220Q		X		
46	N224S		X		
47	H225D		X		
48	H225R		X		**
49	I232T		X		(*)
50	S235C	Benjamin et al., 2008			
51	S238N		X		
52	I242N		X		
53	D244N	Benjamin et al., 2008			
54	P259R	Shin et al., 2008			
55	N263 S	Benjamin et al., 2008			
56	D264Y		X		
57	L268S		X		
58	V269M		X		
59	V269A		X		(*)
60	S276G	Benjamin et al., 2008, Shin et al. 2008			
61	Q279E	Ishii et al, 2007, Benjamin et al., 2008			
62	T282I		X		
63	W287C	Benjamin et al., 2008			
64	A288P	Benjamin et al., 2008			
65	I289F	Benjamin et al., 2008			
66	M290I		X		
67	L294S		X		
68	F295C	Shin et al., 2008			
69	M296I	Benjamin et al., 2008			
70	M296V	Ishii et al, 2007, Benjamin et al., 2008			
71	S297C		X		
72	L300P	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2007, 2008			

No.	mutación	Referencia para ensayo positivo del efecto de la chaperona (DGJ)	Ensayado internamente	No respondedor (datos propios)	efecto aditivo del Ambroxol demostrado
73	R301G		X		
74	R301Q	Ishii et al, 2007, Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008	X		****
75	R301P		X		
76	L310F		X		
77	L311V		X		
78	D313Y		X		
79	V316E	Benjamin et al., 2008			
80	V316I		X		
81	I319T		X		
82	N320I		X		
83	N320Y	Benjamin et al., 2008			
84	Q3121H		X		
85	G325D	Benjamin et al., 2008			
86	G325S		X		
87	Q327E		X		
88	G328A	Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2008	X		*
89	R342Q	Benjamin et al., 2008	X	X	
90	S345P		X		
91	R356W	Ishii et al, 2007, Benjamin et al., 2008, Shin et al., 2007 (no respondedor)	X		****
92	E358A	Benjamin et al., 2008			
93	E358K	Benjamin et al., 2008			
94	G360C		X		
95	G361R		X		
96	R363C	Benjamin et al., 2008			
97	R363H	Benjamin et al., 2008	X		***
98	G373D	Ishii et al, 2007			
99	G373S	Ishii et al, 2007			
100	E398A		X		
101	P409A	Benjamin et al., 2008			
102	T410I		X		*
103	L415F		X		
104	E418G		X		

5 Todos los mutantes se ensayaron con respecto a la capacidad de respuesta a DGJ como se indica en la tabla 3. Ninguna referencia indica que la mutación se ensaya exclusivamente en manos de los presentes inventores. Un efecto adicional de la administración de la combinación según la presente invención, es decir, Ambroxol en combinación con DGJ, se consideró significativo cuando * $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,005$. Para algunas mutaciones, el efecto aditivo de Ambroxol solo se ha repetido dos veces, lo que resulta solo en una tendencia de actividad enzimática incrementada indicada por el símbolo (*). En la tabla 3, una "X" en la columna "no respondedor, datos propios" es indicativa de mutaciones donde los resultados de los experimentos llevados a cabo por los presentes inventores son diferentes al menos a una de las referencias indicadas con respecto a la aplicación de DGJ. solo.

Ejemplo 3: Eficacia dependiente de la dosis de Ambroxol

Con el fin de determinar la eficacia dependiente de la dosis de Ambroxol sobre la actividad enzimática de GLA de tipo salvaje, se expuso la GLA de tipo salvaje a varias titulaciones de Ambroxol.

5 Los resultados se indican en la Fig. 2, que es un diagrama que indica la actividad relativa de GLA de tipo salvaje a diversas concentraciones de Ambroxol, estableciéndose la actividad de GLA sin Ambroxol como el 100 %.

Como puede tomarse de la Fig. 2, la actividad enzimática de GLA de tipo salvaje se incrementa con las titulaciones crecientes de Ambroxol. Además, es importante señalar que Ambroxol no inhibe la GLA de tipo salvaje. Parece haber un máximo local o una saturación potencial en o más allá de una titulación de Ambroxol de > 60 µM. Se determinó que la CE₅₀ era 21,2 µM.

10 En conexión con esto, es importante señalar que, en contraste con la GLA mutante, la actividad de GLA de tipo salvaje puede incrementarse después de la adición de Ambroxol, que puede tomarse de la Fig. 1 y la Fig. 2.

Ejemplo 4: efecto sinérgico del uso combinado de DGJ y Ambroxol sobre la actividad enzimática de mutantes de GLA

La actividad enzimática de diversas formas mutantes de GLA se determinó después de la exposición de las formas mutantes de GLA a (a) nada de DGJ ni Ambroxol, (b) DGJ 20 µM, o (c) DGJ 20 µM y Ambroxol 40 µM.

15 El resultado se indica en la Fig. 3.

Como puede tomarse de la Fig. 3, todos los mutantes de GLA que mostraron un efecto beneficioso con el tratamiento con DGJ también respondieron al Ambroxol cuando se añadieron juntos DGJ y Ambroxol al medio de cultivo.

20 Una persona experta en la técnica reconocerá que el ensayo descrito en la presente memoria puede usarse para identificar mutantes que responden particularmente bien. Debido a esto, el uso de Ambroxol en combinación con DGJ será terapéuticamente efectivo/ventajoso para los pacientes que responden al tratamiento con DGJ. Más precisamente, para todos los pacientes, el tratamiento con DGJ ha sido aprobado para aumentar la actividad de Gal A, el tratamiento adicional con Ambroxol solo puede tener un beneficio aún mayor.

25 En conexión con esto, es importante señalar que para todas las enzimas mutantes ensayadas se midió una actividad aumentada después de la aplicación de Ambroxol además de la chaperona farmacológica en comparación con la aplicación de la chaperona farmacológica sola. Esto prueba la existencia de una clara tendencia que subraya la ventaja de la combinación según la presente invención en comparación con la aplicación de la chaperona farmacológica sola. Por tanto, un experto en la técnica reconocerá inmediatamente que un aumento en la actividad enzimática mutante después de la administración de la combinación según la presente invención no tiene que estar necesariamente significativamente elevada en comparación con la administración de la chaperona farmacológica sola ya que, por un lado, en la aplicación clínica, el aumento de la actividad enzimática mutante solo en un grado bajo puede resultar en la prevención de síntomas o enfermedades como se ha descrito anteriormente. Por otro lado, una persona experta en la técnica también reconocerá que incluso si la aplicación de la combinación de la presente invención no conduce a actividades significativamente más altas de enzimas mutantes, la combinación de la presente invención aún puede ser ventajosa sobre la aplicación de la chaperona farmacológica en el sentido de que los costes significativos generalmente relacionados con la terapia de chaperona farmacológica pueden reducirse si la aplicación adicional de Ambroxol según la presente invención puede sustituir una cierta cantidad de chaperona farmacológica aplicada, logrando todavía el mismo beneficio clínico o similar para el paciente tratado. .

40 Se realizó un análisis de transferencia Western como se describe en el Ejemplo 1 y el resultado se indica en la Fig. 4. Como puede deducirse del mismo, el efecto estabilizador de DGJ es potenciado/mejorado por Ambroxol. El Ambroxol contribuye a la mayor cantidad de Gal A en la célula. Mientras se estabiliza, la enzima ya no se depleciona de las células por la maquinaria de degradación del retículo endoplásmico. La mayor cantidad de proteína/enzima acompaña/se correlaciona con la mayor actividad medida.

45 Se puede deducir de ello que la aplicación de la combinación según la presente invención en comparación con la aplicación de DGJ solo conduce a una mayor cantidad de Gal A en la célula respectiva. Una persona experta en la técnica reconocerá que la mutación de Gal A tales como las de la Fig. 4 no conduce a una expresión reducida de Gal A. Más bien, la Gal A mutante está sujeta a una degradación más rápida, preferiblemente debido al plegamiento incorrecto de la proteína. Los presentes inventores asumen que la aplicación de DGJ y/o Ambroxol no tiene ningún efecto sobre el nivel de expresión proteica de la proteína lisosomal. Más particularmente, la combinación según la presente invención parece contrarrestar, como una chaperona, preferiblemente una chaperona farmacológica, la degradación más rápida, más preferiblemente dicho contrarresto ocurre estabilizando la proteína mutante y conduciendo así a una degradación menos rápida de la proteína. Se puede tomar de la Figura 4 y más particularmente de la cantidad elevada de nivel de proteína que se puede detectar, que el Ambroxol aplicado en combinación con DGJ da como resultado una estabilización de la proteína mutante y/o da como resultado una degradación menos rápida.

Ejemplo 5: un tratamiento combinado de mutantes de GLA endógenos puede sustituir las dosis altas de DGJ

La actividad enzimática de las formas mutantes de GLA se determinó después de la exposición de las formas mutantes de GLA a (a) diferentes concentraciones de DGJ y a Ambroxol 40 μM o (b) diferentes concentraciones de DGJ y sin Ambroxol como se describe en el Ejemplo 1.

5 Los resultados se indican en la Fig. 5.

Más particularmente, la Fig. 5A muestra un diagrama que indica una relación de respuesta a la dosis de la actividad de GLA de la forma mutante de GLA A156V; y la Fig. 5B muestra un diagrama que indica una relación de respuesta a la dosis de la actividad de GLA de la forma mutante de GLA R301G.

10 Como puede tomarse de las Fig. 5A y B, el tratamiento con Ambroxol 40 μM además del tratamiento con DGJ solo aumenta la actividad de GLA.

Se puede ver inmediatamente que se logra un aumento de 3.8 veces de la actividad de GLA[A156V] mediante la aplicación de DGJ 8 μM y Ambroxol 40 μM , mientras que debe aplicarse un tratamiento con hasta DGJ 20 μM con el fin de alcanzar el mismo aumento de la actividad de la enzima mutante sin el tratamiento adicional de Ambroxol, lo que se enfatiza por la línea de puntos horizontal y vertical.

15 En otras palabras, debe aplicarse aproximadamente la mitad de la concentración de DGJ, es decir 8,9 μM , si se aplica además Ambroxol 40 μM , para alcanzar el mismo efecto que si se aplica DGJ 20 μM solo. Las mediciones absolutas de dicho ensayo son aproximadamente 300 nmoles de MU/mg de proteína total/h.

20 Es evidente que existe un efecto sinérgico que surge del uso combinado de DGJ y Ambroxol por el hecho de que la actividad de la alfa-galactosidasa A aumenta hasta 8 veces en el mutante A156V (Fig. 5A) cuando se administran tanto DGJ 20 μM como Ambroxol 40 μM , mientras que dicha actividad solo aumenta 4 veces la actividad de GLA[A156V] sin tratar en el caso de la administración de DGJ 20 μM solamente.

25 Se puede ver inmediatamente que se logra un aumento de 4,1 veces de la actividad de GLA[R301G] mediante la aplicación de DGJ 20 μM y Ambroxol 40 μM , mientras que el tratamiento con DGJ 20 μM sin tratamiento adicional con Ambroxol solo da como resultado un aumento de la actividad GLA. de 2,8 veces, lo que se enfatiza con la línea de puntos horizontal y vertical.

30 En conexión con esto, es importante señalar que se determinó que el valor absoluto de la actividad de GLA era de $3,7 \pm 0,4$ nmoles de MU/mg de proteína total/h. Un médico experto categorizará el estado de salud de un paciente, tal como el estado de un hombre humano, como "enfermo" si se determina un valor de actividad de GLA en una muestra de dicho paciente que sea menor que un valor de corte de 5 nmoles de MU/mg de proteína total/h. Un experto en la técnica reconocerá que la decisión de si la combinación según la presente invención, tal como ABX/DGJ, se administrará o no a un paciente, preferiblemente depende únicamente del estado genético del paciente, es decir, de la mutación particular de la respectiva proteína lisosomal. Más particularmente, el método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto comprendería las siguientes etapas:

35 etapa a): determinar si en una muestra del sujeto la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, preferiblemente dicha actividad reducida resulta de una o más mutaciones contenidas en la proteína lisosomal en comparación con la proteína lisosomal de tipo salvaje;

etapa b): identificar un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, y en donde el compuesto es adecuado para incrementar o está incrementando la actividad reducida de la proteína lisosomal; y

40 etapa c): administrar al sujeto la preparación farmacéutica, en donde el primer constituyente es el compuesto adecuado para o incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal identificada en la etapa b) y en donde el segundo constituyente es Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol.

45 Por consiguiente, si un paciente muestra menos de 5 nmoles de MU/mg/h de actividad de GLA, dicho paciente debe tener una "mutación respondedora" tal como una descrita en la tabla 3 de la presente memoria, mientras que el estado de salud de un paciente que tiene un valor de actividad de GLA de más de 5 nmoles de MU/mg de proteína total pero menos de 10 nmoles de MU/mg de proteína total/h se categorizará como "no claro".

50 En otras palabras, los presentes datos demuestran que la aplicación de DGJ y Ambroxol en combinación según la presente invención es capaz de aumentar la actividad de la proteína mutante, medida en el sistema de cultivo celular usado en la presente memoria, hasta un nivel que induciría a un médico experto a evaluar el estado de salud del paciente como "sano", es decir, que tiene una actividad de la proteína mutante que normalmente no da lugar a síntomas causados de otro modo por la actividad reducida de la proteína mutante, mientras que el tratamiento con DGJ solo da como resultado una actividad proteica de la proteína mutante que induciría a un médico experto a evaluar el estado de salud del paciente como "no claro".

Es importante señalar que, en el sistema de cultivo celular descrito en la presente memoria, una concentración de

DGJ tan baja como 4,72 μM , si se aplica en combinación con Ambroxol 40 μM , es suficiente para elevar la actividad de la proteína mutante hasta un nivel que solo se alcanza si se aplica DGJ 20 μM , si se aplica DGJ solo. En otras palabras, esto significa que debe aplicarse solo aproximadamente el 25 % de la concentración de DGJ si se aplica en combinación con Ambroxol 40 μM en comparación con la concentración de DGJ que debe aplicarse para alcanzar el mismo aumento de actividad proteica si se aplica DGJ solo.

De esto se deduce que la combinación de la presente invención es particularmente útil en el tratamiento de aquellos LSD, y más específicamente aquellas formas de enfermedad de Fabry, que implican formas mutantes de GLA en las que la chaperona y más específicamente DGJ solo no es suficientemente efectivo.

Ejemplo 6: efectos similares para el Ambroxol y el derivado de Ambroxol, Bromhexina

En este ejemplo, se comparó el efecto sobre la actividad enzimática de formas mutantes de GLA de Ambroxol y su derivado Bromhexina cuando se combinó con DGJ.

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados se muestran en la Fig. 6.

Como es evidente a partir de la Fig. 6, el Ambroxol y la Bromhexina se comportan de forma similar en las GLA mutantes. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el tratamiento con Ambroxol solo, véase el Ejemplo 2 en la presente memoria, no se pudo ver ningún efecto mediante un tratamiento que usa bromhexina sola; y el tratamiento con la chaperona DGJ sola aumentó la actividad de la alfa-galactosidasa A. Sin embargo, después del tratamiento con una combinación de chaperona DGJ y Ambroxol o una combinación de chaperona DGJ y Bromhexina, la actividad enzimática de las formas mutantes de GLA pudo aumentarse significativamente.

Como puede tomarse de la Fig. 6, el tratamiento con DGJ solo siempre conduce a un aumento altamente significativo de la proteína, es decir, de la actividad enzimática en comparación con "ningún tratamiento". No hubo diferencias significativas entre la actividad de la proteína medida después de la aplicación de una combinación de Ambroxol y DGJ en comparación con la actividad de la proteína medida después de la aplicación de una combinación de Bromhexina y DGJ. La actividad de la proteína medida después de la aplicación de una combinación de Ambroxol y DGJ en comparación con la actividad de la proteína medida después de la aplicación de DGJ solo fue significativa para las proteínas mutantes que tenían las mutaciones E59K, A156V (véase también la Fig. 3) y G328A.

Ejemplo 7: efectos similares para Ambroxol y NB-DNJ en la enfermedad de Pompe

En este ejemplo, se comparó el efecto sobre la actividad enzimática de las formas mutantes de la α -glucosidasa ácida de Ambroxol y su derivado Ambroxol cuando se combinaron con NB-DNJ.

El experimento se realizó como se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados se indican en la Fig. 7.

Como es evidente a partir de la Fig. 7 y de forma análoga a lo que se ha esbozado anteriormente en relación con la combinación según la presente invención y la enfermedad de Fabry (véanse las Fig. 1 a 6), la aplicación de la combinación según la presente invención aumenta la actividad de la proteína mutante respectiva en la enfermedad de Pompe en comparación con la aplicación de la chaperona farmacológica sola. Más específicamente, la aplicación de NB-DNJ 20 μM en combinación con la aplicación de Ambroxol 40 μM aumentó la actividad de la α -glucosidasa ácida en comparación con la aplicación de NB-DNJ 20 μM solo.

Más particularmente, la actividad enzimática de las mutaciones Y455F, P545L y L552P aumentó significativamente mediante NB-DNJ y el tratamiento combinado según la presente invención usando tanto NB-DNJ como Ambroxol. Dichas mutaciones mostraron una tendencia a actividades más altas cuando se trataron adicionalmente con Ambroxol. Sin embargo, solo L552P mostró significancia después de 4 experimentos.

Lo más importante es que Y575S mostró una clara tendencia a responder únicamente a la combinación de la presente invención.

Es importante señalar que el Ambroxol administrado solo no conduce a un aumento de la actividad de la α -glucosidasa ácida mutante.

Ejemplo 8: el efecto inhibitor de DGJ no se ve afectado por Ambroxol

La α -galactosidasa A de tipo salvaje (Replagal®, agalsidasa alfa) se incubó con diferentes concentraciones de DGJ y en ausencia o con una concentración constante de Ambroxol 40 μM . El resultado se muestra en la Figura 8.

Más particularmente, la Fig. 8 muestra que el efecto inhibitor de DGJ sobre la actividad enzimática permanece inalterado por Ambroxol.

Puede deducirse de esto que el Ambroxol no tiene ningún efecto sobre la inhibición de la α -galactosidasa A WT por DGJ. Se determinó que la CI_{50} no se modificó en ambas aplicaciones (0,07 μ M). El diagrama de incrustación (arriba a la derecha) muestra el efecto de la adición de Ambroxol solo a dos valores de pH diferentes (pH 4,5 y pH 6,7). No se pudo detectar ninguna reducción de la actividad enzimática.

- 5 Puede deducirse de esto que el Ambroxol solo no muestra ni un efecto inhibitor ni estimulante sobre la enzima de tipo salvaje.

Ejemplo 9: efecto de los compuestos candidatos sobre la actividad del mutante de la α -galactosidasa A, A156V

Se ensayaron diferentes compuestos que también se denominan en la presente memoria compuestos candidatos o derivados de Ambroxol y Bromhexina, respectivamente, en combinación con DGJ en cuanto a su efecto sobre la actividad del mutante de la α -galactosidasa A, A156V.

Los resultados se muestran en la Fig. 9A, Fig. 9B y Fig. 10.

Más particularmente, las Fig. 9A y 9B son diagramas que indican la actividad del mutante de la α -galactosidasa A ácida, A156V; el eje y indica la actividad del mutante de la α -galactosidasa A, A156V, normalizada al cien por cien de la actividad α -galactosidasa A de tipo salvaje (WT) en ausencia o presencia de tratamiento con Ambroxol (ABX), bromhexina (BHX) o los diversos compuestos como se indica en el eje x en combinación con 20 μ M de la chaperona farmacológica DGJ.

Puede deducirse de esto que, en particular, los compuestos SF-54B y SF-55C muestran un alto incremento de la actividad enzimática mutante cuando se aplican en combinación con DGJ, en el que la concentración de SF-54B y SF-55C es 10 μ M y 40 μ M, respectivamente. Más importante aún, la aplicación del compuesto SF-80 cuando se aplicó a una concentración tan baja como 1 μ M en combinación con DGJ dio lugar a un incremento en la actividad enzimática mutante tan alto como si se aplicara Ambroxol a una concentración de hasta 10 μ M en combinación con DGJ.

La Fig. 10 es un panel de diagramas que muestra la actividad del mutante de la α -galactosidasa A, A156V. El eje y indica la actividad de la α -galactosidasa A normalizada al cien por cien de la actividad de la α -galactosidasa A de tipo salvaje (WT) en ausencia de tratamiento con la chaperona farmacológica DGJ y concentraciones crecientes de Ambroxol (ABX), Bromhexina (BHX) o los compuestos indicados en el eje x en combinación con la chaperona farmacológica DGJ. En el eje x se indica la concentración del compuesto. El experimento se llevó a cabo al menos 3 veces como se describe en el Ejemplo 1 (excepto para las Fig. 10E y 10F, como se indica en la figura). Las barras de error se indican como error estándar de la media (o desviación estándar cuando $N < 3$) usando el software Excel (Microsoft, Redmont, Washington, EE. UU.). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$. Las estrellas indicadas muestran las significancias del tratamiento con DGJ solo en comparación con el tratamiento con una combinación de ABX, BHX o el compuesto mencionado y DGJ. BHX (B) y especialmente SF-55C (D) mostraron un efecto tóxico sobre las células a una concentración de 80 μ M.

Puede deducirse de esto que los compuestos SF-54B, SF-55C, SF-150B y SF153B muestran un alto incremento de la actividad enzimática mutante cuando se aplican en combinación con DGJ.

35 Ejemplo 10: efecto de los compuestos candidatos efecto sobre la actividad de los mutantes de la α -galactosidasa A, Y455F y L552P

Se ensayaron diferentes compuestos que también se denominan en la presente memoria compuestos candidatos o derivados de Ambroxol y Bromhexina, respectivamente, en combinación con DNJ para determinar el efecto sobre la actividad de los mutantes de la α -galactosidasa A, Y455F y L552P, respectivamente.

40 Los resultados se muestran en la Fig. 11A y la Fig. 11B.

Las Fig. 11A y 11B son diagramas que indican la actividad de la α -glucosidasa ácida. El diseño es similar al de las Fig. 7A y 7B, el iminoazúcar usado en estos experimentos es DNJ. El diagrama de la figura 11A muestra el efecto sobre la actividad de la α -glucosidasa ácida mutante después de la adición de DNJ 20 μ M solo y DNJ 20 μ M con Bromhexina 40 μ M (BHX) o un compuesto derivado de la misma. El diagrama de la Fig. 1 11B muestra el efecto sobre la α -glucosidasa ácida mutante después de la adición de DNJ 20 μ M solo y DNJ 20 μ M con 40 μ M de tres compuestos similares a Ambroxol (ABX). Los experimentos se llevaron a cabo al menos 3 veces (a menos que se indique lo contrario). Las barras de error se indican como error estándar de la media (o desviación estándar cuando $N < 3$) usando el software Excel (Microsoft, Redmont, Washington, EE. UU.). Los valores de p son * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,005$.

Puede deducirse de esto que el incremento de la actividad de la α -glucosidasa ácida del mutante Y455F es comparable cuando se aplica DNJ solo o cuando se aplica Bromhexina, los compuestos SF-54B, SF-55C y SF-124B, respectivamente, en combinación con DNJ. Más importante aún, el incremento en la actividad del mutante Y455F es mayor cuando se aplica DNJ en combinación con SF-150B y SF-153B en comparación con el efecto que surge de DNJ solo.

También se puede deducir de esto que el incremento de la actividad del mutante L552P es mayor cuando se aplican

ES 2 864 774 T3

los compuestos SF-124B, SF-150B y SF-153B, respectivamente, en combinación con DNJ en comparación con el efecto que surge de DNJ solo.

<110> Centogene GmbH

5 <120> Combinación de un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar una enzima lisosomal y Ambroxol y/o un derivado de Ambroxol

<130> C 10046 PCT

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> sintético

<400> 1

acaatgcagc tgaggaacc 19

25 <210> 2

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> sintético

<400> 2

ggtgttcgaa ttaaagtaag tctttaatg acatctgca 39

35

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

40

<220>

<223> sintético

<400> 3

45 taggagctgt ccaggccatc 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

50 <213> Artificial

<220>

<223> sintético

55 <400> 4

gagagactaa cacactccgc 20

REIVINDICACIONES

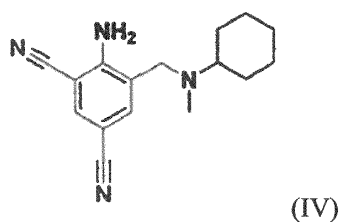
1. Una combinación que comprende un primer constituyente y un segundo constituyente,

en donde el primer constituyente es una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona es un imino azúcar seleccionado del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A₃, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y

en donde el segundo constituyente es Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

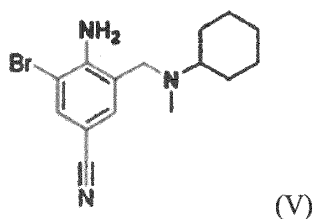
bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma,

un compuesto de la fórmula (IV)



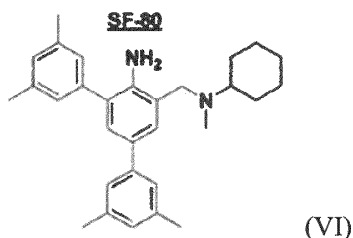
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de la fórmula (V)



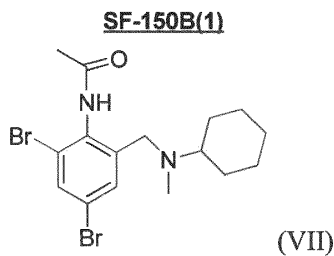
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VI)



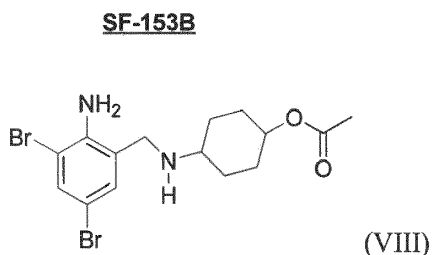
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

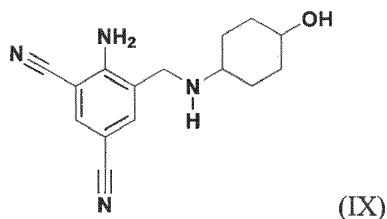
un compuesto de fórmula (VIII)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)



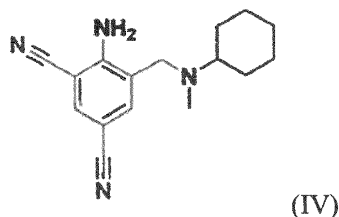
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 2. La combinación según la reivindicación 1, en donde la proteína lisosomal se ve afectada en una enfermedad y en donde la proteína lisosomal se selecciona del grupo que consiste en alfa-galactosidasa A y alfa-glucosidasa.
3. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la combinación es una combinación farmacéutica.
- 15 4. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la combinación es adecuada para o es para su uso en un método para el tratamiento de un sujeto que comprende la administración de la combinación al sujeto.
5. La combinación según la reivindicación 4 o para su uso según la reivindicación 4, en donde el sujeto padece o corre el riesgo de padecer una enfermedad, en donde la enfermedad se caracteriza por una enzima que tiene actividad reducida, en donde la enzima que tiene actividad reducida se selecciona del grupo que consiste en alfa-galactosidasa A y alfa-glucosidasa.
- 20 6. La combinación según la reivindicación 5 o para su uso según la reivindicación 5, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Schindler-Kanzaki, la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Parkinson.
- 25 7. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 o para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde la enzima es alfa-galactosidasa A y la enfermedad se selecciona del grupo que comprende la enfermedad de Fabry, enfermedad de Schindler-Kanzaki y enfermedad de Parkinson.
8. La combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 o para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en donde la enzima es alfa-glucosidasa y la enfermedad es la enfermedad de Pompe.
9. Uso de una combinación como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad.

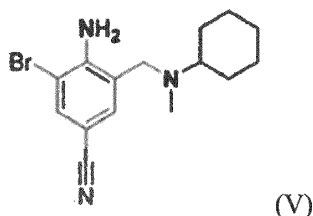
10. Una preparación farmacéutica que comprende un primer constituyente, un segundo constituyente, opcionalmente un constituyente adicional,

5 donde el primer constituyente es una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A₃, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos,

en donde el segundo constituyente es Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)

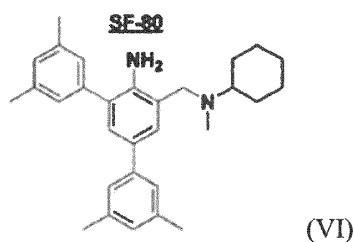


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un compuesto de la fórmula (V)



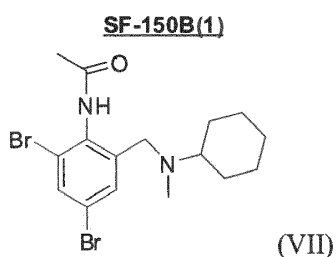
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VI)



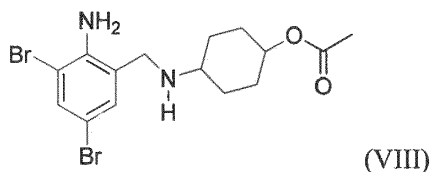
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)



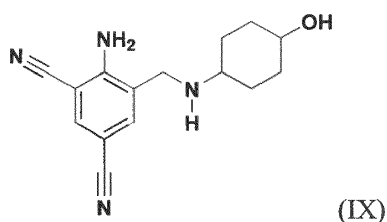
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de fórmula (VIII)

SF-153B



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

5 un compuesto de fórmula (IX)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

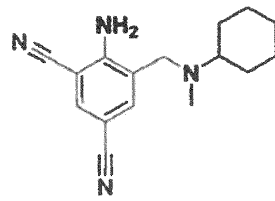
en donde el constituyente adicional se selecciona del grupo que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un agente farmacéuticamente activo, y

10 en donde preferiblemente la preparación farmacéutica incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal, y en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida.

11. Un método para preparar una preparación farmacéutica según la reivindicación 10, que comprende las etapas de formular el primer constituyente y el segundo constituyente en una única forma de dosificación o en dos formas de dosificación separadas, en donde en el caso de dos formas de dosificación separadas, una primera de las dos formas de dosificación separadas contiene el primer constituyente y una segunda de las dos formas de dosificación separadas contiene el segundo constituyente.

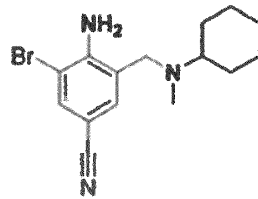
12. Una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX), alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A3, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamidogalactonojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad,

en donde el método comprende administrar a un sujeto la chaperona y, antes de, concomitantemente con o después Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)



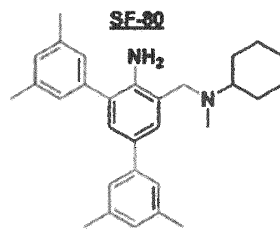
(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de la fórmula (V)



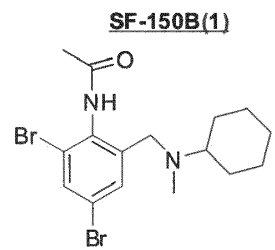
(V)

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de fórmula (VI)



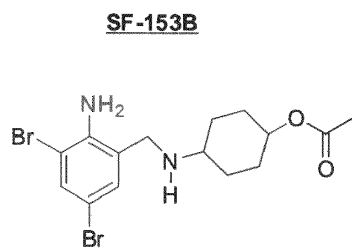
(VI)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de fórmula (VII)



(VII)

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
un compuesto de fórmula (VIII)

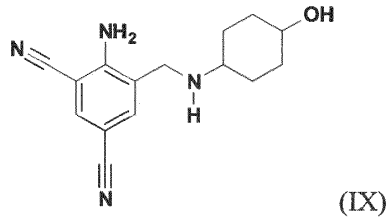


(VIII)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

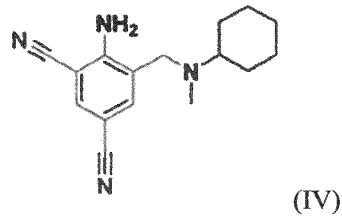
15

un compuesto de fórmula (IX)



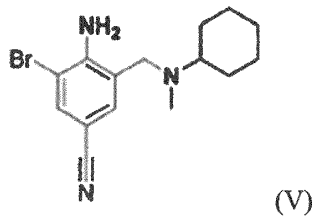
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 13. Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)



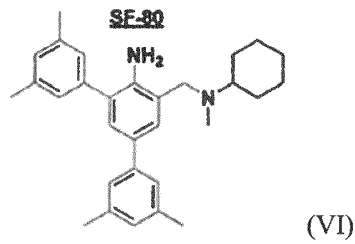
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de la fórmula (V)



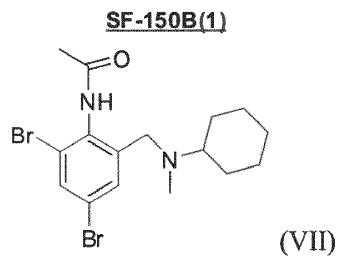
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VI)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)

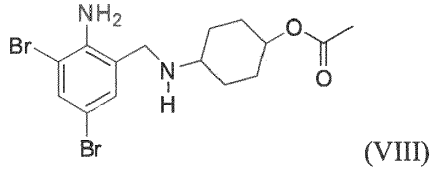


15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VIII)

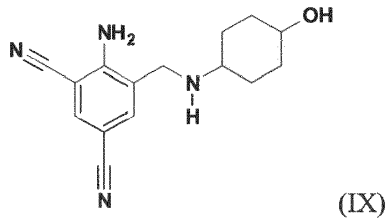
SF-153B



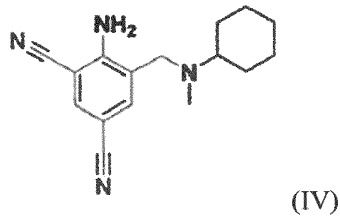
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)

5

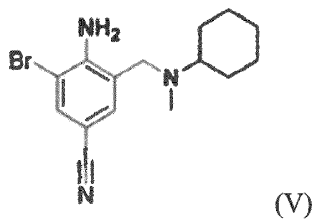


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad, en donde el método comprende administrar a un sujeto Ambroxol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, bromhexina o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un compuesto de la fórmula (IV)



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

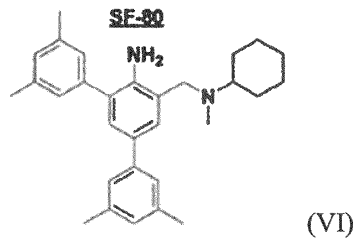
un compuesto de la fórmula (V)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

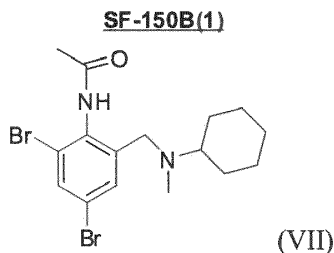
un compuesto de fórmula (VI)

15



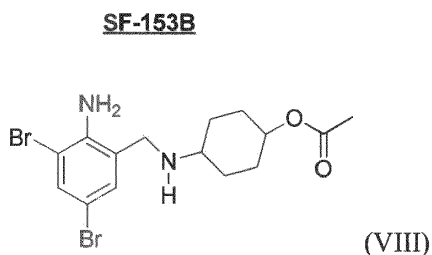
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

un compuesto de fórmula (VII)



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

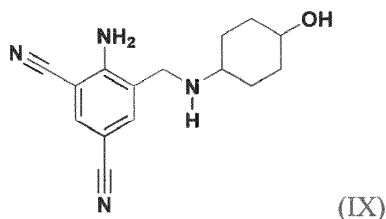
un compuesto de fórmula (VIII)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y/o

un compuesto de fórmula (IX)



10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y, antes de, concomitantemente con, o después una chaperona que tiene la capacidad de reorganizar una proteína lisosomal, en donde la proteína lisosomal tiene una actividad reducida y en donde la chaperona se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), alfa-galacto-homonojirimicina, alfa-alo-homonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina, beta-1-C-butil-desoxinojirimicina, N-nonil-desoxinojirimicina (NN-DNJ), N-octil-2,5-anhidro-2,5-imino-D-glucitol, N-octil-isofagomina, isofagomina (IFG), calistegina A3, calistegina B1, calistegina B2, calistegina C1, 1,5-didesoxi-1,5-iminoxilitol (DIX),
 15 alfa-1-C-nonil-DIX, alfa-1-C-octil-1-DNJ, N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT), 6-acetamido-6-desoxicastanospermina (ACAS), N-butil-DNJ, desoxinojirimicina (DNJ), 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), N-dodecil-DNJ, 6-nonil-isofagomina, N-metil calistegina A3, 4-epi-isofagomina, 1-desoxinojirimicina, alfa-homonojirimicina, castanospermina, 1-desoximanojirimicina, Swainsonina, 2-hidroxi-isofagomina, 1-desoxifuconojirimicina, beta-homofuconojirimicina, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol, 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-fucitol, 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina, 1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galaconojirimicina, 2-N-acetilamino-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 2-N-acetamido-isofagomina, 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina, 1-desoxiiduronojirimicina, 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina, 6-carboxi-isofagomina, ácido 2,6-didesoxi-2,6-imino-siálico y castanospermina (CAS); y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

25 14. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método de tratamiento terapéutico personalizado de un sujeto, en donde el método comprende las siguientes etapas:

etapa a): determinar si en una muestra del sujeto la proteína lisosomal tiene una actividad reducida, preferiblemente dicha actividad reducida resulta de una o más mutaciones de la proteína lisosomal en comparación con la proteína lisosomal de tipo salvaje;

30 etapa b): identificar un compuesto que tiene la capacidad de reorganizar la proteína lisosomal que tiene actividad reducida, y en donde el compuesto es adecuado para o incrementa la actividad reducida de la proteína lisosomal; y

etapa c): administrar al sujeto el primer constituyente antes de, concomitantemente con, o después del segundo constituyente.

Figura 1:

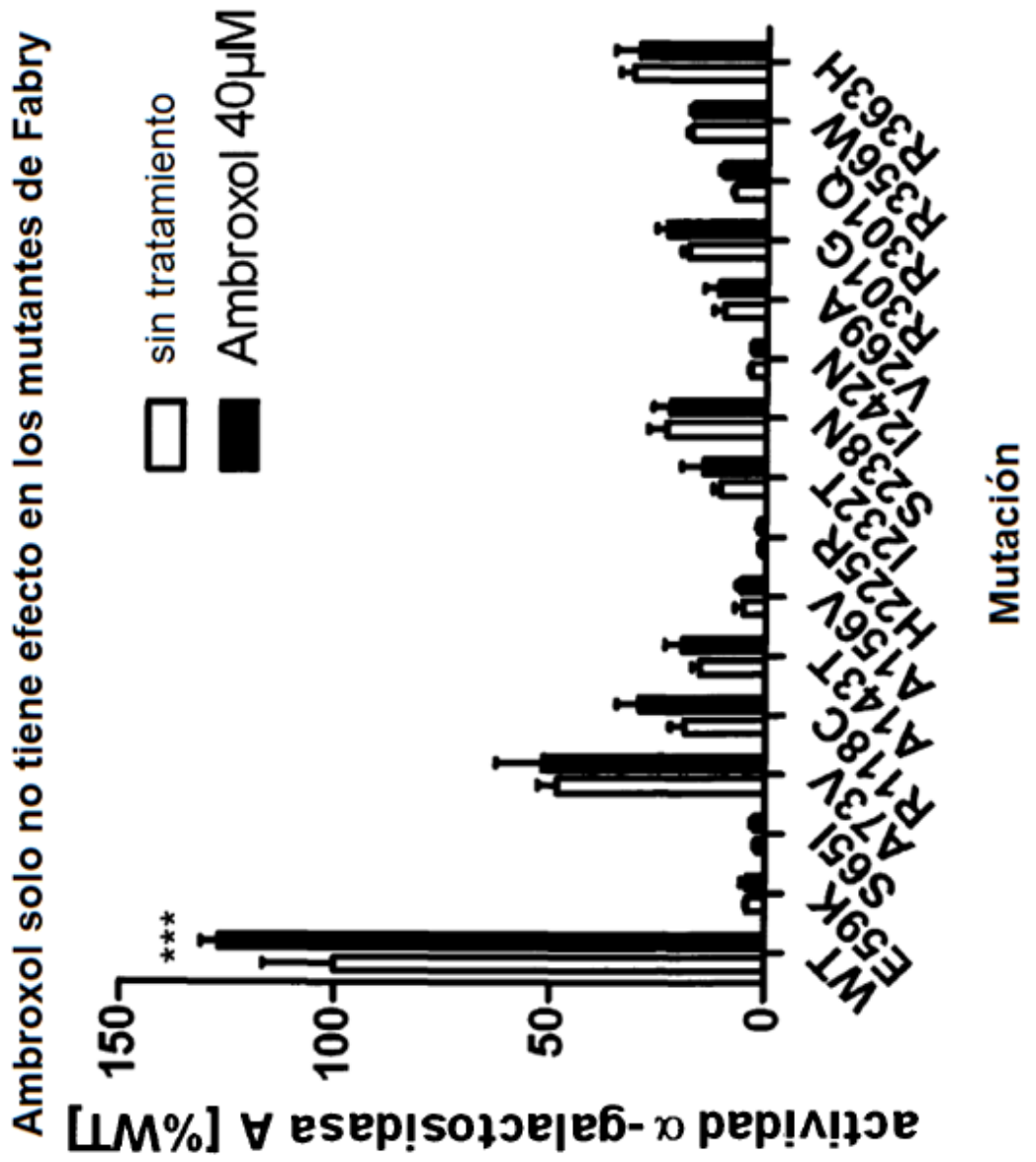


Figura 2:

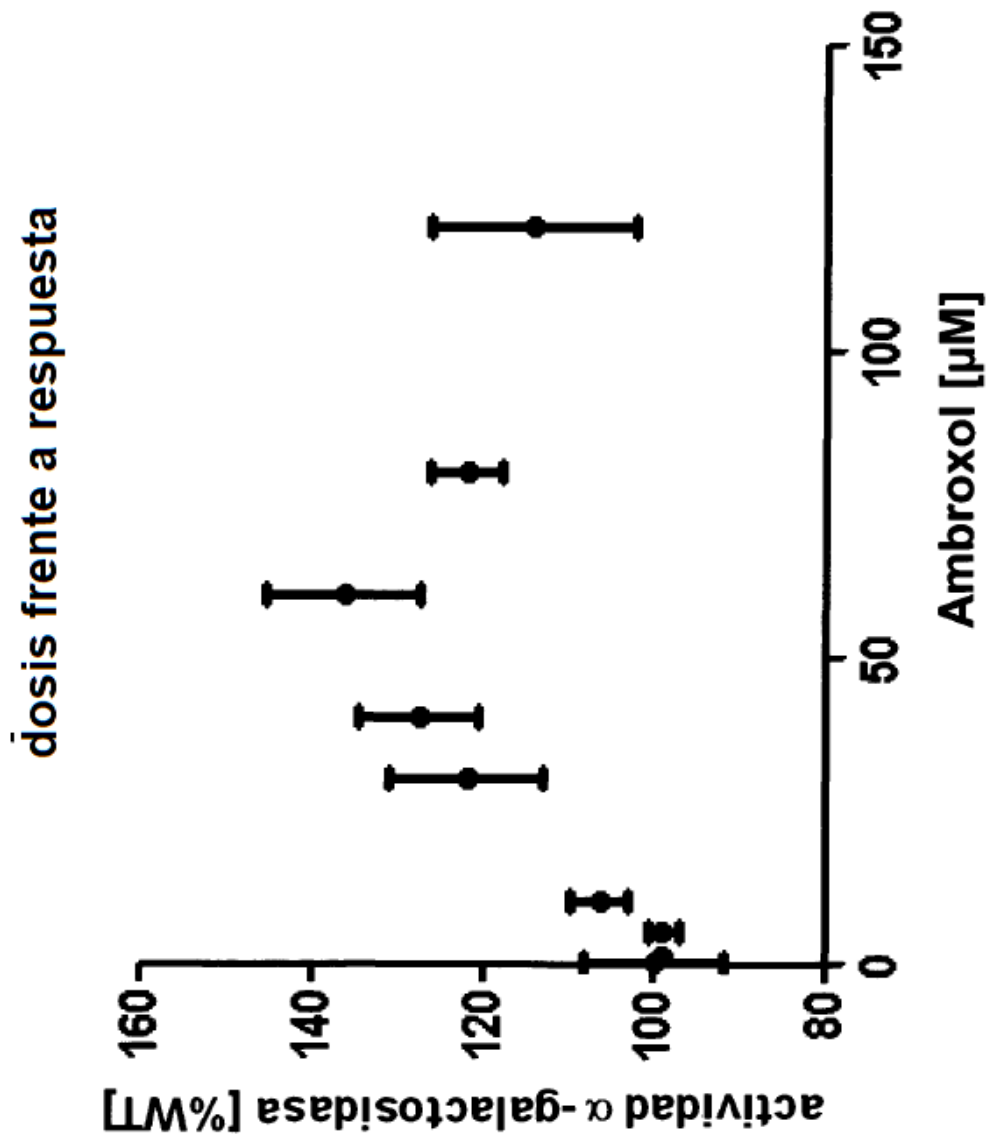


Figura 3A:

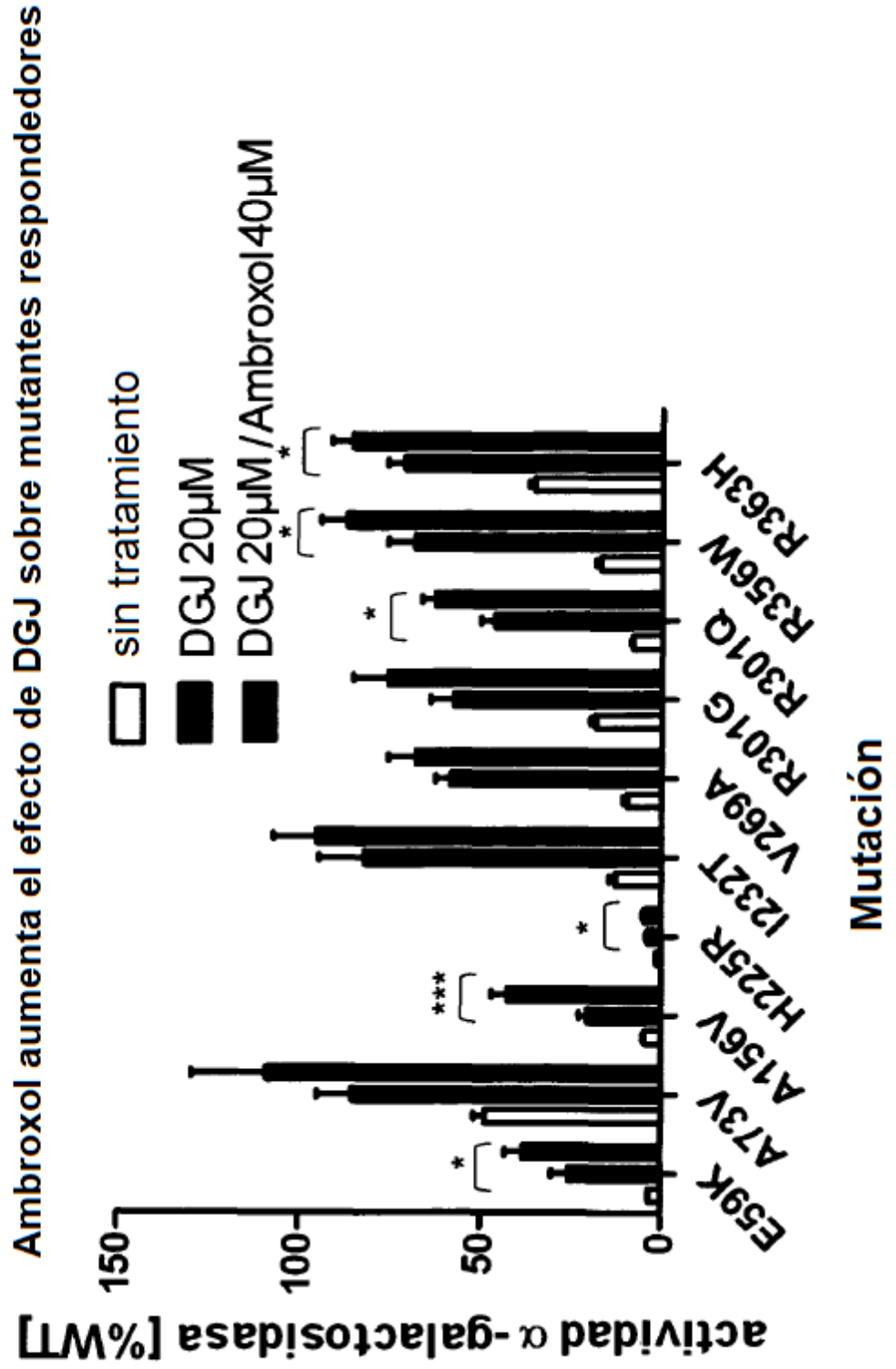


Fig. 3B: El no azúcar Galactosa no imino y ABX también muestran el efecto combinatorio sobre mutantes Fabry [N=2, los valores son la media ±SD]

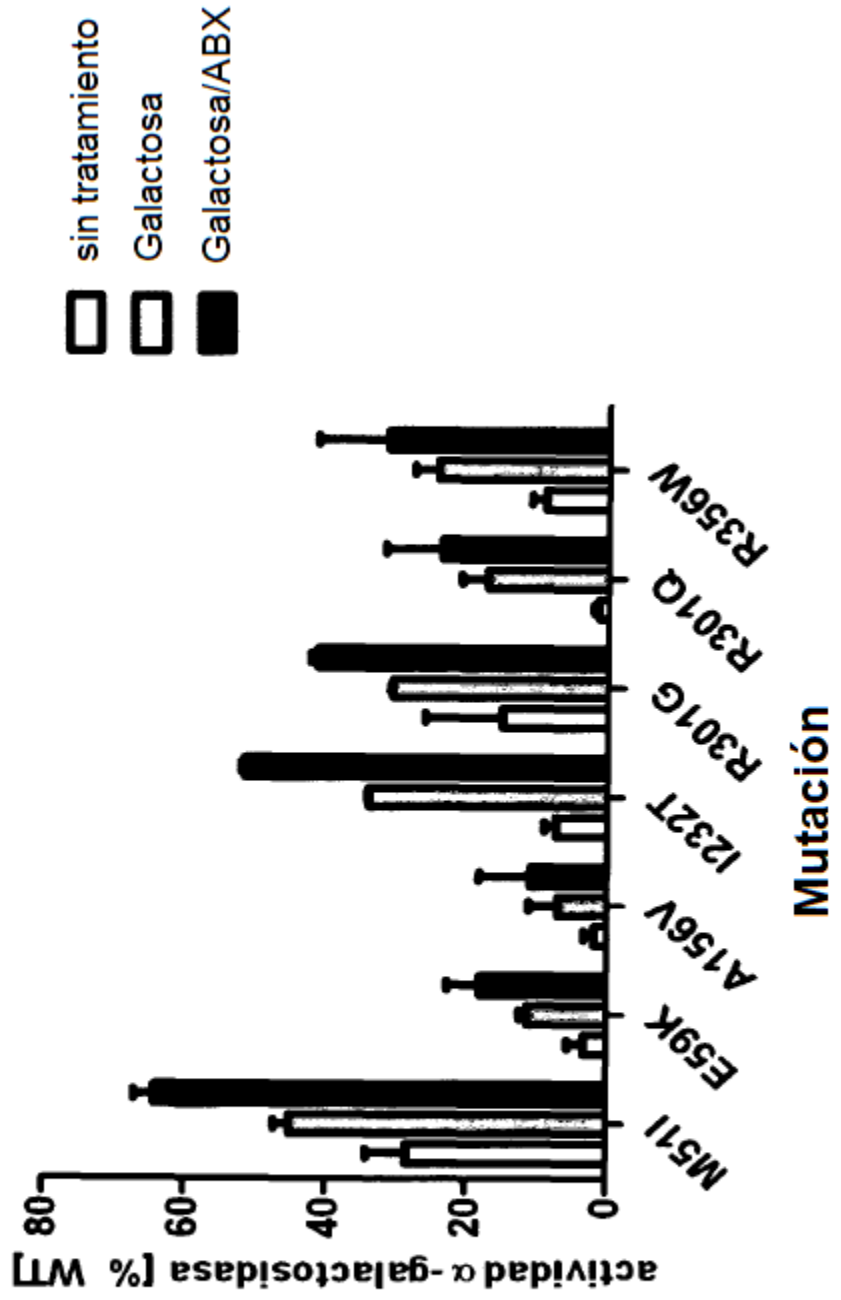


Figura 4:

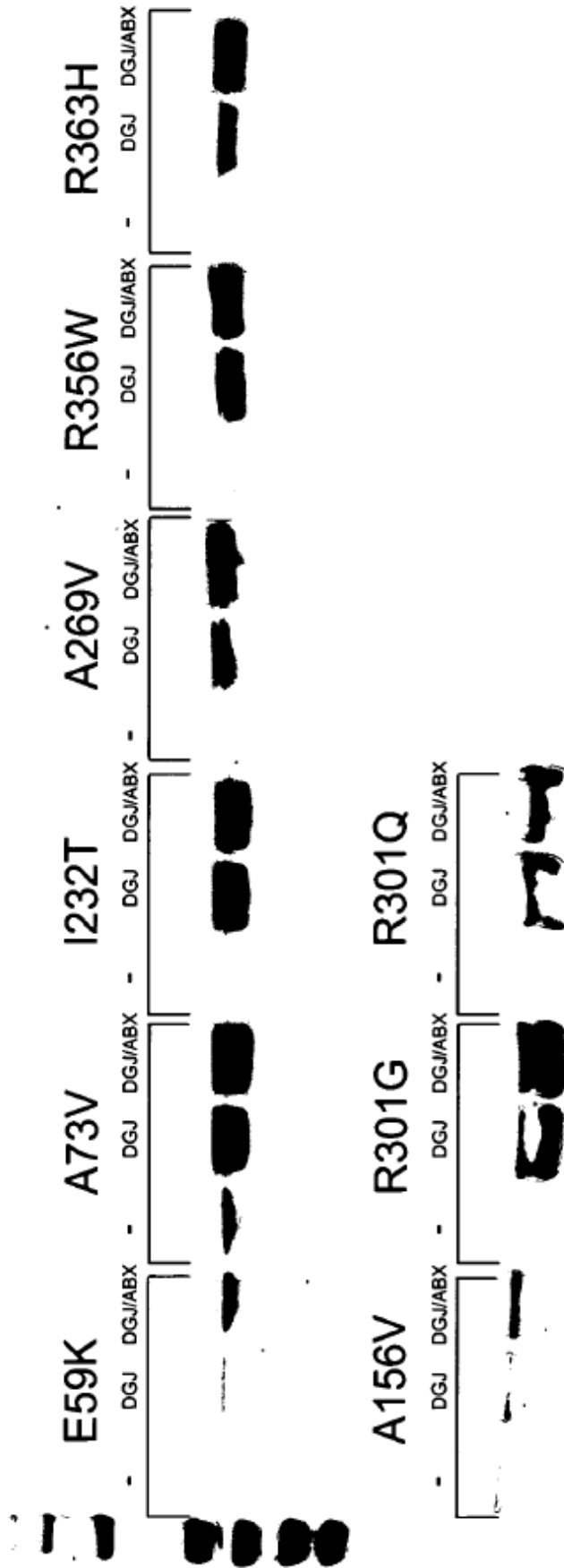


Figura 5A: Un tratamiento de combinación de Glc[A156V] puede sustituir dosis altas de DGJ

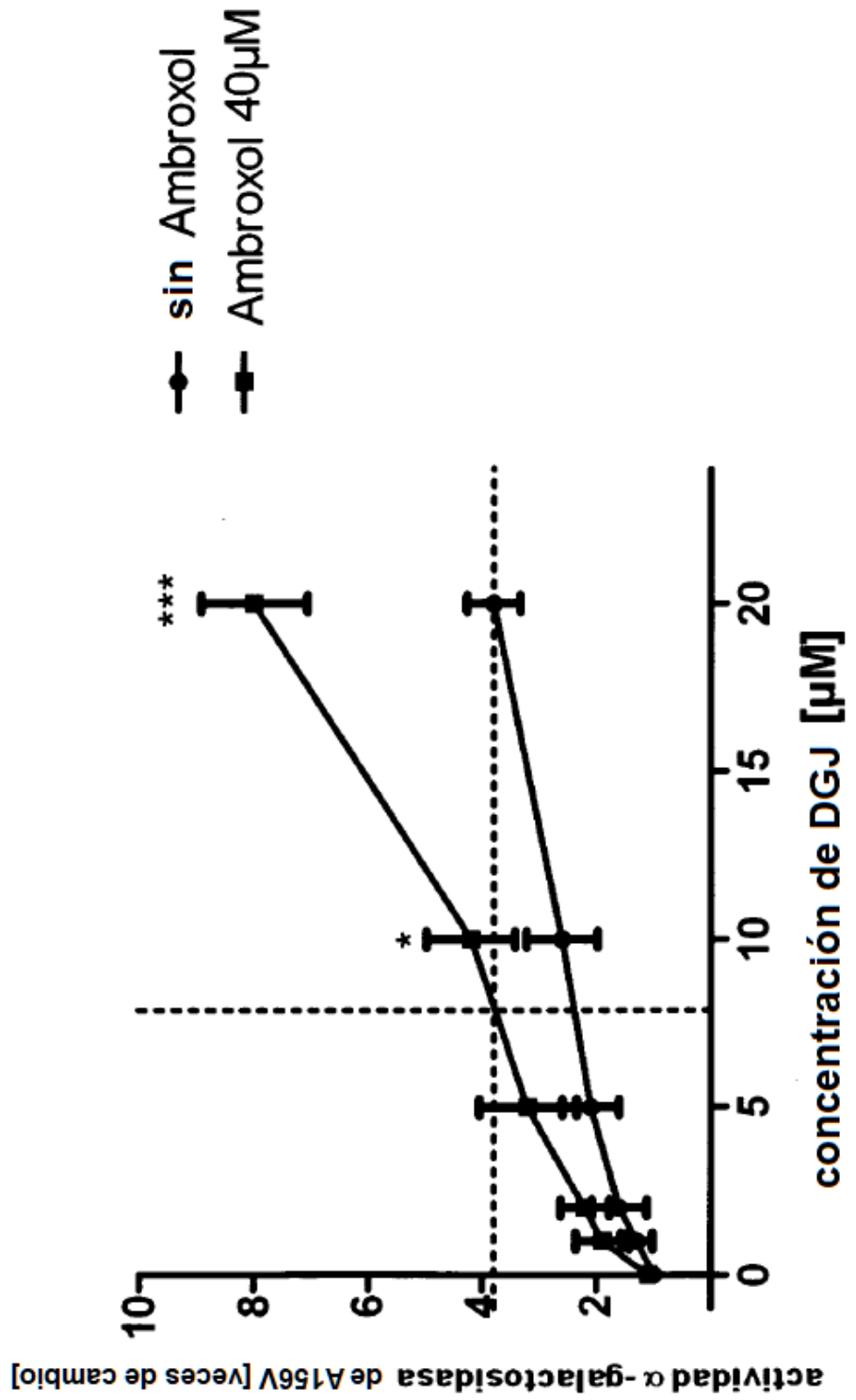


Figura 5B: Un tratamiento de combinación de Gla[R301G] endógeno puede sustituir dosis altas de DGJ

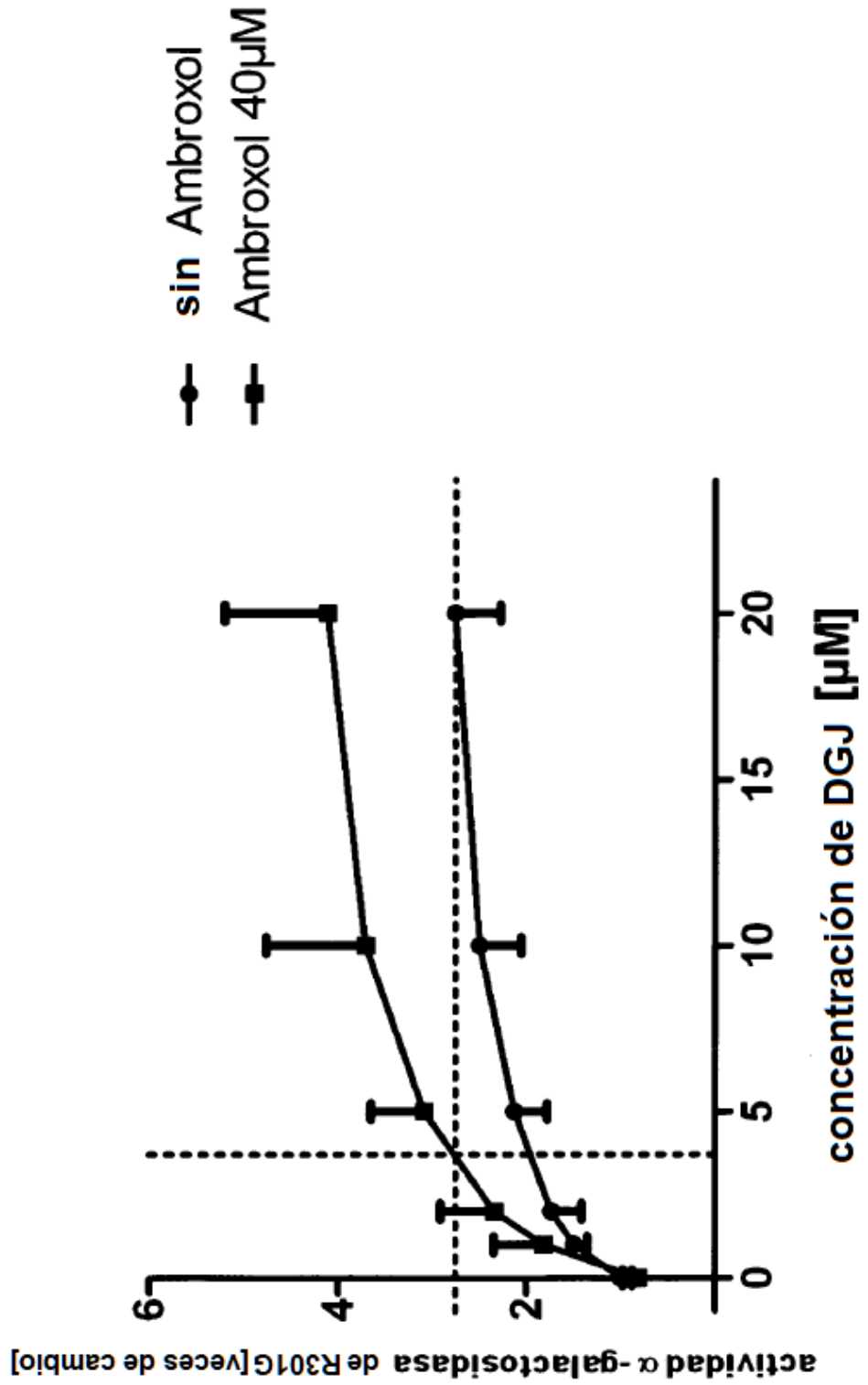


Figura 6:

Bromhexina muestra un efecto similar al análogo estructural Ambroxol

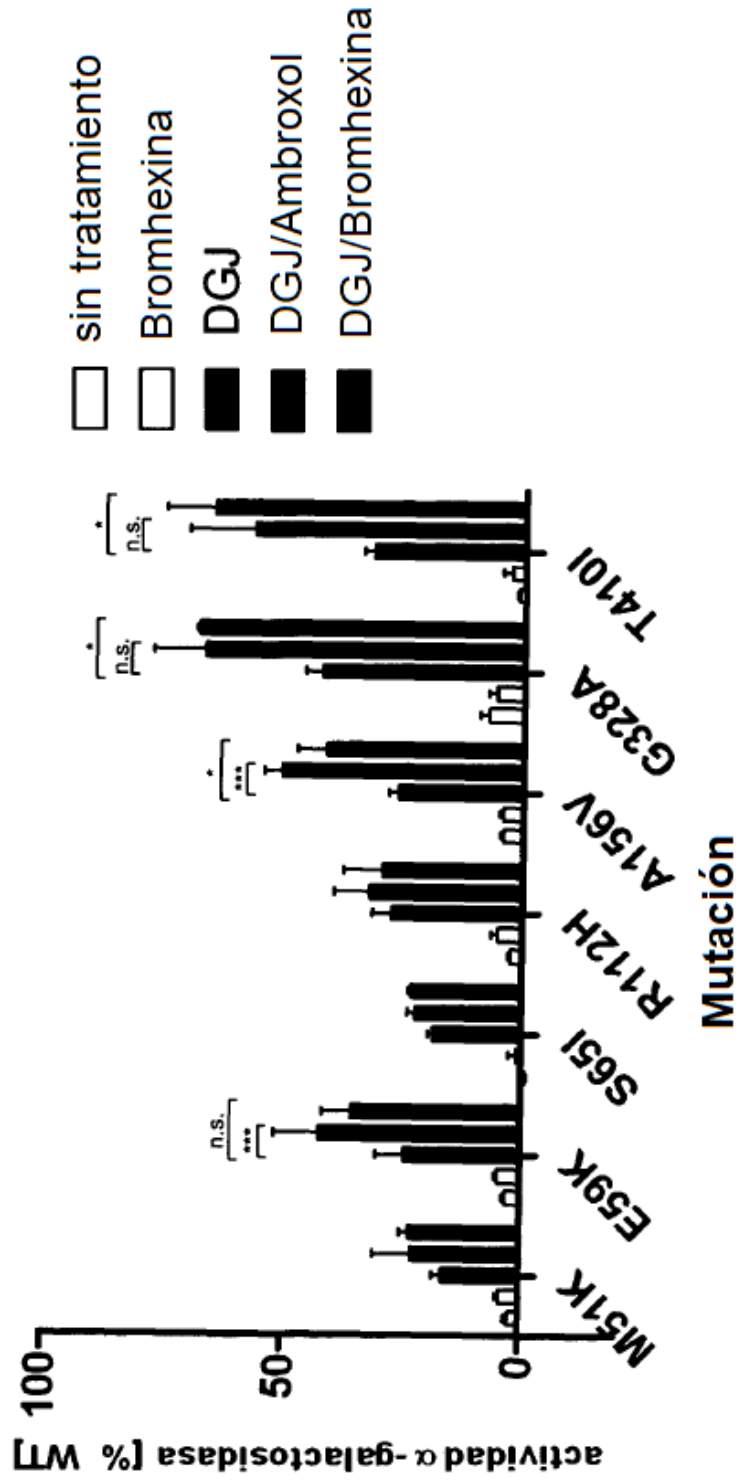


Figura 7A: Efecto de NB-DNJ y del tratamiento de combinación de NB-DNJ/Ambroxol en las mutaciones de la Enfermedad de Pompe

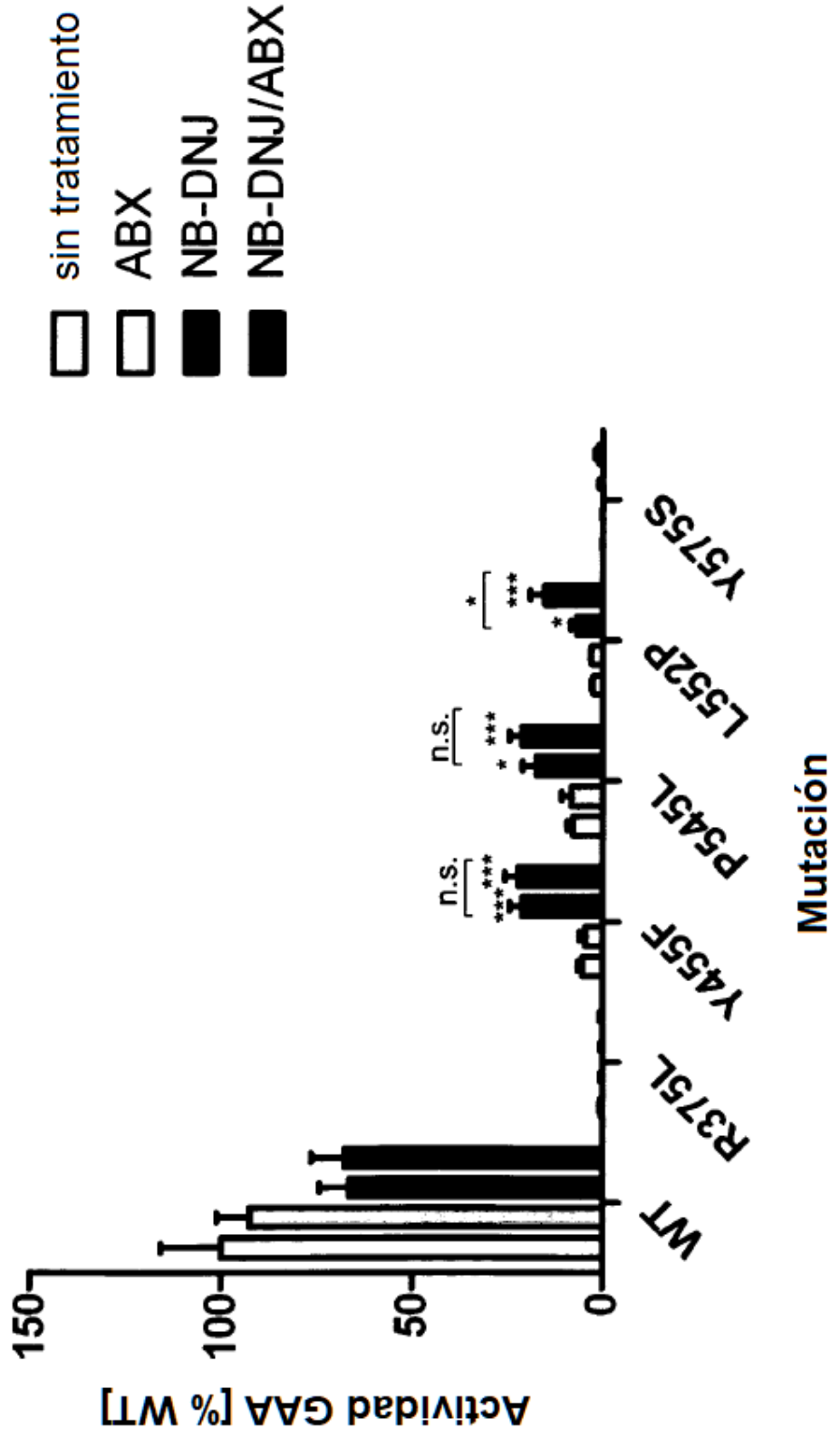


Figura 7B: Efecto de DNJ y del tratamiento de combinación de DNJ/Ambroxol en los mutantes de la Enfermedad de Pompe respondedores a iminoazúcar [los valores son la media \pm SEM]

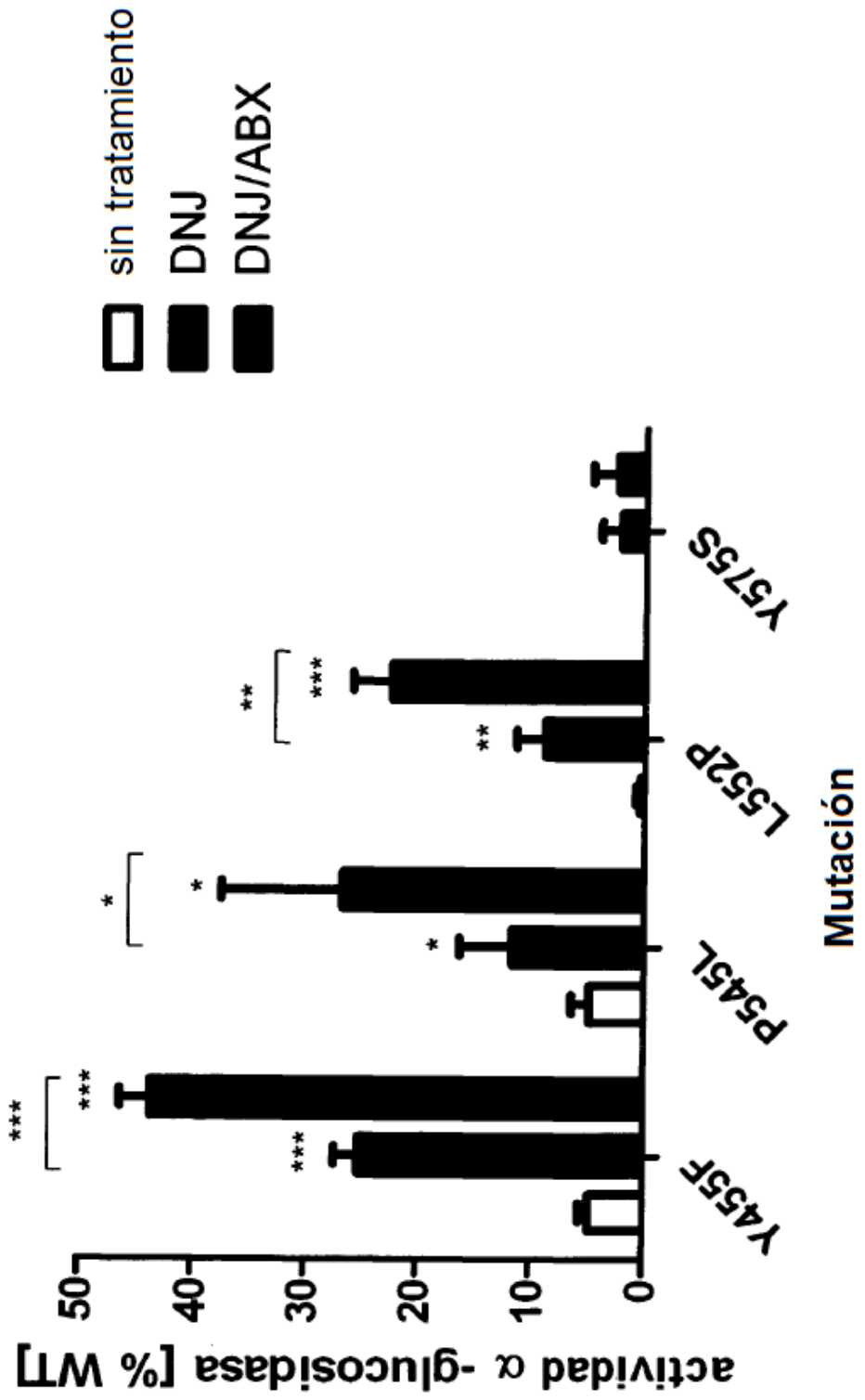


Figura 8: El efecto inhibidor de DGJ no se ve afectado por Ambroxol

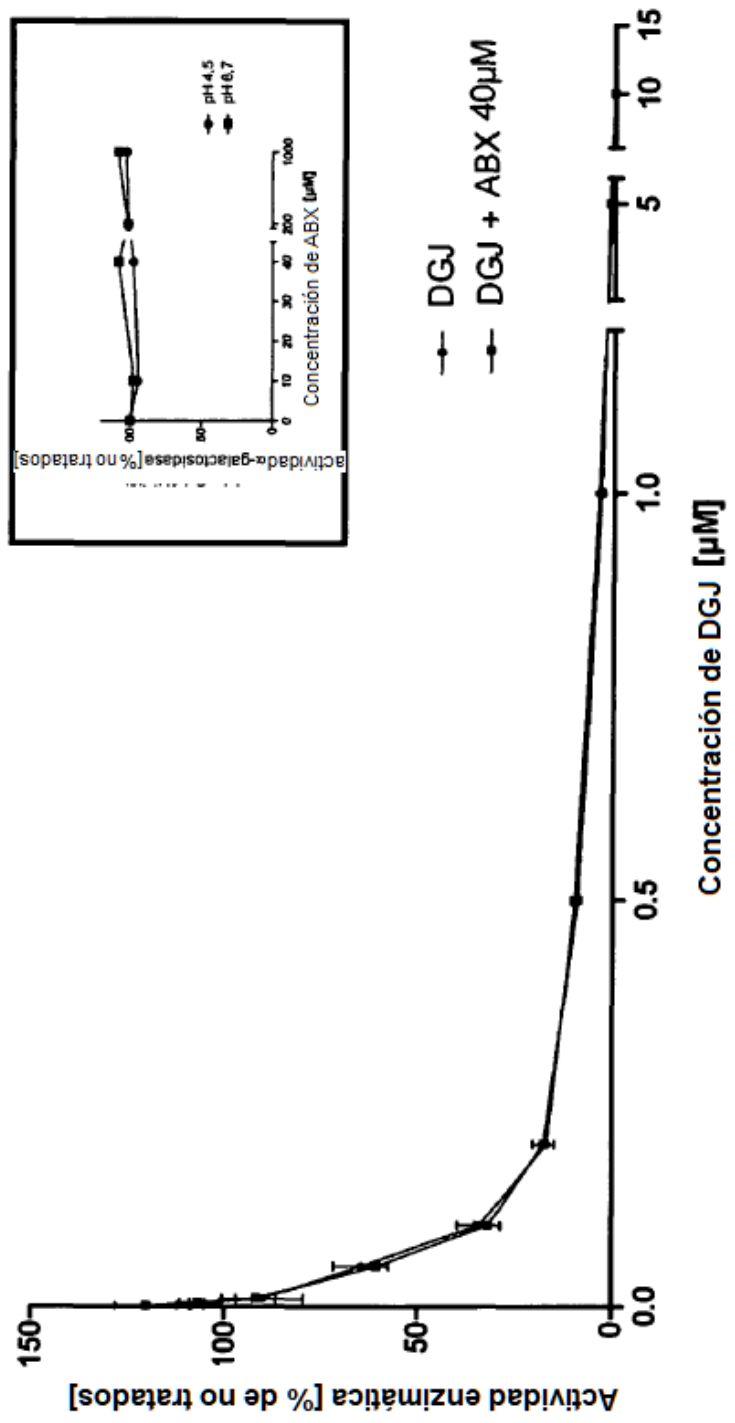


Figura 9A:

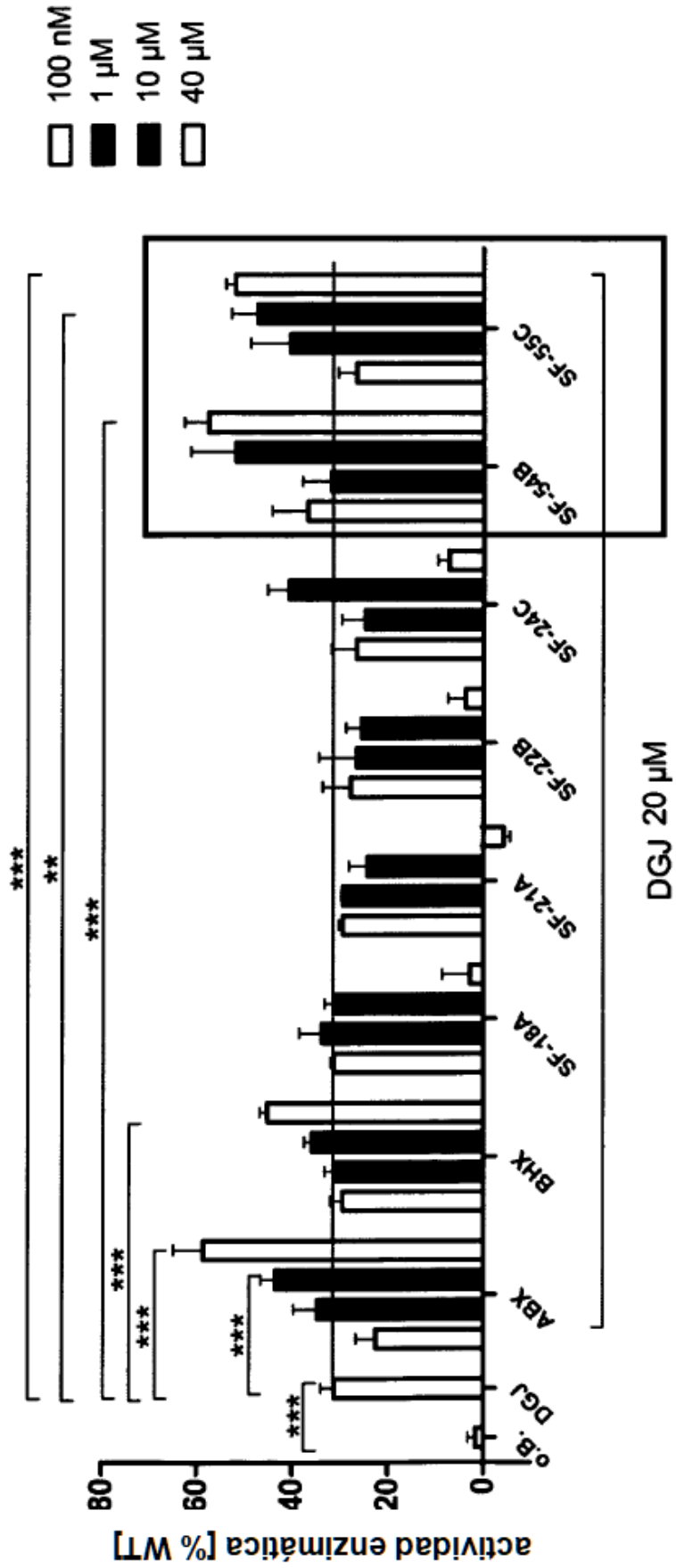


Figura 9B:

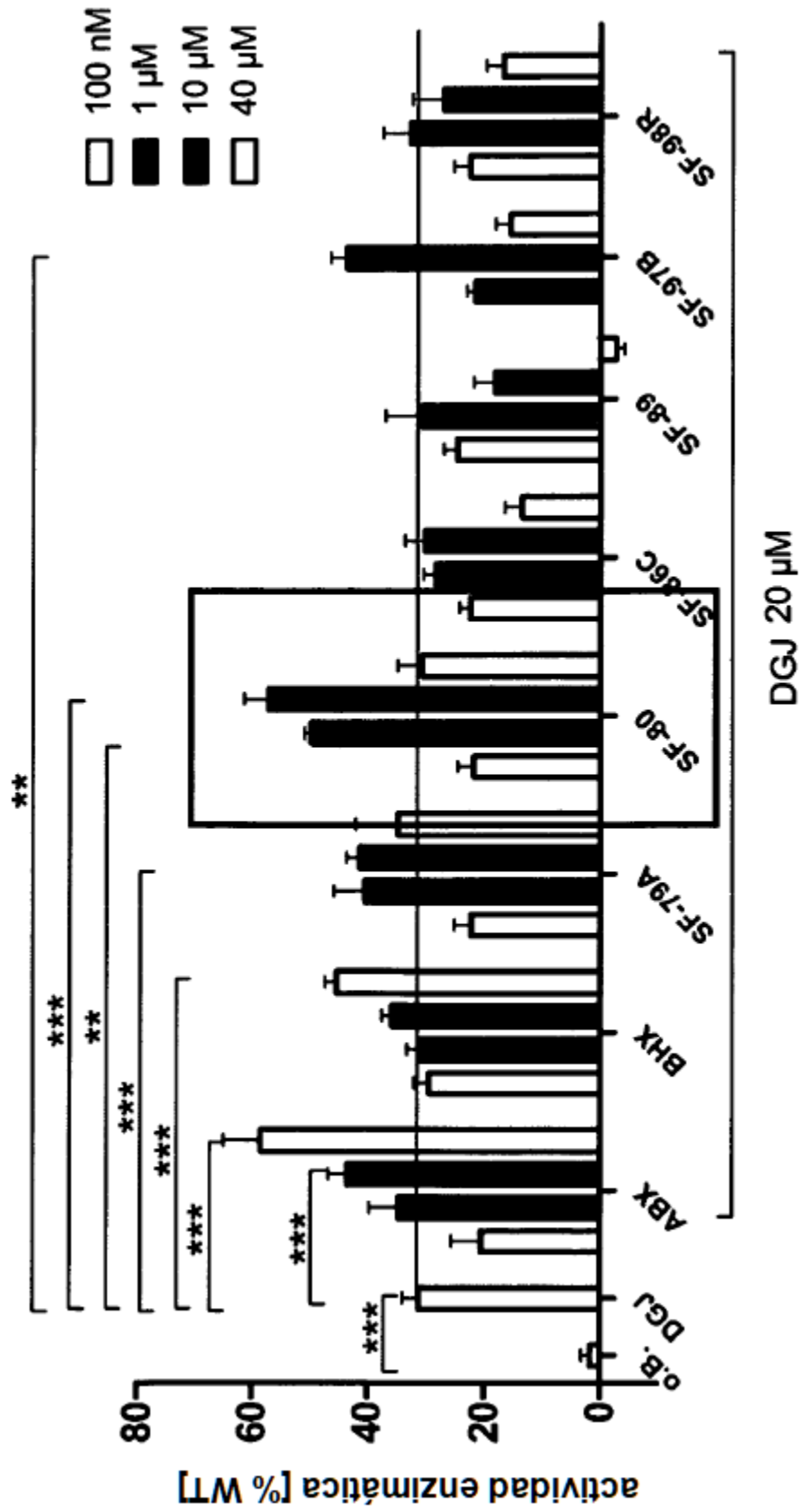


Figura 10: Ambroxol y derivados en combinación con DGJ incrementan la actividad de GLA[A156V] de forma dependiente de la concentración

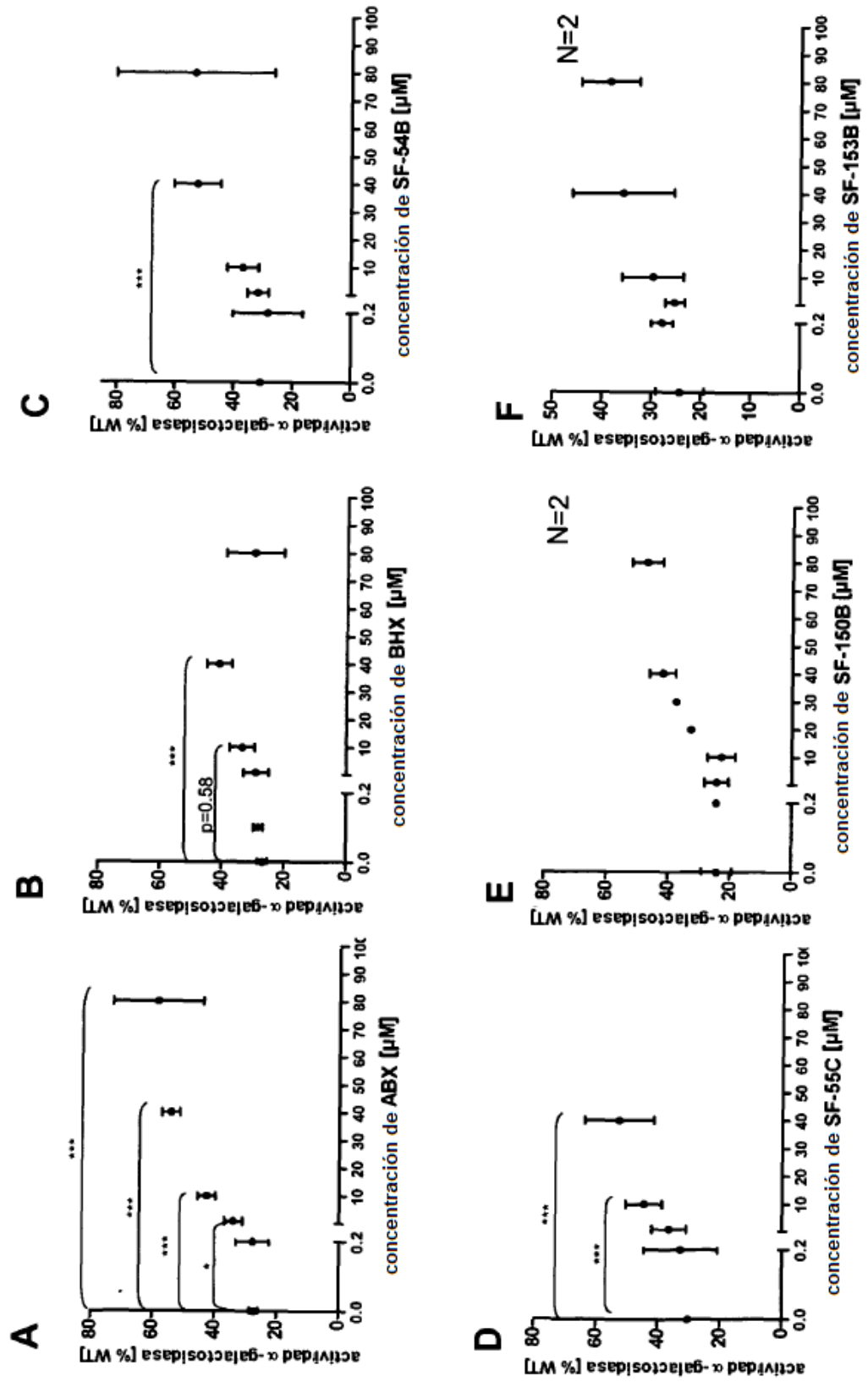


Figura 11A: La mutación Y455F de Pompe no responde a las estructuras similares a Bromhexina

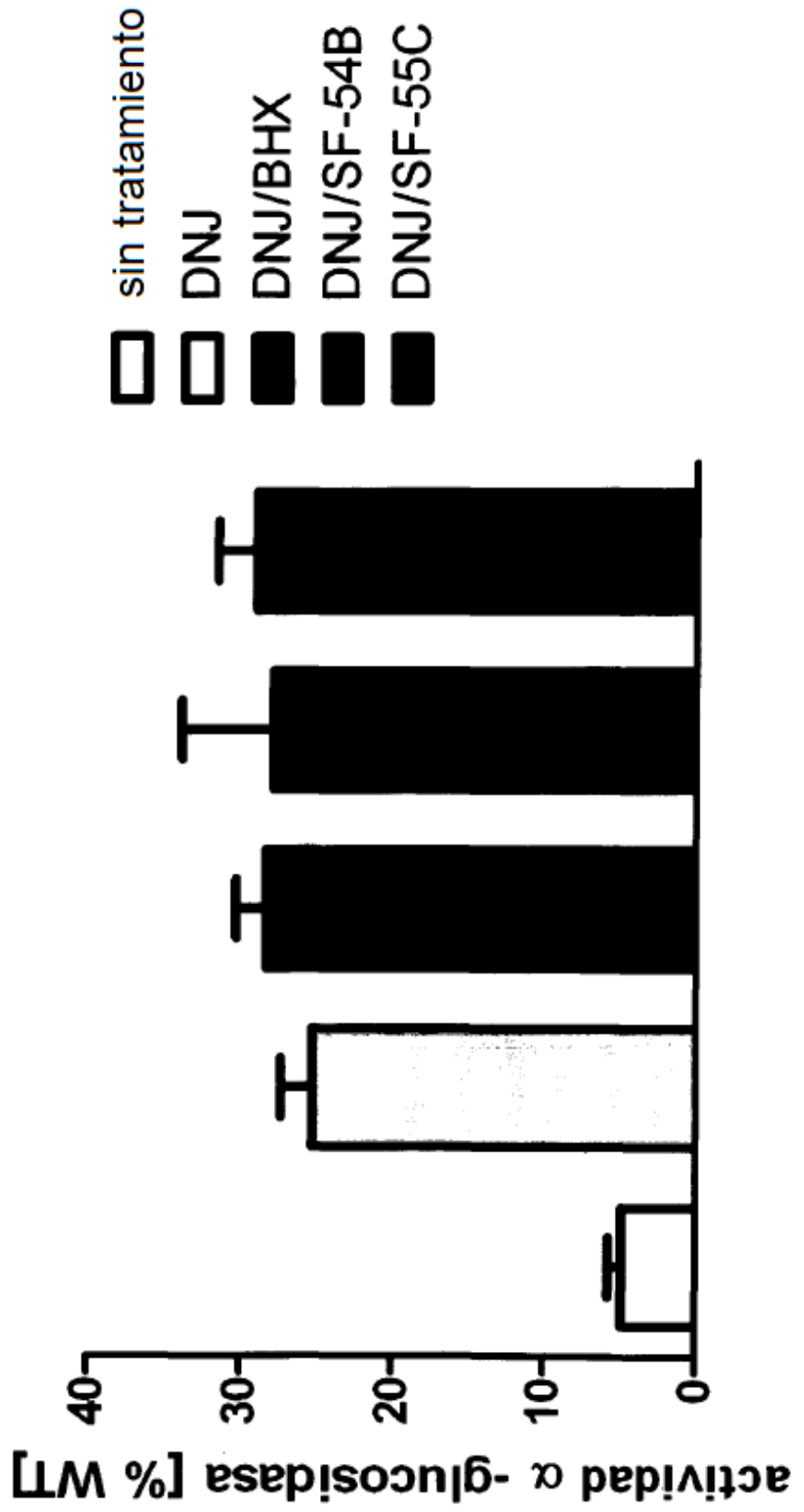


Figura 11B: Las mutaciones Y455F y L552P de Pompe responden a estructuras similares a Ambroxol

