

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102021000020729</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>02/08/2021</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>02/02/2023</b>

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	38	47

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	205

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	375

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	4415

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	51

Titolo

Preparazione combinata per il trattamento della malattia di Pompe
---

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Preparazione combinata per il trattamento della  
malattia di Pompe".

Di: Università degli Studi di Napoli Federico II;  
Fondazione Telethon; Consiglio Nazionale delle  
Ricerche.

Inventori designati: PARENTI, Giancarlo; MINOPOLI,  
Nadia; TARALLO, Antonietta; DAMIANO, Carla; MORACCI,  
Marco; IACONO, Roberta; COBUCCI PONZANO, Beatrice;  
FERRARA, Maria Carmina; PELUSO, Gianfranco.

Depositata il: 2 agosto 2021

\*\*\*

#### DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda il trattamento  
terapeutico delle malattie da accumulo lisosomiale, in  
particolare della malattia di Pompe.

La glicogenosi di tipo 2, o malattia di Pompe (PD,  
OMIM 232300) è una malattia metabolica congenita  
causata dal deficit funzionale dell'alfa-glucosidasi  
acida lisosomiale (GAA, acido maltasi, EC3.2.1.20),  
l'enzima che idrolizza i legami alfa-1,4 e alfa-1,6-  
glicosidici nel glicogeno, classificato nella famiglia  
GH31 degli enzimi attivi sui carboidrati (CAZy)

([www.cazy.org](http://www.cazy.org); {Lombard, 2014 #1589}). Il deficit funzionale di GAA determina un accumulo di glicogeno nei lisosomi e danni cellulari secondari, con meccanismi non completamente chiariti (Parenti G, et al. "A chaperone enhances blood  $\alpha$ - glucosidase activity in Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy"; *Mol Ther.* 2014 Nov;22(11 ):2004-12.doi: 10.1038/mt.2014.138). Nella malattia di Pompe, i muscoli sono particolarmente vulnerabili a causa dell'accumulo di glicogeno e le manifestazioni della malattia sono prevalentemente correlate al coinvolgimento dei muscoli cardiaci e scheletrici. Inoltre, sta emergendo un coinvolgimento del sistema nervoso centrale come parte dello spettro clinico nei pazienti in cui la malattia è emersa in età infantile.

Si ritiene che per ottenere effetti terapeutici positivi sia sufficiente un ripristino di almeno il 10% dell'attività enzimatica di GAA *wild type*, il che significa che un aumento relativamente basso dell'attività potrebbe limitare il decorso clinico. Le strategie terapeutiche includono la somministrazione dell'enzima *wild type*, attraverso la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), la terapia genica o

l'utilizzo di piccole molecole ad azione farmacologica chaperonica (*pharmacological chaperones* - PC) in grado di assistere la sintesi, il ripiegamento (*foldi*ng), il trasporto, l'aggregazione e la degradazione della GAA, consentendo all'enzima mutato di non essere riconosciuto dal meccanismo di degradazione associato al reticolo endoplasmatico (ERAD) (Kohler L, et al.; "Pompe Disease: From Basic Science to Therapy". *Neurotherapeutics* (2018) 15:928-942 <https://doi.org/10.1007/s13311-018-0655-y>; Mu TW, et al, "Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases". *Cell*. 2008 Sep 5;134(5):769-81. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.037).

Dall'inizio del 2006, è stata approvata la terapia enzimatica sostitutiva (ERT) con alfa-glucosidasi umana ricombinante ed è attualmente considerata la cura standard per il trattamento della PD.

Tuttavia, ci sono rilevanti limitazioni relative alla terapia enzimatica sostitutiva in quanto, nonostante il trattamento, alcuni pazienti hanno scarsi benefici clinici o mostrano segni di progressione della malattia. Diversi fattori concorrono a limitare il successo terapeutico

dell'ERT, come l'età all'inizio del trattamento, lo stato immunologico dei pazienti, l'insufficiente trasporto dell'enzima al muscolo scheletrico, la possibile instabilità a pH neutro dell'enzima ricombinante durante il transito ai lisosomi, la relativa carenza del recettore catione-indipendente del mannosio-6-fosfato, necessario per l'assorbimento dell'enzima nelle cellule muscolari, e il build up del vano autofagico osservato nei miociti (Porto C, et al.; "Pharmacological Enhancement of  $\alpha$ -Glucosidase by the Allosteric Chaperone N-acetylcysteine". Molecular Therapy vol. 20 n. 12, 2201-2211 dic. 2012.

Negli ultimi anni sono stati proposti e valutati altri approcci terapeutici contro le malattie da accumulo lisosomiale. Tra questi, la terapia con chaperoni farmacologici (PCT) rappresenta una strategia particolarmente promettente. Tale approccio, che è stato progettato per il trattamento delle malattie da ripiegamento errato (*misfolding*) delle protein (PMD), sfrutta piccole molecole come ligandi che possono riconoscere direttamente gli enzimi difettosi, modellando il ripiegamento delle proteine nelle conformazioni più stabili e prevenendo il loro

riconoscimento e smaltimento da parte del macchinario ERAD (Parenti G, et al. "A chaperone enhances blood  $\alpha$ -glucosidase activity in Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy"; Mol Ther. 2014 Nov;22(11):2004-12. doi: 10.1038/mt.2014.138).

La maggior parte degli chaperon farmacologici (PC) proposti o utilizzati per il trattamento delle malattie da accumulo lisosomiale (LSD) sono inibitori competitivi reversibili degli enzimi bersaglio. Rispetto all'ERT, gli chaperon sono piccole molecole pertanto hanno importanti vantaggi in termini di biodistribuzione, somministrazione per via orale e ridotto impatto sulla qualità della vita dei pazienti. Recenti studi hanno dimostrato che 1-deossinojirimicina (DNJ, 1), N-butildeossinojirimicina (NB-DNJ) e 1-deossalattonojirimicina (DGJ, 2) possono anche potenziare gli effetti degli enzimi utilizzati nelle ERT per la malattia di Pompe (Porto C, et al., "The pharmacological chaperone N-butyldeoxynojirimycin enhances enzyme replacement therapy in Pompe disease fibroblasts", Mol Ther. 2009 Jun;17(6):964-71) e per la malattia di Fabry, rispettivamente (Porto C, et al.,

"Synergy between the pharmacological chaperone 1-deoxygalactonojirimycin and the human recombinant alpha-galactosidase A in cultured fibroblasts from patients with Fabry disease"; J Inher Metab Dis. 2011 Dec 21).

Tuttavia, la maggior parte dei PC finora identificati per il trattamento delle LSD sono inibitori competitivi diretti al sito attivo e interferiscono con l'attività degli enzimi bersaglio (Parenti G, et al. "A chaperone enhances blood  $\alpha$ -glucosidase activity in Pompe disease patients treated with enzyme replacement therapy"; Mol Ther. 2014 Nov;22(11):2004-12. doi: 10.1038/mt.2014.138). L'inibizione enzimatica è quindi una delle principali limitazioni nell'uso clinico degli chaperon farmacologici.

Il paradosso che un inibitore possa aumentare l'attività enzimatica è spiegato dal fatto che i livelli terapeutici possono essere raggiunti a concentrazioni intracellulari sub-inibitorie e che le alte concentrazioni del substrato naturale accumulato nel lisosoma o le condizioni acide all'interno

dell'organello possono spiazzare l'inibitore dal sito attivo.

Nello stato dell'arte sono state proposte terapie alternative a base di PC.

WO2013/182652 descrive l'uso terapeutico della N-acetil cisteina (NAC) e dei composti correlati N-acetil serina (NAS) e N-acetil glicina (NAG) come chaperon allosterici non inibitori per l'alfa-glucosidasi lisosomiale acida (GAA). Come mostrato in WO2013/182652, questi chaperon non interagiscono con il dominio catalitico di GAA, e di conseguenza, non sono inibitori competitivi dell'enzima. Nonostante questo chiaro vantaggio, la traduzione clinica del NAC e dei composti correlati presenta diverse potenziali limitazioni. In primo luogo, solo un numero limitato di mutazioni del gene di GAA sembrava rispondere a questi composti nelle cellule di fibroblasti di pazienti con la malattia di Pompe, indicando che il farmaco è efficace solo in un numero limitato di pazienti. Inoltre, sono necessarie dosi notevolmente alte di NAC *in vivo* affinché l'effetto chaperonico sia efficace, rendendo questo composto inadatto a terapie

a lungo termine (Porto C. et al., Mol Ther. 2012 Dec;2(12):2201-11).

Alla luce delle considerazioni precedenti, la necessità di un nuovo approccio terapeutico per il trattamento della malattia di Pompe è sentita nell'arte.

È pertanto uno scopo della presente invenzione fornire un efficace approccio terapeutico per il trattamento della malattia di Pompe, mirato in particolare a ridurre la gravità di tale malattia.

Un altro scopo della presente invenzione è di fornire un approccio terapeutico che consenta di ottenere una risposta clinica di lunga durata, consentendo così un intervento terapeutico efficiente e sicuro nelle forme sia infantili che ad esordio tardivo della malattia di Pompe.

Questi e altri scopi sono stati raggiunti dai presenti inventori, che hanno condotto uno studio sulla scoperta di farmaci saggiando vari composti inclusi derivati di amminoacidi, zuccheri e vitamine, e hanno sorprendentemente scoperto che i composti della carnitina, L-carnitina, D-carnitina e acetil-D-carnitina, così come le vitamine idrosolubili vitamina

B1, vitamina B6 e vitamina C, esercitano tutte un effetto stabilizzante sull'enzima lisosomiale alfa-glucosidasi acida (GAA). In particolare, questi composti hanno agito positivamente nei saggi *cell-free* prevenendo la perdita dell'attività enzimatica a pH neutro e aumentando la stabilità termica di GAA in maniera dose dipendente. Inoltre, come mostrato nelle Figure 3 e 11, i composti della carnitina e della vitamina B, quando dosati in combinazione con chaperoni farmaceutici diretti al sito attivo, mostrano un chiaro effetto additivo sulla stabilità di GAA dimostrando che questi composti agiscono tutti come chaperon allosterici non legandosi al sito attivo dell'enzima.

Sulla base di questi risultati, gli inventori hanno condotto ulteriori studi sperimentali al fine di sfruttare gli chaperon allosterici identificati come una possibile strategia terapeutica per potenziare la terapia enzimatica sostitutiva per la malattia di Pompe. Sorprendentemente, quando l'enzima alfa-glucosidasi acida è stato somministrato a fibroblasti di pazienti con malattia di Pompe in combinazione con almeno uno dei composti sopraindicati, contemporaneamente, separatamente o in ordine

sequenziale, è stato osservato un considerevole aumento del traffico (*trafficking*) lisosomiale, della maturazione e dell'attività intracellulare dell'enzima somministrato (Figure 13-15). Oltre all'effetto sull'enzima GAA fornito dall'esterno, l'uso dei suddetti chaperon allosterici ha portato un significativo aumento dell'attività residua dell'enzima GAA endogeno presente nei fibroblasti dei pazienti Pompe.

Pertanto, un aspetto della presente invenzione è una preparazione combinata comprendente l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) e almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida, per l'uso simultaneo, separato o sequenziale nel trattamento terapeutico della malattia di Pompe in paziente, in cui l'almeno uno chaperon allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida è selezionato dal gruppo che consiste di L-carnitina, D-carnitina, acetil-D-carnitina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina C, e qualsiasi loro combinazione.

Altre caratteristiche e vantaggi della preparazione combinata secondo l'invenzione sono

illustrati nelle rivendicazioni allegate che formano parte integrante della descrizione.

La carnitina è un nutriente essenziale per il trasporto degli acidi grassi a catena lunga nella matrice mitocondriale. Questa molecola (acido beta-idrossi- gamma-trimetilaminobutirrico) è un composto di ammonio quaternario biosintetizzato dagli amminoacidi lisina e metionina ed esiste come uno dei due stereoisomeri: D-carnitina e L-carnitina. Entrambi sono biologicamente attivi ma solo la L-carnitina si trova naturalmente negli animali. Di conseguenza, il termine generico carnitina è solitamente utilizzato in riferimento alla L-carnitina.

La L-carnitina si è dimostrata terapeuticamente benefica per il trattamento di diverse malattie cardiovascolari, come l'ischemia miocardica acuta e cronica, l'angina pectoris, l'insufficienza cardiaca e le aritmie cardiache, nonché per il trattamento di pazienti con uremia cronica in emodialisi, o per il trattamento dell'astenia e dei crampi muscolari.

Sono disponibili anche derivati della L-carnitina, come l'acetil-L-carnitina e la propionil-L-carnitina. US 4,343,816 descrive l'uso dell'acil L-

carnitina per il trattamento terapeutico delle malattie delle arterie periferiche, come la malattia di Raynaud e l'acrocianosi.

US 4,346,107 descrive metodi terapeutici che comportano la somministrazione di acetil L-carnitina in pazienti con metabolismo cerebrale alterato, associato, ad esempio, a demenza senile o pre-senile e al morbo di Alzheimer.

US 4,194,006 descrive l'uso dell'acetil D,L-carnitina nel trattamento terapeutico dell'ischemia miocardica e dell'aritmia alla dose terapeutica di 50 mg/kg.

US 5,432,199 descrive che l'acetil-D-carnitina e i suoi sali farmacologicamente accettabili sono particolarmente efficaci nel trattamento terapeutico del glaucoma.

Gli studi descritti in Huang HP et al. (Hum Mol Genet. 2011 Dec 15;20(24):4851-64) mostrano che il trattamento con L-carnitina delle cellule staminali pluripotenti indotte alla malattia di Pompe migliora la disfunzione mitocondriale.

Vitamina B1 (VitB1) (tiamina, 3 - [(4-ammino-2-metolpirimidin-5-il) metil] -5- (2-idrossietil)- 4-

metil-1,3-tiazol-3-io) svolge un ruolo critico nel metabolismo dei carboidrati ed è un coenzima coinvolto nel metabolismo del piruvato e di altri alfa-chetoacidi per produrre energia attraverso il ciclo di Krebs. È ampiamente distribuito negli alimenti e assorbito principalmente nell'intestino tenue sia per diffusione passiva che per trasporto attivo. Tuttavia solo piccole quantità di questa vitamina sono immagazzinate nel fegato, quindi è necessaria un'assunzione giornaliera di cibi ricchi di tiamina.

Come farmaco, la vitamina B1 è usata per trattare stati di carenza da tiamina (Beriberi) e niacina, psicosi alcolica di Korsakoff, sindrome di Wernicke-Korsakoff, delirio e neurite periferica (Lewis e Hotchkiss).

La vitamina B6 (VitB6), nella sua forma biologicamente attiva piridossale 5'-fosfato, è coinvolta in varie reazioni del metabolismo degli aminoacidi e del glicogeno, nella sintesi di acidi nucleici, emoglobina, sfingomielina e altri sfingolipidi, e nella sintesi di neurotrasmettitori quali serotonina, dopamina, norepinefrina e acido gamma-aminobutirrico (GABA) (Wilson MP, et al.

"Disorders affecting vitamin B 6 metabolism". *Inherit Metab Dis.* 2019 Jul;42(4):629-646. doi: 10.1002/jimd.12060. Epub 2019 Mar 20.). VitB6 è utilizzato in medicina per il trattamento della carenza da vitamina B6, per il trattamento della nausea e del vomito in gravidanza e come integratore alimentare.

Vitamina C (VitC) (acido ascorbico, (2~{R})-2-[(1~{S})-1,2-diidrossietil]-3,4-diidrossi-2~{H}-furano-5-one) è un potente agente riducente e antiossidante che agisce contro le infezioni batteriche e agisce nelle reazioni disintossicanti e nella formazione del collagene. La vitamina C è utilizzata nel trattamento dello scorbuto, sindrome clinica che deriva dalla carenza di vitamina C. Il fabbisogno medio di vitamina C per gli adulti è tra 70 e 150 mg al giorno.

In questo contesto, il termine chaperone ("chaperon") è riferito a una molecola in grado di facilitare il ripiegamento (*fold*ing) proteico, che agisce assistendo il *fold*ing delle proteine sintetizzate de novo o delle proteine mal ripiegate (*misfolded*).

Come qui utilizzato, il termine "allosterico" si riferisce alla capacità di una molecola di modulare l'attività di una proteina, come ad es. un enzima, legandosi a un sito strutturalmente distinto dal sito in cui si svolge l'attività catalitica, detto sito attivo, che caratterizza l'enzima.

Come sopra mostrato, gli inventori hanno sorprendentemente scoperto che nella terapia enzimatica sostitutiva (ERT) la somministrazione di almeno uno chaperon allosterico selezionato dal gruppo costituito da L-carnitina, D-carnitina, acetil-D-carnitina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina C, e qualsiasi loro combinazione, migliora notevolmente l'efficacia dell'alfa-glucosidasi acida somministrata nella terapia enzimatica sostitutiva, senza alcun effetto inibitorio sull'attività di questo enzima e indipendentemente dalle mutazioni che colpiscono i singoli pazienti. Inoltre, la terapia combinata dell'invenzione prevede anche di migliorare la stabilità di una proteina GAA endogena mutante che è carente a causa di un *folding* difettoso. La stabilità e, quindi, l'attività della proteina endogena sono migliorate in concomitanza con l'aumentata stabilità

dell'enzima sostitutivo GAA somministrato che corrisponde alla proteina mutante.

Nell'ambito della presente descrizione, con l'espressione "stabilità proteica" si intende la resistenza a condizioni denaturanti (calore, pH) che ne consentono l'attività. La stabilità delle proteine viene solitamente misurata testando la denaturazione e/o l'inattivazione delle proteine da parte dei denaturanti.

La terapia in combinazione della presente invenzione si è rivelata particolarmente efficace nell'aumentare la stabilità dell'enzima alfa-glucosidasi acida sostitutiva (GAA) ad un valore di pH compreso tra 7,0 e 7,5, cioè un pH non più ottimale per la funzione dell'enzima lisosomiale.

Uno chaperon ideale dovrebbe, infatti, essere in grado di proteggere gli enzimi dalla degradazione senza interferire con la sua attività, essere in gran parte biodisponibili nei tessuti e negli organi, raggiungere livelli terapeutici nei compartimenti cellulari dove è richiesta la sua azione, mostrare un'elevata specificità per l'enzima bersaglio con effetti

trascurabili su altri enzimi e avere un buon profilo di sicurezza.

Un vantaggio notevole è che i suddetti composti che agiscono come chaperon allosterici nella preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione sono tutti già approvati come farmaci o nutraceutici per la terapia umana.

Di conseguenza, la preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione potrebbe essere prontamente inclusa nei protocolli clinici per il trattamento della malattia di Pompe senza la necessità di lunghi e costosi studi clinici, che sono ancora più impegnativi nel caso delle malattie rare a causa del ridotto numero di pazienti.

Come ulteriore vantaggio, la tossicità dei composti, da utilizzare secondo l'invenzione come chaperon allosterici, risulta essere bassa anche a dosi superiori a quelle utilizzate negli studi condotti dai presenti inventori. Infatti, per il trattamento del Beriberi, la vitamina B1 è solitamente somministrata per via intramuscolare alla dose di 10-20 mg tre volte al giorno o, generalmente, è utilizzata come integratore dietetico (per gli adulti, una compressa

da 50-100 mg al giorno) (Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998). Come noto, la vitamina B6 è utilizzata per il trattamento della carenza di vitamina B6 e per la profilassi della neuropatia periferica indotta da isoniazide. Inoltre, questo composto è utilizzato in combinazione con la doxilamina (come il prodotto disponibile in commercio Diclectin), per il trattamento della nausea e del vomito in gravidanza e come integratore alimentare (negli adulti, 100 mg/giorno) (Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. Washington (DC): National Academies Press (US); 1998). Nei pazienti con scorbuto, è somministrato per via

endovenosa da 300 mg a 1 g di vitamina C una volta al giorno. Inoltre, fino a 6 g di vitamina C può essere somministrato per via parenterale in soggetti adulti senza evidenza di tossicità (Abdullah M, Attia FN. SourceStatPearls 2018 Oct 27). La L-carnitina, con dosi di 3 grammi al giorno come integratore orale, è usata per trattare pazienti affetti da insufficienza cardiaca congestizia, malattia renale allo stadio terminale, ipertiroidismo, infertilità maschile, miocardite, sindrome dell'ovaio policistico ed effetti collaterali tossici causati dal farmaco acido valproico. Invece, l'infusione endovenosa di 60 mg/kg di L-carnitina è utilizzata per i pazienti affetti da angina pectoris (Pepine C.J., Welsch M.A. (1995) "Therapeutic potential of L-carnitine in patients with angina pectoris". In: De Jong J.W., Ferrari R. (eds) The Carnitine System. Developments in Cardiovascular Medicine, vol 162. Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0275-9\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0275-9_16)).

Nella preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione, l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) può essere una proteina ricombinante, in cui il termine "ricombinante", come qui usato, si riferisce a un

polipeptide prodotto utilizzando approcci di ingegneria genetica in qualsiasi fase del processo di produzione, ad esempio utilizzando un acido nucleico che codifica il polipeptide sotto il controllo di un forte promotore di sovraespressione in cellule o tessuti o ingegnerizzando la sequenza del polipeptide stesso. La persona esperta in questo campo è capace di utilizzare metodi per ingegnerizzare acidi nucleici e polipeptidi codificati (ad esempio, descritti in Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning*, CSH or in Brown T. A. (1986), *Gene Cloning - an introduction*, Chapman & Hall) e per la produzione e la purificazione di polipeptidi nativi o ricombinanti (ad esempio Handbooks "Strategies for Protein Purification", "Antibody Purification", pubblicato da GE Healthcare Life Sciences, e in Burgess, RR, Deutscher, MP (2009): *Guide to Protein Purification*).

In alternativa, l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) nella preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione può essere purificato da una varietà di tessuti, come ad es. fegato, muscolo e placenta, utilizzando uno qualsiasi dei diversi metodi

convenzionali tra cui cromatografia liquida a fase normale o inversa, cromatografia di affinità, cromatografia ad esclusione molecolare, cromatografia con metalli chelati immobilizzati ed elettroforesi su gel. La scelta del metodo di purificazione enzimatica più appropriato è alla portata degli esperti dell'ambito di ricerca.

In una forma di realizzazione preferita dell'invenzione, l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) è un'alfa-glucosidasi acida umana ricombinante (rhGAA).

La presente invenzione riguarda il trattamento terapeutico della malattia di Pompe. Nel contesto della presente descrizione, l'espressione "malattia di Pompe" intende comprendere tutte le varie manifestazioni cliniche di questa malattia, compresi i pazienti con forme infantili, giovanili e ad esordio tardivo.

Secondo l'invenzione, è contemplato che qualsiasi possibile combinazione degli chaperon allosterici nella preparazione combinata, come sopra definita, sia ricompresa nella presente invenzione.

Una preparazione combinata preferita per l'uso secondo l'invenzione comprende un enzima alfa-glucosidasi acida ricombinante (GAA) e lo chaperon allosterico di GAA L-carnitina.

Un'altra preparazione combinata preferita per l'uso secondo l'invenzione comprende un enzima alfa-glucosidasi acida ricombinante (GAA) e lo chaperon allosterico di GAA L-carnitina in combinazione con la D-carnitina o una miscela racemica di L- e D-carnitina.

Ancora in un'altra forma di realizzazione preferita, la preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione comprende un enzima alfa-glucosidasi acida ricombinante (GAA) e una tra vitamina B1, vitamina B6 e vitamina C, o qualsiasi loro combinazione.

La preparazione combinata dell'invenzione può essere somministrata da sola o in combinazione con uno o più chaperon molecolari diretti al sito attivo. Chaperon molecolari diretti al sito attivo esemplificativi includono, ma non sono limitati a, 1-deossinojirimicina (DNJ) e N-butil-deossinojirimicina (NB-DNJ).

La somministrazione dei costituenti delle preparazioni combinate nella presente invenzione può essere effettuata simultaneamente, separatamente o sequenzialmente in qualsiasi ordine. Vale a dire, la presente invenzione intende includere la somministrazione di un enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) e almeno uno chaperon allosterico dell'alfa-glucosidasi acida come sopra definita in modo sequenziale in un regime che fornirà effetti benefici del farmaco combinato, e intende anche includere la co-somministrazione di questi agenti in modo sostanzialmente simultaneo, come in un singolo dispositivo di dosaggio avente un rapporto fisso di questi composti o in dispositivi di dosaggio multipli e separati per ciascun composto, in cui i dispositivi di dosaggio separati possono essere presi insieme contemporaneamente, o presi entro un periodo di tempo sufficiente a ricevere un effetto benefico da entrambi i composti costituenti della combinazione.

La dose esatta della somministrazione combinata di un enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) e di almeno uno chaperon allosterico di GAA secondo l'invenzione, può variare a seconda dello stadio della malattia

nonché dei componenti specifici della preparazione combinata, cioè il composto chaperon allosterico e il tipo di enzima GAA, e sulle caratteristiche del paziente (es. sesso, età, peso, ecc.).

Per la terapia sostitutiva, l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) è generalmente somministrato per infusione ogni settimana o a settimane alterne, preferibilmente in una quantità compresa tra 20 mg e 40 mg/kg di peso corporeo. Secondo la somministrazione combinata dell'invenzione, almeno uno chaperon allosterico di GAA può essere somministrato lo stesso giorno dell'enzima GAA o, in alternativa, può essere somministrato per un periodo di tempo compreso tra 3 e 6 giorni consecutivi, ad esempio 3, 4, 5, 6 giorni, detto periodo di tempo include il giorno di somministrazione dell'enzima. Un regime terapeutico combinato preferito consiste in tre giorni consecutivi di somministrazione di chaperon allosterico, cioè dal giorno prima della somministrazione di ERT al giorno dopo la somministrazione dell'enzima.

Nella forma di realizzazione di cui sopra, almeno uno chaperone allosterico di GAA può essere somministrato una volta al giorno, o più volte al

giorno, per esempio tre volte al giorno, a seconda delle condizioni del paziente. Preferibilmente, la dose quotidiana di somministrazioni singole o multiple è compresa tra 100 e 250 mg/kg di peso corporeo.

In un'altra forma di realizzazione della somministrazione combinata secondo l'invenzione, il corso della terapia prevede preferibilmente una terapia giornaliera continua di almeno uno chaperon allosterico di GAA, preferibilmente per uno o più anni. Nei regimi di trattamento continuo, il dosaggio giornaliero di almeno uno chaperon allosterico di GAA secondo l'invenzione è preferibilmente compreso tra 100 mg e 200 mg per chilogrammo di peso corporeo.

Preferibilmente, nel suddetto regime, il dosaggio giornaliero di almeno uno chaperon allosterico di GAA secondo l'invenzione è compreso tra 20 mg e 40 mg/kg di peso corporeo/infusione.

In una forma di realizzazione preferita, il trattamento terapeutico dell'invenzione comprende la somministrazione a un paziente di una dose di alfa-glucosidasi acida umana ricombinante (rhGAA) compresa tra 20 mg e 40 mg/kg di peso corporeo/infusione a

settimane alterne e una dose di L-carnitina compresa tra 100 e 250 mg/kg di peso corporeo al giorno.

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo l'invenzione, il trattamento terapeutico dell'invenzione comprende la somministrazione a un paziente di una dose di alfa-glucosidasi acida umana ricombinante (rhGAA) compresa tra 20 e 40 mg/kg di peso corporeo/infusione e una dose di vitamina C compresa tra 1 e 2 g/die nello stesso giorno dell'infusione enzimatica o nei giorni successivi.

Nella terapia combinata secondo l'invenzione, l'enzima GAA e almeno uno chaperon allosterico di detto enzima possono essere somministrati a un paziente in qualsiasi modo accettabile dal punto di vista medico, compreso quello enterale (orale o gastro-enterale, rettale, sublinguale, buccale) o parenterale (endovenosa, intrarteriosa, transcutanea, intramuscolare, intradermica, sottocutanea, intraperitoneale).

Preferibilmente, nella preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione, l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) è formulato per somministrazione

parenterale, più preferibilmente per la somministrazione endovenosa per infusione o iniezione.

Come menzionato, l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) e almeno uno chaperon allosterico come sopra definito, possono anche essere efficacemente somministrati sotto forma di una composizione farmaceutica, cioè di una miscela fisica dei due composti.

Di conseguenza, un secondo aspetto della presente invenzione è una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento terapeutico della malattia di Pompe in un paziente, comprendente un'alfa-glucosidasi acida (GAA), almeno uno chaperone allosterico dell'alfa-glucosidasi acida e veicoli, eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili, in cui l' almeno uno chaperone allosterico dell'alfa-glucosidasi acida è scelto dal gruppo che consiste di L-carnitina, D-carnitina, acetil-D-carnitina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina C, e qualsiasi loro combinazione.

Secondo l'invenzione, qualsiasi combinazione degli chaperon allosterici dell'enzima GAA è contemplata nella composizione farmaceutica. Forme di realizzazione particolarmente preferite sono come

sopra definite con riferimento alla preparazione combinata per l'uso secondo l'invenzione.

Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono essere formulate utilizzando veicoli, eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili ben noti nell'arte, in dosaggi adatti per la somministrazione orale o parenterale, come endovenosa.

Il termine "farmaceuticamente accettabile" si riferisce a composti che possono essere somministrati a mammiferi senza eccessiva tossicità a concentrazioni coerenti con l'attività effettiva del componente attivo.

Le formulazioni della composizione farmaceutica, secondo l'invenzione, adatte alla somministrazione parenterale includono, ma non sono limitate a sospensioni, soluzioni, emulsioni in veicoli oleosi o acquosi, paste e formulazioni impiantabili a rilascio prolungato o biodegradabili.

Ai fini della somministrazione terapeutica orale, la composizione farmaceutica secondo l'invenzione può essere utilizzata nella forma di compresse, pastiglie,

capsule, ad esempio capsule di gelatina, sciroppi, impasto o sospensioni.

La selezione dei veicoli, eccipienti e/o diluenti idonei è effettuata in funzione della forma di somministrazione desiderata e tale selezione rientra nelle competenze ordinarie degli esperti del ramo.

La quantità dei composti contenuti nella composizione farmaceutica per l'uso secondo l'invenzione può variare ampiamente a seconda di molti fattori come ad esempio il metodo di somministrazione e il veicolo.

Una composizione farmaceutica preferita secondo l'invenzione comprende l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) a una concentrazione compresa tra 0,05% e 1% p/v sul peso totale della composizione e/o almeno uno chaperon allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida ad una concentrazione compresa tra 0,5% e 5% p/v sul peso totale della composizione.

In particolare, nella forma di realizzazione preferita secondo l'invenzione, la concentrazione dell'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) nella composizione è dello 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35%, 0,40%, 0,45%, 0,50%, 0,55%, 0,60%, 0,65%,

0,70%, 0,75%, 0,80%, 0,85%, 0,90%, 0,95% o 1,0% p/v sul peso totale della composizione.

In un'altra forma di realizzazione particolarmente preferita secondo l'invenzione, la concentrazione dell'almeno uno chaperon allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida nella composizione è di 0,50%, 0,55%, 0,60%, 0,65%, 0,70%, 0,75%, 0,80 %, 0,85%, 0,90%, 0,95%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% o 5,0% p/v sul peso totale della composizione.

Ad esempio, la composizione farmaceutica per l'uso secondo l'invenzione può contenere lo 0,05% p/v di un enzima alfa-glucosidasi (GAA) acida e 1,0% di L-carnitina p/v sul peso totale della composizione.

La scelta della dose dei principi attivi e del regime posologico rientrano anch'essi nelle competenze dell'esperto del ramo, e la loro scelta dipende da diversi fattori, quali ad esempio l'età del paziente e il grado di progressione della malattia.

La seguente sezione sperimentale è fornita a puro titolo illustrativo e non intende limitare l'ambito dell'invenzione come definito nelle rivendicazioni

allegate. Nella seguente sezione sperimentale si fa riferimento alle figure allegate, in cui:

la Figura 1 mostra il confronto dell'effetto della L-carnitina sulla stabilità della rhGAA. (a) Effetto di L-CAR sulla stabilità di rhGAA: L-CAR a varie concentrazioni è stata incubata con rhGAA e l'attività enzimatica è stata misurata dopo 5 ore di incubazione a pH 7,4; (b) Effetto di L-CAR sulla stabilità strutturale di rhGAA: L-CAR è stata incubata con rhGAA a dieci concentrazioni (da 2 a 20 mM). I cambiamenti nella fluorescenza di SYPRO Orange sono stati monitorati tramite DSF in funzione della temperatura a pH 7,4; (c) Riepilogo delle  $T_m$  misurate tramite DSF: le  $T_m$  sono state calcolate in accordo con Niesen FH, et al., Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21. Le deviazioni standard per ciascuna temperatura di fusione sono state calcolate da misure eseguite in triplicato; (d) Determinazione della KD della L-CAR con rhGAA mediante DSF. Le curve di denaturazione termica sono state eseguite in triplicato e le temperature di fusione sono state calcolate secondo Niesen FH, et al., Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21. Per la determinazione della costante di dissociazione (KD) di L-CAR i dati

sperimentali sono stati adattati all'equazione del modello cooperativo riportato da Vivoli M., et al, J Vis Exp 51809 (2014);

la Figura 2 mostra l'effetto della miscela racemica di D/L-CAR sulla stabilità strutturale di rhGAA. (a) Analisi DSF: L-CAR e D-CAR sono stati incubati con rhGAA da soli (10 e 20 mM) o in combinazione (a 5 mM o 10 mM ciascuno). I cambiamenti nella fluorescenza di SYPRO Orange sono stati monitorati mediante DSF in funzione della temperatura a pH 7,4; (b) Riepilogo delle T<sub>m</sub> misurate tramite DSF;

la Figura 3 mostra il confronto dell'effetto di chaperon allosterici e non allosterici sulla stabilità di rhGAA. (a) Analisi dell'effetto sinergico di L-CAR e NAC. L-CAR è stato incubato con rhGAA da solo (10 o 20 mM) o in combinazione con NAC, a 10 mM ciascuno; (b) Analisi dell'effetto sinergico di L-CAR e DNJ. L-CAR è stato incubato con rhGAA da solo (10 o 20 mM) o in combinazione con DNJ (10 e 0.1 mM, rispettivamente). Per entrambi gli esperimenti, i cambiamenti nella fluorescenza di SYPRO Orange sono stati monitorati tramite DSF in funzione della temperatura a pH 7,4;

la Figura 4 illustra l'effetto di L-CAR e D-CAR su rhGAA. (a) Andamento temporale dell'effetto stabilizzante di L- e D-CAR sull'attività di rhGAA. La stabilità dell'attività di rhGAA è stata misurata in assenza e in presenza di L-CAR (10 o 20 mM) e D-CAR per 48 h; (b) Effetto di L-CAR sull'attività di rhGAA. L'attività specifica di rhGAA è stata misurata in assenza e in presenza di L-CAR a varie concentrazioni;

la Figura 5 mostra un confronto dell'effetto di D-CAR e A-D-CAR sulla stabilità di rhGAA (a) Effetto sulla stabilità di rhGAA. L'attività specifica di rhGAA è stata misurata in assenza e in presenza di D- e A-D-CAR a varie concentrazioni (0,1-10 mM); (b) Effetto sull'attività di rhGAA: D- e A-D-CAR a varie concentrazioni (0,1-10 mM) sono stati incubati con rhGAA e l'attività enzimatica è stata misurata dopo 5 ore di incubazione a pH 7,4; (c) Effetto di D-CAR sulla stabilità dell'attività di rhGAA. L'enzima è stato incubato da solo o con D-CAR (2-10 mM) in tampone sodio fosfato pH 7,4 a 37°C. Dopo 5 ore, l'attività residua dell'alfa-glucosidasi è stata misurata in condizioni standard; (d) Effetto di D-CAR sulla stabilità strutturale di rhGAA: D-CAR è stata incubata con rhGAA

a 5 concentrazioni (da 2 a 10 mM). I cambiamenti nella fluorescenza di SYPRO Orange sono stati monitorati mediante DSF in funzione della temperatura a pH 7,4; (e) Riepilogo delle T<sub>m</sub> misurate tramite DSF: i valori di T<sub>m</sub> sono stati calcolati secondo Niesen FH, et al., Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21. Le deviazioni standard per ciascuna temperatura di fusione sono state calcolate da misure eseguite in triplicato;

la Figura 6 mostra l'effetto di L-CAR sulla stabilità di rhGAA nel mezzo di coltura. I fibroblasti PD sono stati incubati nel mezzo Eagle modificato di Dulbecco (DMEM) in presenza (in nero) o in assenza di L-CAR 10 mM. L'attività di GAA è diminuita nel tempo, con differenze significative tra rhGAA in combinazione con L-CAR e rhGAA da solo già rilevabili dopo 2 ore;

la Figura 7 illustra gli effetti di vitamina B1 (VitB1), vitamina B6 (VitB6), vitamina C (VitC), carbocisteina, saccarosio e trealosio sulla stabilità strutturale della rhGAA. I composti (10 mM) sono stati incubati in tampone sodio fosfato 25 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM. Le scansioni termiche sono state eseguite a 1°C/min nell'intervallo 25-95°C con rhGAA. I cambiamenti nella fluorescenza di SYPRO Orange sono

stati monitorati mediante Fluorimetria a Scansione Differenziale (DSF) in funzione della temperatura a pH 7,4; (a) La fluorescenza del SYPRO Orange è stata normalizzata al valore massimo di fluorescenza per ciascuna scansione in modo da calcolare la fluorescenza relativa; (b) Le temperature di fusione ( $T_m$ ) sono state calcolate secondo Niesen FH, et al., Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21;

la Figura 8 mostra un confronto dell'effetto di VitB1, VitB6 e VitC sull'attività di rhGAA. Effetto sull'attività enzimatica, misurata in condizioni standard, normalizzata per la quantità di rhGAA utilizzata (attività specifica - U/mg) in assenza e presenza di concentrazioni crescenti di chaperon. VitB1, VitB6 e VitC a quattro concentrazioni (1, 5, 10 e 20 mM);

la Figura 9 mostra l'effetto di VitB1 (10 mM e 20 mM), VitB6 (5 mM e 10 mM) e VitC (10 mM e 20 mM) sulla stabilità dell'attività specifica di rhGAA. RhGAA è stata incubata in presenza e in assenza di vitamine e a intervalli di tempo regolari (da 0 a 360 minuti) è stata analizzata l'attività. L'attività è espressa

come percentuale di attività residua considerando come 100% l'attività specifica di rhGAA non incubata;

la Figura 10 mostra la misura della costante di dissociazione (KD) di VitB1, VitB6 e VitC. Le costanti di dissociazione (KD) delle diverse molecole sono state misurate mediante scansioni di stabilità termica di rhGAA secondo Vivoli M., et al, J Vis Exp 51809, 2014. Le scansioni DSF sono state eseguite come descritto sopra, nell'intervallo 0-30 mM per ogni chaperon. I valori delle temperature di fusione (Tm) sono stati messi in funzione della concentrazione di ligando. I valori di KD sono stati calcolati applicando l'equazione del modello di legame cooperativo come riportato in Vivoli M., et al, 2014, utilizzando il software GraphPAD Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA);

la Figura 11 mostra l'effetto della (A) vitamina B1 e (B) vitamina C in combinazione con chaperon non allosterici sulla stabilità strutturale di rhGAA. La stabilità strutturale di rhGAA è stata valutata in presenza di VitB1 (A) e VitC (B) da sole (10 mM) e con DNJ (0,1 mM). I cambiamenti di fluorescenza del SYPRO-Orange sono stati seguiti mediante DSF nel range di

temperatura di 25-95 °C a pH 7.4; rhGAA è stata incubata in presenza e in assenza di vitamine e l'attività è stata analizzata a intervalli di tempo regolari (da 0 a 360 minuti). L'attività è espressa come percentuale di attività residua considerando come 100% l'attività specifica di rhGAA non incubata;

la Figura 12 illustra l'effetto di L-CAR nei fibroblasti PD. (a) Effetto di L-CAR sull'attività residua di GAA mutata nei fibroblasti. I fibroblasti derivati da tre pazienti con PD sono stati incubati in assenza e in presenza di L-CAR (2 e 10 mM) prima di essere raccolti e utilizzati per testare l'attività di GAA;

la Figura 13 illustra la sinergia tra L-CAR e rhGAA nei fibroblasti PD. (a) Messa a punto delle condizioni per analizzare la sinergia tra L-CAR e rhGAA. Sono stati valutati diversi protocolli di trattamento: (i) pre-incubazione delle cellule con L-CAR per 24 ore, seguita da co-incubazione di L-CAR e rhGAA per ulteriori 24 ore; (ii) co-incubazione di L-CAR e rhGAA per 24 ore. (b) Messa a punto delle concentrazioni ottimali di L-CAR per l'analisi della sinergia tra L-CAR e rhGAA. I fibroblasti sono stati

incubati con rhGAA e diverse concentrazioni di L-CAR (da 1 a 20 mM). Sono stati osservati miglioramenti dell'attività GAA a concentrazioni di L-CAR 5, 10 e 20 mM con i miglioramenti più alti e statisticamente più significativi a 10 e 20 mM. (c) Effetto di L-CAR sul processamento di rhGAA nei fibroblasti PD. Le cellule sono state incubate per 24 ore con rhGAA da sola o con rhGAA in combinazione con L-CAR 10 mM. Nelle cellule trattate con la combinazione di rhGAA e L-CAR la quantità di GAA matura (peptidi attivi da 70-76 kDa) è stata notevolmente migliorata, come indicato da un'analisi quantitativa mediante western blot. La gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) è utilizzata come standard interno; (d) Attività di GAA misurata nei fibroblasti PD. L'aumento dell'attività di GAA conferma l'effetto potenziante di L-CAR;

la Figura 14 mostra le cinetiche di attività e di maturazione di GAA in diversi momenti nei fibroblasti PD trattati con rhGAA o rhGAA in combinazione con 10 mM L-CAR. (a) L'attività GAA è aumentata progressivamente nel tempo e un effetto potenziante della co-incubazione con L-CAR era già rilevabile a 2 ore ed è diventato progressivamente più alto fino a 24

ore (Figura 14, a sinistra). Anche le quantità e la maturazione di rhGAA, analizzate mediante western blot, sono migliorate nel tempo (b);

la Figura 15 mostra gli effetti del co-dosaggio di rhGAA e L-CAR sul traffico lisosomiale dell'enzima ricombinante. Le cellule sono state incubate nelle condizioni selezionate negli esperimenti precedenti e la co-localizzazione di rhGAA con Lamp2 è stata analizzata mediante microscopia confocale a immunofluorescenza. In tutte e tre le linee cellulari la co-localizzazione è stata migliorata (A). Questo risultato è stato confermato da un'analisi quantitativa del segnale GAA totale (B) e del segnale GAA co-localizzato con Lamp2 (C). Immagini sovraesposte: luminosità +40%; contrasto -20%.

**Dichiarazione ai sensi dell'art. 170 bis del Codice della Proprietà Industriale**

La presente invenzione è stata realizzata in conformità alle disposizioni stabilite dall'articolo 170-bis, commi 2, 3 e 4, del Codice della proprietà industriale (D.Lgs. 10 febbraio 2005, n. 30, come modificato dal D.Lgs. n. 131 del 13 agosto 2010).

**MATERIALI E METODI**

### Colture di fibroblasti.

I fibroblasti dei pazienti con malattia di Pompe (PD) sono stati ottenuti da biopsie cutanee dopo aver ottenuto il consenso informato dai pazienti. Nel laboratorio del Dipartimento di Pediatria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II erano disponibili fibroblasti normali di controllo di pari età. Tutte le linee cellulari sono state coltivate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> nel mezzo di Eagle modificato di Dulbecco (Invitrogen, Grand Island, NY) e il 20% di siero fetale bovino (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), integrato con 2 mM/L di glutammina, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina.

### Reagenti

rhGAA (alfa-glucosidasi, Myozyme), proveniva da Genzyme Co, Cambridge, MA, USA. Come fonte di enzima, gli autori hanno utilizzato le quantità residue di enzima ricombinante ricostituito preparato per il trattamento dei pazienti con malattia di Pompe presso il Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II". D-CAR, A-D-CAR erano di Sigma-tau; L-CAR, DNJ, 4-nitrofenil- $\alpha$ -glucopiranoside (4NP-Glc) (N1377),

vitamina C (VitC) (A0278) e carbocisteina (C0470000) sono state fornite da Sigma-Aldrich. La vitamina B1 (VitB1) (FT28200) e la vitamina B6 (VitB6) (FP27320) sono state fornite da Carbosynth.

### **Stabilità termica di rhGAA**

Le scansioni di stabilità termica di rhGAA sono state eseguite come descritto in Porto C, et al., Mol Ther. 2012 dic;20(12):2201-11. Brevemente, 0,9  $\mu$ M di enzima è stato incubato in assenza e in presenza di L-CAR, D-CAR AD-CAR, NAC, VitB1, VitB6, VitC, carbocisteina, saccarosio, trealosio e DNJ, alle concentrazioni indicate, con colorante SYPRO Orange, tampone sodio fosfato 25 mM, pH 7,4 e NaCl 150 mM. Le scansioni di stabilità termica sono state eseguite a 1°C/min nell'intervallo 25-95°C in Real Time LightCycler (Bio-Rad). La fluorescenza di SYPRO-Orange è stata normalizzata al valore massimo di fluorescenza di ciascuna scansione per ottenere la fluorescenza relativa. Le temperature di fusione sono state calcolate secondo Niesen FH, et al., Nat Protoc. 2007;2(9):2212-21. La costante di dissociazione di L-CAR è stata misurata mediante scansioni di stabilità termica di rhGAA come descritto in Roig-Zamboni V, et

al., Nat Comm. 24 ottobre 2017; 8 (1): 1111. Le scansioni DSF sono state eseguite come descritto sopra, nell'intervallo 0-40 mM L-CAR. I valori delle temperature di fusione sono stati riportati in funzione della concentrazione del ligando. Ai dati sperimentali è stata applicata l'equazione del legame cooperativo come riportato in Vivoli M., et al, J Vis Exp 51809 (2014), utilizzando il software GraphPAD Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

#### **Caratterizzazione enzimatica**

Il saggio di attività standard di rhGAA è stato eseguito in 200  $\mu$ L utilizzando 0,2  $\mu$ M di enzima a 37°C in acetato di sodio 100 mM pH 4,0 e 4NP-Glc 20 mM. La reazione è stata avviata aggiungendo l'enzima. Dopo un opportuno tempo d'incubazione (1-2 min) la reazione è stata bloccata aggiungendo 800  $\mu$ L di carbonato di sodio 1 M pH 10,2. L'assorbanza è stata misurata a 420 nm a temperatura ambiente, il coefficiente di estinzione molare per calcolare le unità enzimatiche era 17,2  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Un'unità enzimatica è definita come la quantità di enzima che catalizza la conversione di 1  $\mu$ mol di substrato in prodotto in 1 min, nelle condizioni indicate. L'effetto del pH sulla stabilità di rhGAA è

stato misurato preparando miscele di reazione contenenti 6.8  $\mu\text{M}$  di enzima in presenza di sodio fosfato 50 mM, pH 7,4. Dopo aver incubato a 37°C, le aliquote sono state prelevate ai tempi indicati e l'attività alfa-glucosidasica residua è stata misurata in condizioni standard. Per testare l'effetto sulla stabilità al pH di rhGAA degli chaperon chimici e delle altre molecole, sono stati condotti esperimenti come sopra descritto aggiungendo alle miscele di reazione le quantità dei diversi composti indicati nel testo.

#### **Incubazione di fibroblasti con dosaggio rhGAA e GAA**

Per studiare la captazione (*uptake*) di rhGAA e il miglioramento dell'attività di GAA nei fibroblasti PD, le cellule sono state incubate con 50  $\mu\text{M}$  rhGAA per 24 ore, in assenza o in presenza di 10 mM L-CAR. Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo. Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte e dopo trattamento con tripsina distrutte da 5 cicli di congelamento e scongelamento. L'attività di GAA è stata valutata utilizzando il substrato fluorogenico 4-metilumbelliferil- $\alpha$ -D-glucopiranoside (4MU) (Sigma-Aldrich) secondo la procedura pubblicata (Porto C, et al., Mol Ther. 2009 Jun;17(6):964-71). In breve, 25  $\mu\text{g}$

di omogenati cellulari sono stati incubati con il substrato fluorogenico (2 mM) in tampone acetato 0,2 M, pH 4,0, per 60 minuti in miscele di incubazione da 100 µl. La reazione è stata bloccata aggiungendo 1 mL di tampone glicina-carbonato, 0,5 M, pH 10,7. La fluorescenza è stata letta a 365 nm (eccitazione) e 450 nm (emissione) con un fluorimetro del sistema Promega GloMax Multidetector. La concentrazione proteica negli omogenati cellulari è stata misurata mediante il saggio di Lowry.

#### **Analisi di immunofluorescenza e microscopia confocale**

Per gli studi di immunofluorescenza, le cellule (fibroblasti umani) cresciute su vetrino sono state fissate utilizzando metanolo (5 minuti a -20°C per studiare la colocalizzazione GAA-LAMP2), permeabilizzate utilizzando 1% PBS (tamponato con fosfato salino) - Triton 0,1% e bloccato con saponina 0,05%, BSA 1% diluito in PBS 1% a temperatura ambiente per 1 h. Le cellule sono state incubate con gli anticorpi primari anti-GAA, anticorpo policlonale di coniglio (PRIMM), e anti-LAMP2, anticorpo monoclonale di topo (Santa Cruz Biotechnology), per una notte a 4°C diluiti in una soluzione bloccante, lavate con PBS

all'1% e quindi incubate con un anticorpo secondario appropriato (anticorpi anti-coniglio o anti-topo coniugati ad Alexa Fluor 488 o 596) e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindolo, Invitrogen) in saponina 0,05%, 3% BSA, 1% PBS. I campioni sono stati quindi lavati, montati con Mowiol (Sigma) ed esaminati con un microscopio confocale Zeiss LSM700. La colocalizzazione e l'analisi quantitativa sono state eseguite con il software Fiji (ImageJ).

## **RISULTATI**

### **Esempio 1: I composti della carnitina e la vitamina B1, B6 e C migliorano la stabilità di rhGAA in vitro**

Nel corso dello studio, i presenti inventori hanno analizzato gli effetti di numerosi composti sulla stabilità al pH dell'enzima alfa-glucosidasi (GAA) come già eseguito in precedenti studi sugli enzimi lisosomiali (Lieberman RL, et al., Nat Chem Biol. 2007 Feb;3(2):101-7; Shen JS, et al., Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 16;369(4):1071-5; Porto C, et al., Mol Ther. 2012 Dic;20(12):2201-11). Tra i composti testati, sono stati saggiati L-carnitina, D-carnitina, acetil-D-carnitina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina C, trealosio, saccarosio e carbocisteina. In

particolare, gli inventori hanno analizzato la stabilità di rhGAA incubando l'enzima a diversi pH e saggiando l'attività residua su 20 mM 4-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranoside (4NP-Glc) in tampone sodio acetato 100 mM, pH 4,0 in cui rhGAA è stabile fino a 24 ore. Invece, a pH acido (pH 3,0) o neutro (pH 7,0), rispettivamente più basso e più alto, rispetto al compartimento lisosomiale, l'enzima ha dimezzato la sua attività in circa 5 ore (Porto C, et al., Mol Ther 2012 dic;20(12):2201-11). L-CAR, già alla concentrazione di 10 mM, ha preservato l'attività di rhGAA su 4NP-Glc dopo 5 ore di incubazione a pH 7,4 (Figura 1a). L'effetto stabilizzante sull'attività di rhGAA è stato mantenuto anche dopo 48 ore di incubazione in presenza di L-CAR 20 mM (Figura 4a). Non è stato osservato alcun effetto sull'attività specifica di rhGAA in presenza di L-CAR a qualsiasi concentrazione dosata, indicando che non ha interagito con il sito attivo dell'enzima (Figura 4). Sorprendentemente, L-CAR ha aumentato anche la stabilità strutturale di rhGAA in maniera dose-dipendente analizzata mediante Fluorimetria a Scansione Differenziale (DSF) (Figura 1b). Le

variazioni della temperatura di fusione ( $\Delta T_m$ ) sono aumentate di  $2,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$  ad ogni incremento di 2 mM della concentrazione di L-CAR (Figura 1c). La costante di dissociazione di L-CAR per rhGAA è stata misurata mediante DSF secondo Vivoli M., et al., " Determination of Protein-ligand Interactions Using Differential Scanning Fluorimetry ". J Vis Exp 51809 (2014) (Figura 1d). L-CAR ha mostrato una  $K_D$  simile a quella dello chaperon allosterico NAC ( $9,16 \pm 1,02$  mM e  $11,57 \pm 0,74$  mM, rispettivamente) (Roig-Zamboni V, et al., Nat Comm. 2017 Oct 24;8(1):1111). Per quanto riguarda le molecole che non si legano al sito attivo di rhGAA, questi valori sono superiori alla tipica  $K_i$  di  $3,4$   $\mu\text{M}$  mostrato da chaperon molecolari diretti al sito attivo come l'inibitore DNJ (Porto C, et al., Mol Ther. 2012 dic; 20(12):2201-11). L'effetto chaperonico su rhGAA di vitamina B1 (VitB1), vitamina B6 (VitB6), vitamina C (VitC), carbocisteina, saccarosio e molecole di trealosio è stato testato mediante analisi di stabilità termica (Figura 7) a pH 7,4. VitB1, VitB6, VitC a una concentrazione di 10 mM hanno aumentato la stabilità termica di rhGAA analizzato mediante DSF (Figura 7). Le temperature di fusione ( $T_m$ ) di rhGAA misurate erano

54,5±0,1°C, 53,9±0,9°C, 54,0±0,4°C, rispettivamente, per VitB1, VitB6 e VitC vs 49,8±0,2°C in assenza di chaperon. Al contrario, la carbocisteina ha destabilizzato l'enzima riducendo la temperatura di fusione a 29,8±0,3 °C. Saccarosio e trealosio non hanno mostrato alcun effetto su rhGAA (T<sub>m</sub> di 50,3±0,5 °C e 50,5±0,2 °C, rispettivamente). I presenti inventori non hanno osservato alcun effetto significativo sull'attività specifica di rhGAA quando saggiata in presenza di VitB1, VitB6 e VitC a pH 4,0 e temperatura di 37°C, ad eccezione di un aumento dell'attività in presenza di 20 mM VitB6, suggerendo che questi composti non interagiscono con il sito attivo dell'enzima (Figura 8). Invece, come già noto nell'arte, DNJ ha inibito l'attività dell'enzima, già alla concentrazione di 1 µM portando ad un'inibizione quasi totale a 0,1 mM. Come riportato in Porto C, et al., Mol Ther. 2012 Dec;20(12):2201-11, rhGAA è stabile fino a 24 ore a pH 5,0, mentre a pH neutro (cioè pH 7,0, presente nei compartimenti cellulari non lisosomiali), l'enzima è instabile e perde rapidamente la sua attività, avendo circa il 50% di attività residua dopo 4 ore, ed è quasi completamente inattivo (meno del 10%

di attività residua) dopo 16 ore. Al contrario, quando incubato in presenza di 10 e 20 mM VitB1/VitB6/VitC a pH 7,4, rhGAA ha mantenuto oltre il 50% della sua attività rispettivamente per 1 ora e 2 ore (Figura 9). Le costanti di dissociazione di VitB1, VitB6 e VitC sono state misurate mediante DSF (Figura 10) utilizzando concentrazioni di composti comprese tra 0 e 30 mM per ciascun chaperon. VitB1 e VitC hanno mostrato una KD di  $11,14 \pm 0,90$  mM e  $10,28 \pm 0,98$  mM, rispettivamente. Diversamente, VitB6 ha mostrato una KD inferiore rispetto agli altri chaperon, pari a  $5,59 \pm 0,43$  mM.

**Esempio 2: Effetto sulla stabilità di rhGAA mediante l'azione combinata di PC allosterici e diretti al sito attivo**

I presenti inventori hanno osservato effetti stabilizzanti simili con i relativi composti D-CAR e A-D-CAR (7 e 8, rispettivamente). Entrambi i composti hanno preservato l'attività di rhGAA su 4NP-Glc dopo 5 ore di incubazione a pH 7,4 (Figura 5a). Anche in questo caso, non è stato osservato alcun effetto sull'attività specifica di rhGAA a concentrazioni di 0,1-10 mM (Figura 5b), indicando che anche D-CAR e A-

D-CAR non hanno interagito con il sito attivo dell'enzima. Rispetto all'isomero L-, D-CAR ha mostrato un completo recupero dell'attività di rhGAA già a una concentrazione di 10 mM vs 20 mM di L-CAR (Figura 5c), mantenendo l'effetto stabilizzante anche dopo 24 ore di incubazione (Figura 4a). L'analisi DSF ha mostrato che D-CAR ha aumentato la stabilità strutturale di rhGAA in maniera dose dipendente (Figura 5d) e che la  $\Delta T_m$  è aumentata ad ogni incremento di 2 mM della concentrazione di D-CAR (Figura 5e).

I preparati nutraceutici di carnitina sono spesso miscele racemiche degli enantiomeri L e D; quindi, è stato analizzato l'effetto stabilizzante su rhGAA di quantità equimolari di D- e L-CAR. Come mostrato in Figura 2, quando rhGAA è stata incubata con una concentrazione totale di 10 mM dei due enantiomeri (risultante da L-CAR 5 mM + D-CAR 5 mM), è stata misurata una  $\Delta T_m$  di  $9,4 \pm 0,8^\circ\text{C}$  corrispondente alla somma delle  $\Delta T_m$ s misurate quando l'enzima è stato incubato con L- o D-CAR a una concentrazione di 5 mM ( $\Delta T_m$ s di  $4,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$  e  $4,9 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , rispettivamente). Un effetto additivo simile è stato osservato quando la

concentrazione di ciascun enantiomero è stata aumentata a 10 mM D- e L-CAR (Figura 2b).

L'effetto combinato su rhGAA da parte di L-CAR e altri chaperon diretti al sito attivo o allosterici, è mostrato nella Figura 3. A una concentrazione di 10 mM, L-CAR ha aumentato la  $T_m$  di rhGAA di  $9,0 \pm 0,3$  ( $T_m$   $58,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$  vs  $49,6 \pm 0,1^\circ\text{C}$  della sola rhGAA) un valore simile a quello ottenuto con NAC alla stessa concentrazione ( $9,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ), ma leggermente inferiore a quello dello chaperon farmacologico diretto al sito attivo DNJ (1) alla concentrazione di 0,1 mM ( $12,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ) (Figura 3a e 3b). Per capire il meccanismo di stabilizzazione verso rhGAA gli inventori hanno combinato queste molecole negli esperimenti DSF. L-CAR è stato miscelato a una concentrazione di 10 mM in rapporti equimolari con NAC (Figura 3a) o con DNJ 0,1 mM (Figura 3b). L'effetto stabilizzante di L-CAR in presenza di quantità equimolari di 10 mM di NAC (20 mM in totale) era identico all'effetto osservato quando ciascuno dei PC allosterici è stato utilizzato singolarmente a una concentrazione di 20 mM (Figura 3a). L'effetto di L-CAR e NAC era non additivo con  $\Delta T_m$  di  $14,3 \pm 0,2^\circ\text{C}$ ,  $14,3 \pm 0,13^\circ\text{C}$  e  $14,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$  con L-CAR, NAC

e L-CAR+NAC, rispettivamente (Figura 3a). I  $\Delta T_m$ s ottenuti con L-CAR 10 mM combinato con 0,1 mM dello chaperon non allosterico DNJ, erano esattamente additivi con  $\Delta T_m$  di  $9,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ,  $12,1 \pm 0,3^\circ\text{C}$  e  $23,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$  con L-CAR, DNJ e L-CAR+DNJ, rispettivamente, confermando che questi PC interagiscono con diversi siti di rhGAA (Figura 3b). I presenti inventori hanno ulteriormente studiato se l'effetto stabilizzante di VitB1 e VitC aumenta in presenza di noti chaperon non allosterici, mescolando questi composti alla concentrazione di 10 mM con 0,1 mM DNJ (Figure 11A e 11B). VitB1/VitC in combinazione con 0,1 mM DNJ hanno mostrato un effetto additivo sul  $\Delta T_m$ s così ottenuti (Figure 11A e 11B), e questi dati indicano che anche VitB1/VitC legano rhGAA in siti diversi da DNJ.

### **Esempio 3: Effetto di L-CAR nei fibroblasti PD**

Sulla base dei risultati sopra descritti, i presenti inventori hanno condotto uno studio per valutare l'effetto di L-CAR sull'attività di GAA mutante da colture di fibroblasti ottenute da tre pazienti con PD portatori di mutazioni differenti e con fenotipi ad esordio precoce (Tabella 1).

ID Paziente	Mutazione allele 1	Mutazione allele 2	Fenotipo
PD 1	p.L552P	p.P79Rfs*12	Insorgenza infantile classica
PD 2	p.R375L	p.V755Sfs*41	Insorgenza infantile classica
PD 3	p.L552P	p.L552P	Insorgenza infantile atipica

I fibroblasti sono stati incubati in presenza di L-CAR da 0,1 a 10 mM per 24 ore e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti in cellule non trattate. È stato osservato un sorprendente effetto chaperonico potenziante sull'attività residua endogena nelle cellule dei pazienti omozigoti per la mutazione p.L552P (Figura 12). Sono stati osservati incrementi significativi dell'attività in un intervallo di concentrazioni di L-CAR tra 1 e 10 mM, con un aumento di 2,8 volte a 2 mM.

Sulla base di questi risultati sorprendenti, i presenti inventori hanno testato se il PC allosterico L-CAR è in grado di migliorare anche l'efficacia degli enzimi ricombinanti utilizzati per l'ERT nella malattia di Pompe. Gli esperimenti sono stati condotti sulle linee cellulari dei pazienti come sopra indicato. Come primo passo, gli inventori hanno studiato le condizioni ottimali per valutare questo effetto. In particolare, è stato condotto uno studio confrontando un protocollo basato sulla pre-incubazione delle cellule con L-CAR per 24 ore, seguito da co-incubazione di L-CAR e rhGAA per ulteriori 24 ore, con un protocollo basato sulla co-incubazione di L-CAR e rhGAA per 24 ore (Figura 13a). I risultati di entrambi i protocolli sono stati confrontati con quelli ottenuti in cellule trattate con solo rhGAA. Il secondo protocollo di trattamento ha dato risultati migliori ed è stato selezionato per valutare la concentrazione ottimale di L-CAR per la protezione di rhGAA.

Con il co-dosaggio di rhGAA e L-CAR (da 1 a 20 mM) sono stati osservati miglioramenti dell'attività di GAA a concentrazioni di L-CAR di 5, 10 e 20 mM (Figura 13b). I miglioramenti maggiori e

statisticamente più significativi sono stati ottenuti a 10 e 20 mM. Concentrazioni di L-CAR più elevate (fino a 50 mM) erano tossiche per i fibroblasti (dati non mostrati). Di conseguenza, è stata selezionata la concentrazione di 10 mM per ulteriori esperimenti, poiché questa concentrazione sembrava essere efficace e sicura per le cellule.

Successivamente, gli inventori hanno studiato l'effetto di L-CAR sulla maturazione di rhGAA nei fibroblasti PD1 e PD2. Per la terapia enzimatica sostitutiva, la rhGAA è fornita dal produttore come precursore da 110 kDa. Una volta entrato dalle cellule attraverso il recettore del mannosio-6-fosfato e le vie endocitiche, l'enzima viene convertito in un intermedio di 95 kDa e nelle isoforme molecolari attive di 76 e 70 kDa.

Le cellule sono state incubate per 24 ore con rhGAA da solo o con rhGAA in combinazione con L-CAR 10 mM. Nelle cellule trattate con la combinazione di rhGAA e L-CAR la quantità di peptidi attivi maturi da 70-76 kDa è stata notevolmente migliorata (Figura 13c). Le corrispondenti attività di GAA misurate nelle cellule PD1 e PD2 (Figura 13d) hanno confermato l'effetto

protettivo di L-CAR ed erano in linea con quelle osservate negli esperimenti precedenti.

Inoltre, la cinetica di maturazione di GAA è stata studiata in diversi momenti nei fibroblasti PD trattati con rhGAA o rhGAA in combinazione con 10 mM L-CAR. L'attività di GAA risulta aumentata progressivamente nel tempo e un effetto potenziante della co-incubazione con L-CAR era già rilevabile dopo 2 ore diventando progressivamente più pronunciato fino a 24 ore (Figura 14a). Anche le quantità di rhGAA matura, analizzate mediante western blot, sono migliorate nel tempo (Figura 14b).

Gli inventori hanno studiato anche gli effetti del co-dosaggio di rhGAA e L-CAR sul *trafficking* lisosomiale dell'enzima ricombinante. Le cellule sono state incubate nelle condizioni selezionate negli esperimenti precedenti e la co-localizzazione di rhGAA con Lamp2 è stata analizzata mediante microscopia confocale a immunofluorescenza. In tutte e tre le linee cellulari, la co-localizzazione è stata migliorata (Figura 15A). Questo risultato è stato confermato da un'analisi quantitativa del segnale di GAA totale

(Figura 15B) e del segnale di GAA co-localizzato con Lamp2 (Figura 15C) eseguita da ImageJ Software.

RIVENDICAZIONI

1. Preparazione combinata comprendente un enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) e almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida, per l'uso simultaneo, separato o sequenziale nel trattamento terapeutico della malattia di Pompe in un paziente, in cui l'almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida è scelto dal gruppo che consiste di L-carnitina, D-carnitina, acetil-D-carnitina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina C, e qualsiasi loro combinazione.
2. Preparazione combinata per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'enzima alfa-glucosidasi acida è un'alfa-glucosidasi acida umana ricombinante (rhGAA).
3. Preparazione combinata per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la somministrazione dell'almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida aumenta la stabilità di detto enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) a un valore di pH compreso tra 7,0 e 7,5.
4. Preparazione combinata per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) è in una forma idonea alla somministrazione per via parenterale.

5. Preparazione combinata per l'uso secondo la rivendicazione 4, in cui l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) è in una forma idonea alla somministrazione per infusione endovenosa o per iniezione.

6. Preparazione combinata per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 5, in cui l'almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida è in una forma idonea alla somministrazione per via enterale o parenterale.

7. Composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento terapeutico della malattia di Pompe in un paziente, comprendente un enzima alfa-glucosidasi acida (GAA), almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida, e veicoli, eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili, in cui l'almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida è scelto dal gruppo che consiste di L-carnitina, D-carnitina, acetil-D-carnitina, vitamina B1, vitamina B6, vitamina C, e qualsiasi loro combinazione.

8. Composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 7, in cui l'enzima alfa-glucosidasi acida è un'alfa-glucosidasi acida umana ricombinante (rhGAA).

9. Composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 7 o 8, che è in una forma idonea alla somministrazione per via enterale o parenterale.

10. Composizione farmaceutica per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7 a 9, comprendente l'enzima alfa-glucosidasi acida (GAA) ad una concentrazione in peso compresa nell'intervallo dallo 0,05% all'1% p/v sul volume totale della composizione e/o l'almeno uno chaperone allosterico dell'enzima alfa-glucosidasi acida ad una concentrazione in peso compresa nell'intervallo dallo 0,5% al 5% p/v sul volume totale della composizione.

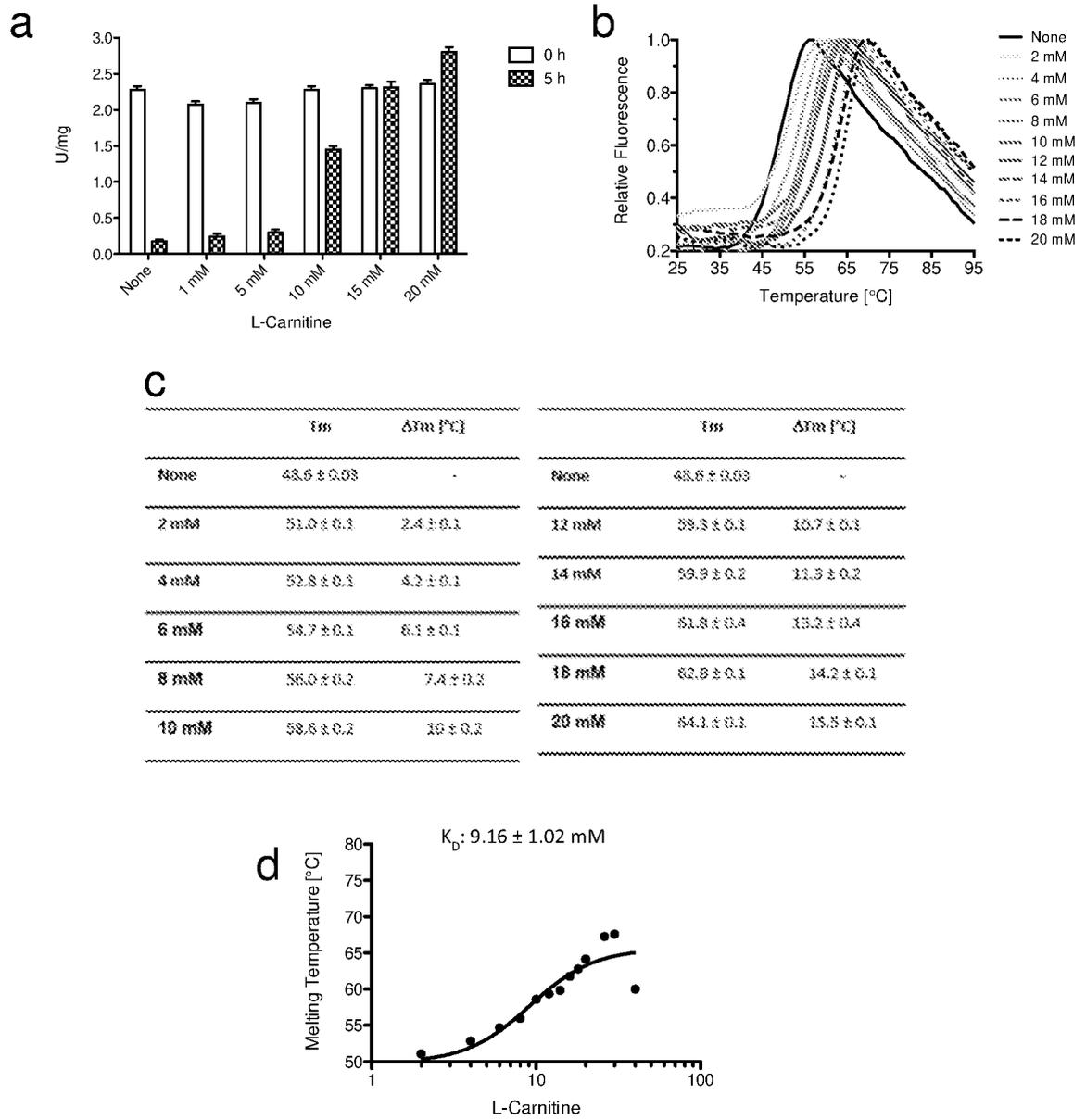
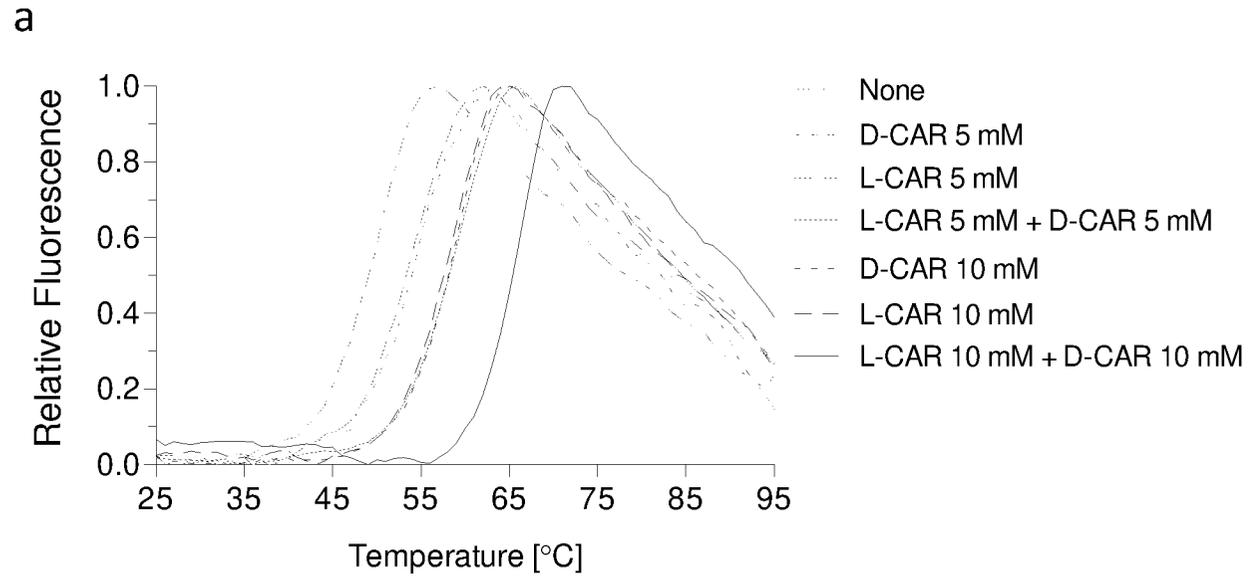


Figure 1

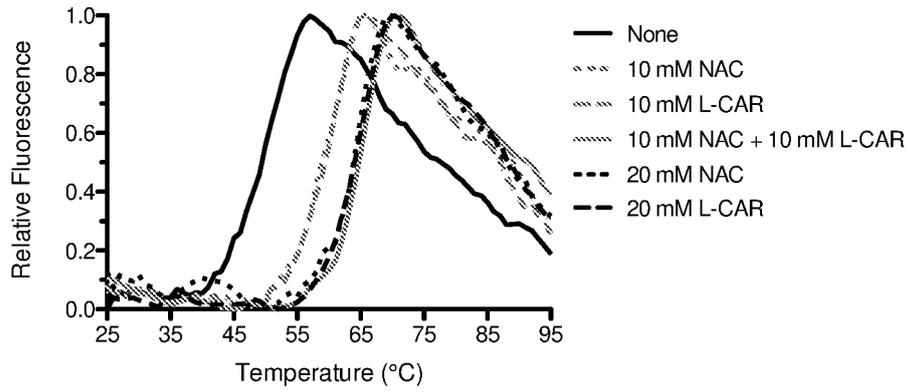
Figure 2



**b**

	None	5 mM L-CAR	5 mM D-CAR	5 mM L-CAR + 5 mM D-CAR	10 mM L-CAR	10 mM D-CAR	10 mM L-Car + 10 mM D-Car
$T_m$ [°C]	49.0 ± 0.1	53.3 ± 0.1	53.9 ± 0.01	58.4 ± 0.7	58.6 ± 0.2	57.9 ± 0.1	65.2 ± 0.2
$\Delta T_m$ [°C]		+4.3 ± 0.2	+4.9 ± 0.1	+9.4 ± 0.8	+9.6 ± 0.3	+8.9 ± 0.2	+15.9 ± 0.3

a



b

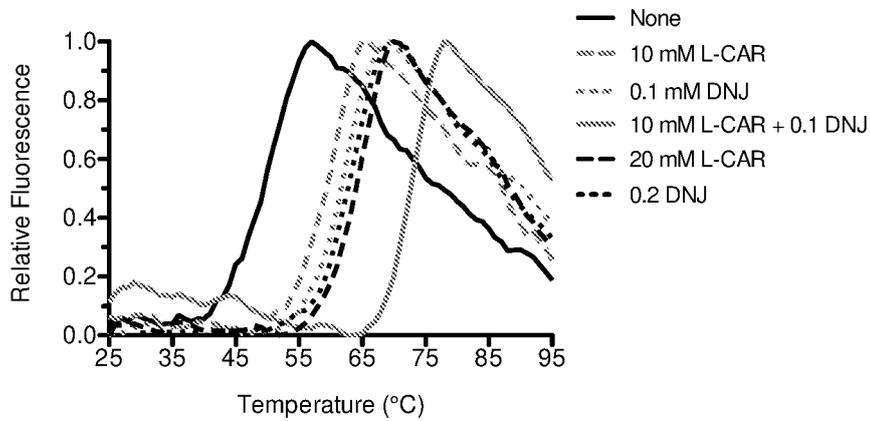
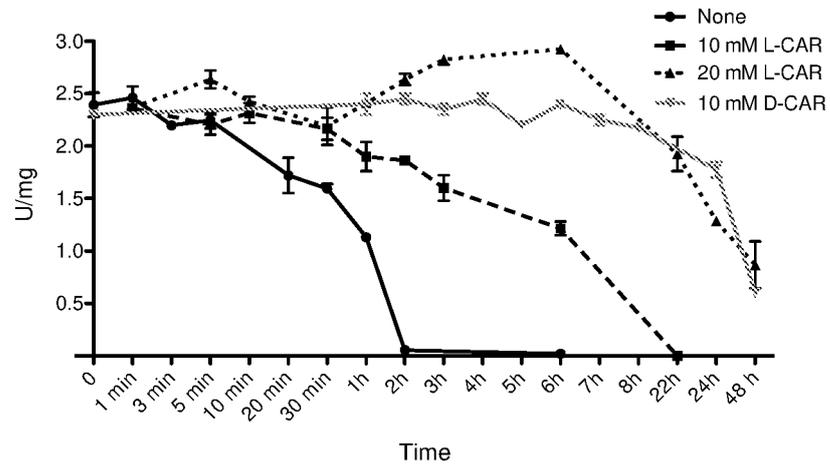


Figure 3

a



b

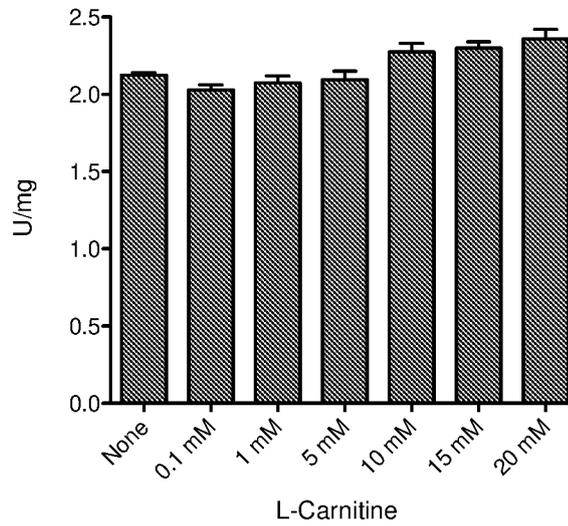


Figure 4

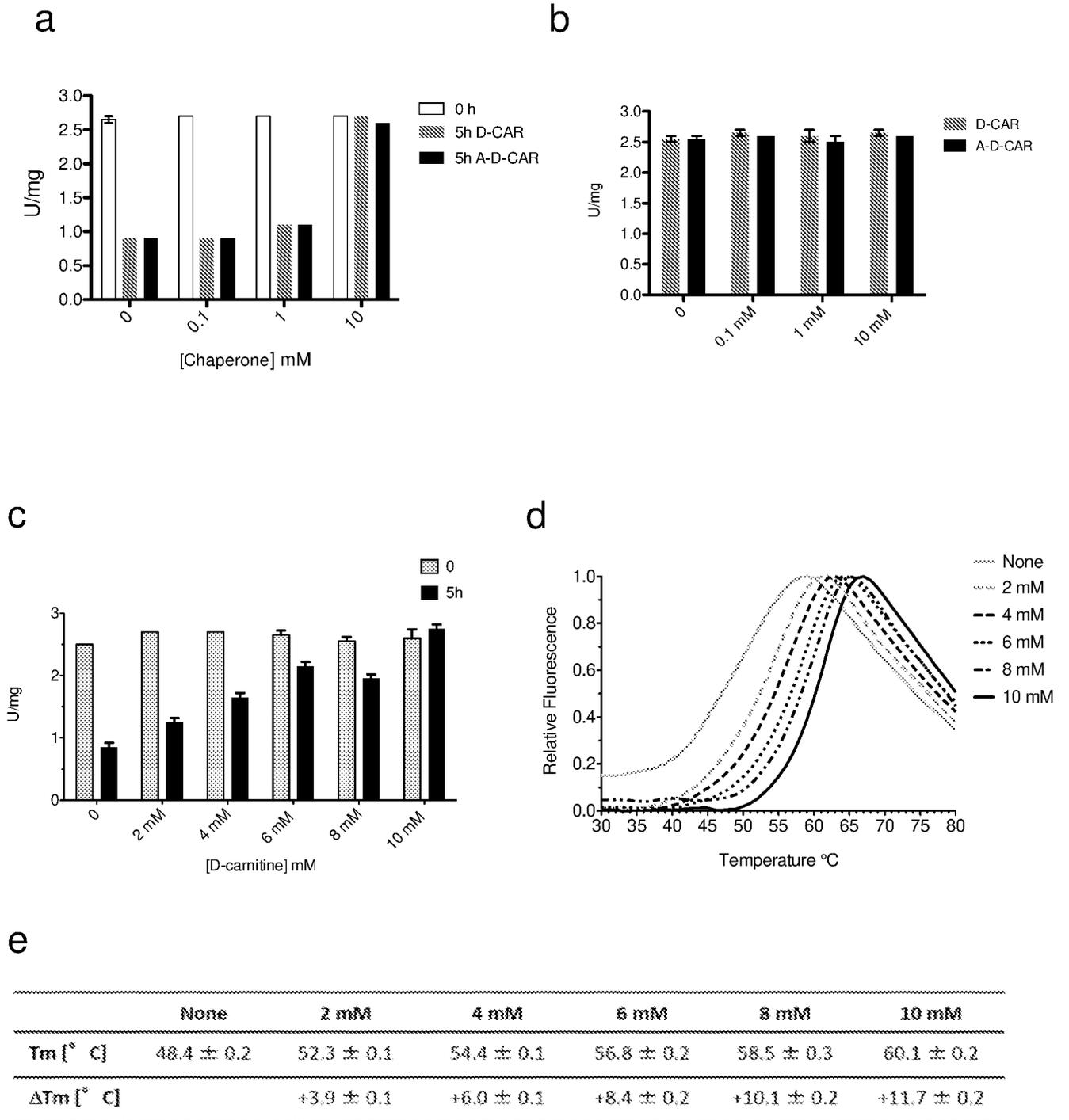


Figure 5

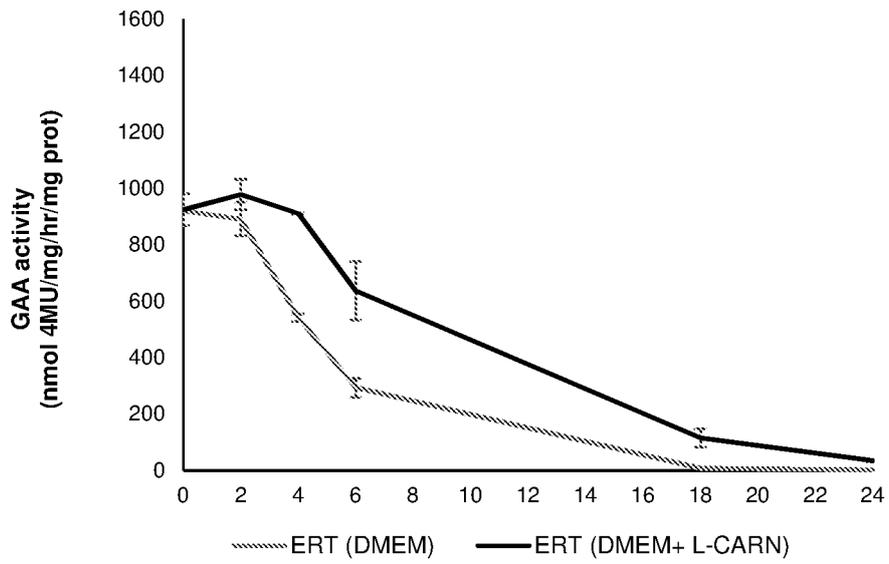
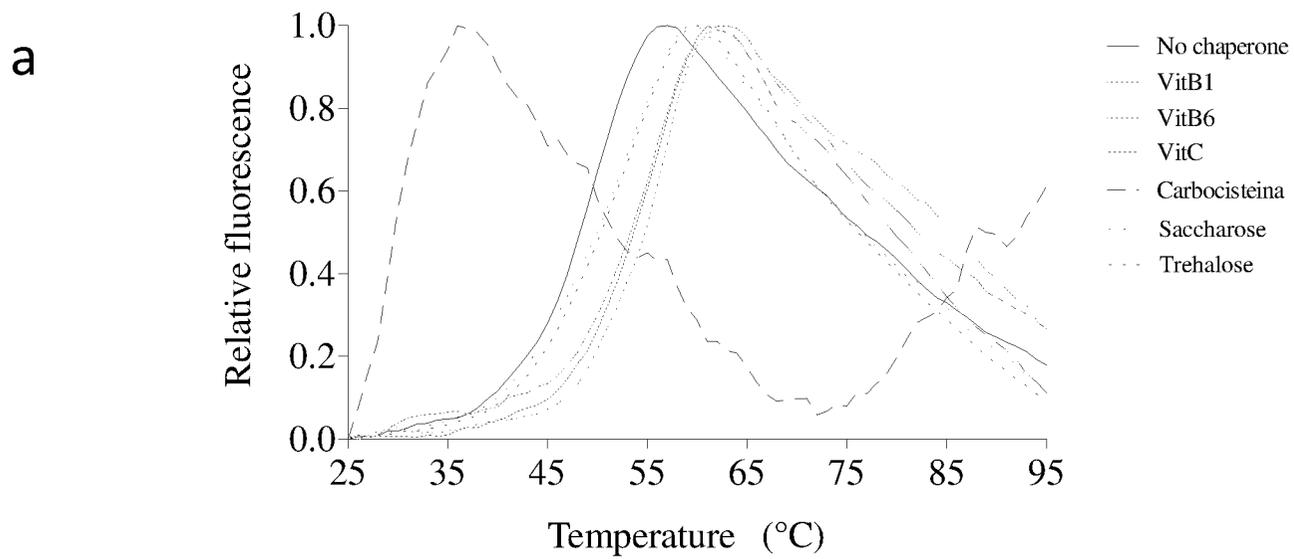


Figure 6



**b**

	No chaperone	VitB1	VitB6	VitC	Carbocisteina	Saccharose	Trehalose
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	48.47 ± 0.10	54.5 ± 0.1	53.9 ± 0.4	54.0 ± 0.3	29.8 ± 0.3	50.3 ± 0.5	50.5 ± 0.2
<b>ΔT<sub>m</sub> (°C)</b>	-	+6.0 ± 0.2	+5.4 ± 0.5	+5.5 ± 0.4	-18.7 ± 0.4	+1.8 ± 0.6	+2.0 ± 0.3

Figure 7

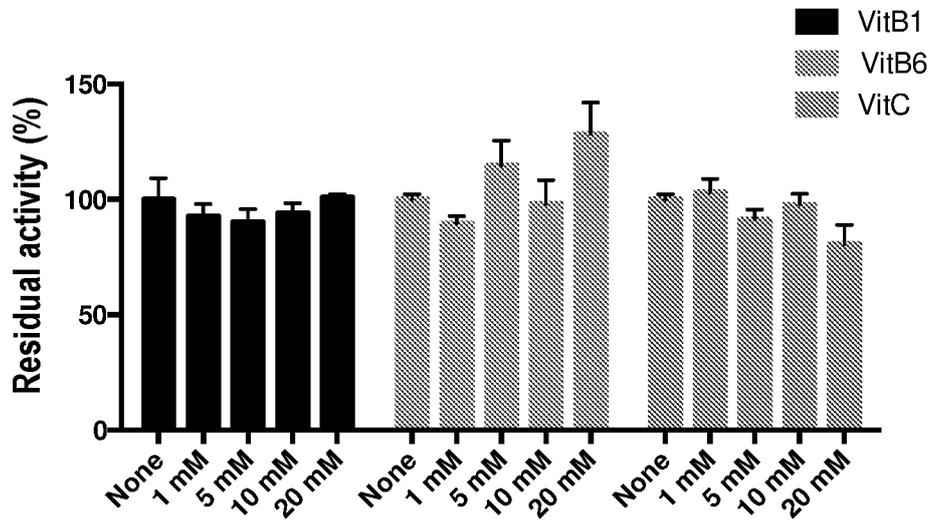


Figure 8

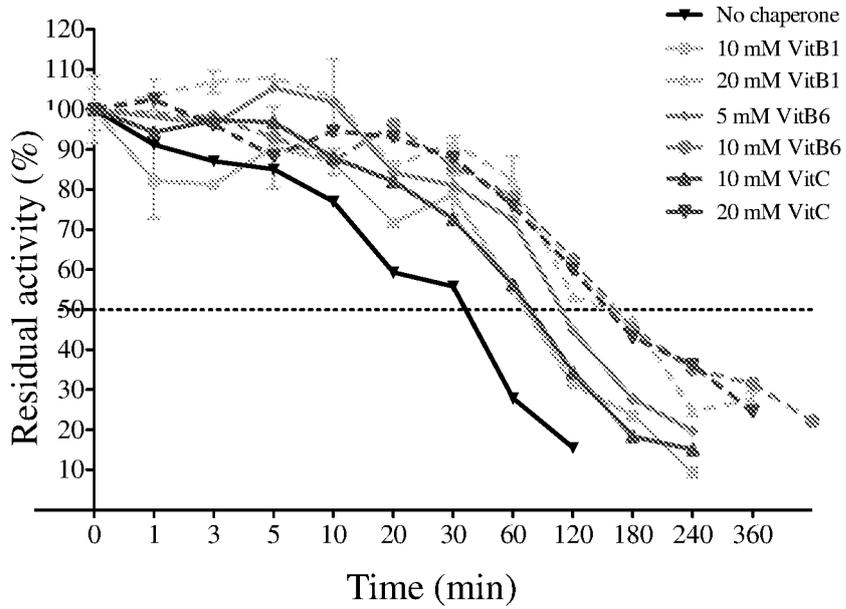
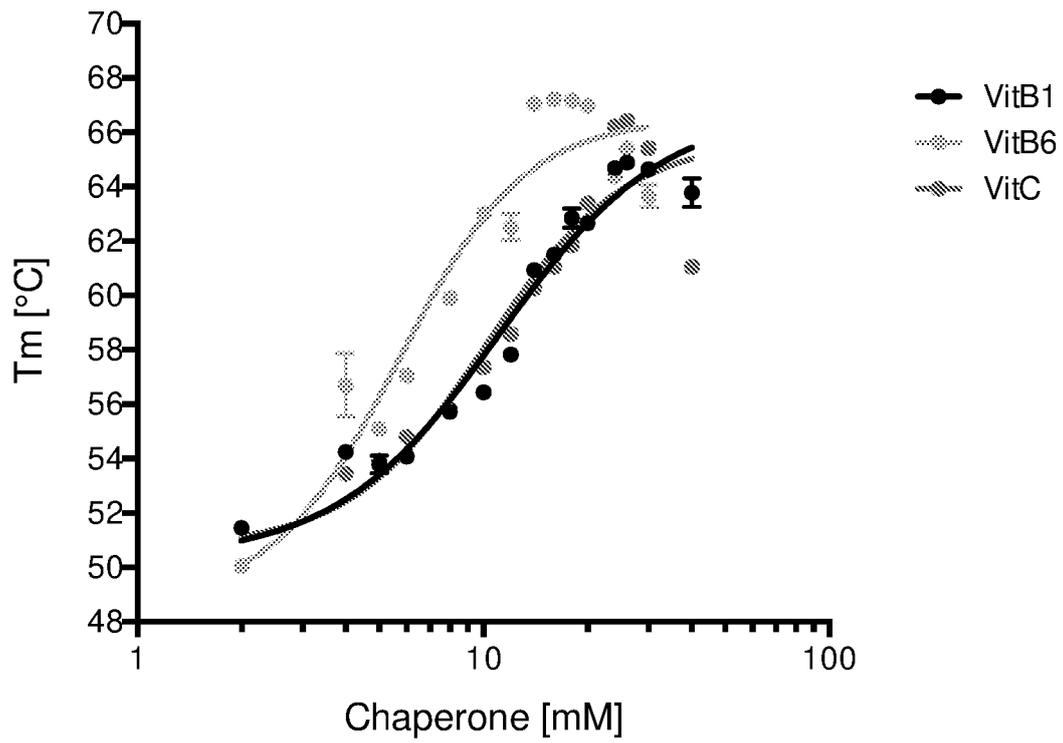
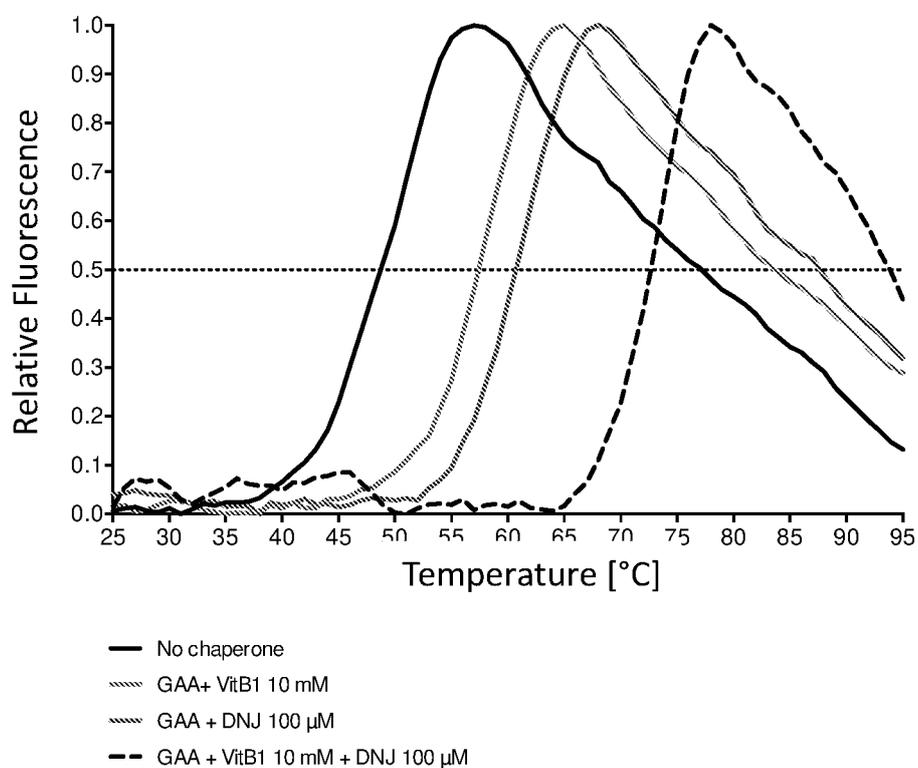


Figure 9



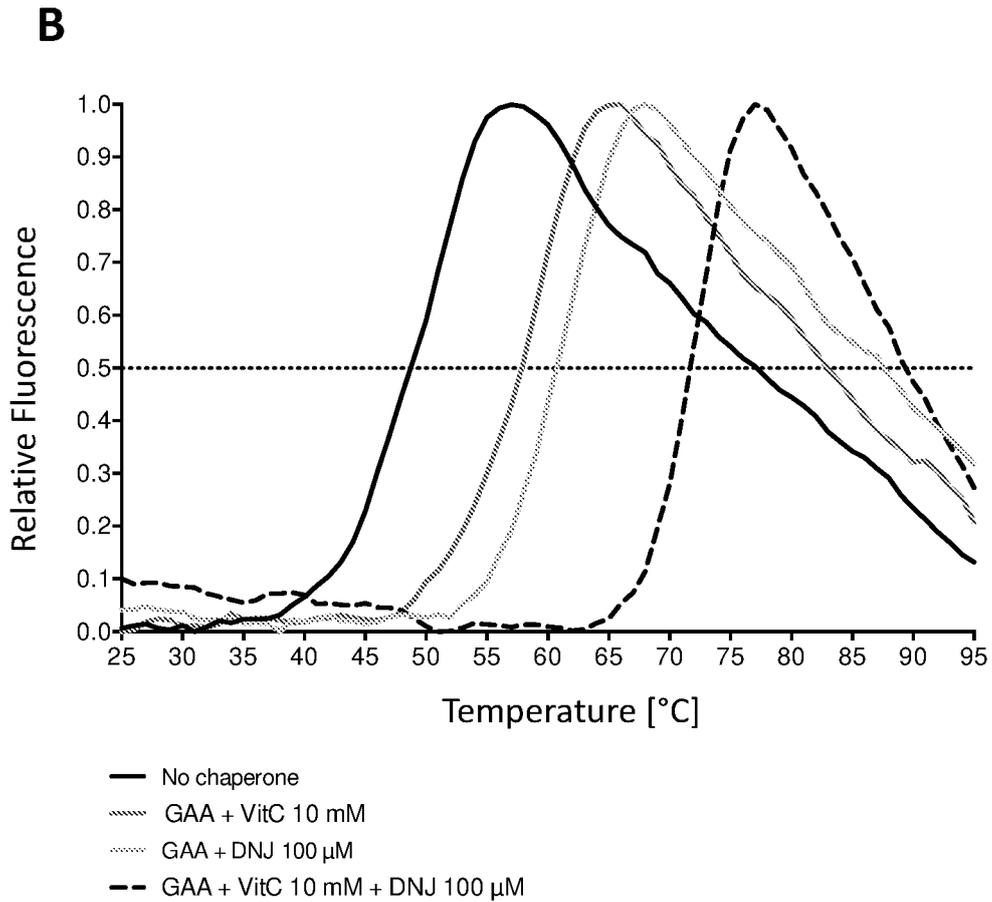
	VitB1	VitB6	VitC
$K_D$ (mM)	$11.14 \pm 0.90$	$5.59 \pm 0.43$	$10.28 \pm 0.98$

Figure 10

**A**

	No chaperone	VitB1 10 mM	DNJ 100 μM	VitB1 10 mM + DNJ 0.1 mM
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	48.8 ± 0.2	57.4 ± 0.2	60.8 ± 0.2	72.4 ± 0.1
<b>ΔT<sub>m</sub> (°C)</b>	-	8.6 ± 0.4	12.0 ± 0.4	23.6 ± 0.3

Figure 11A



	No chaperone	VitC 10 mM	DNJ 100 μM	VitC 10 mM + DNJ 0.1 mM
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	48.8 ± 0.2	57.4 ± 0.2	60.8 ± 0.2	71.6 ± 0.1
<b>ΔT<sub>m</sub> (°C)</b>	-	8.6 ± 0.4	12.0 ± 0.4	22.8 ± 0.3

Figure 11B

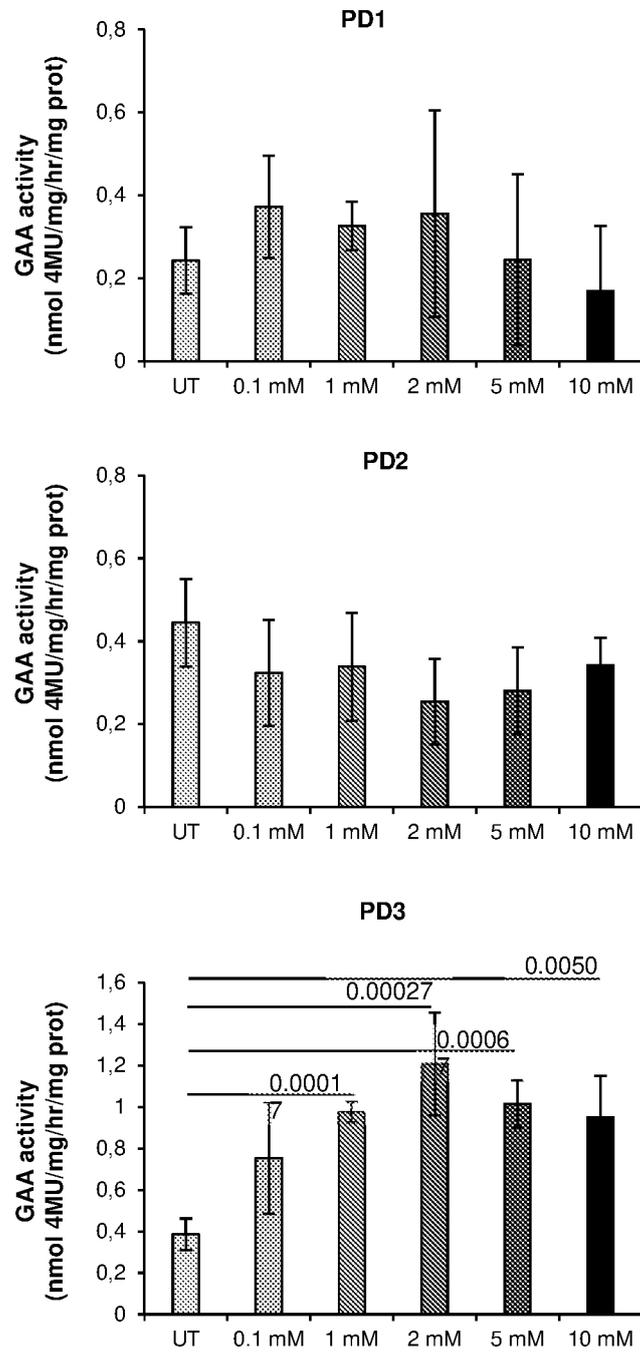


Figure 12

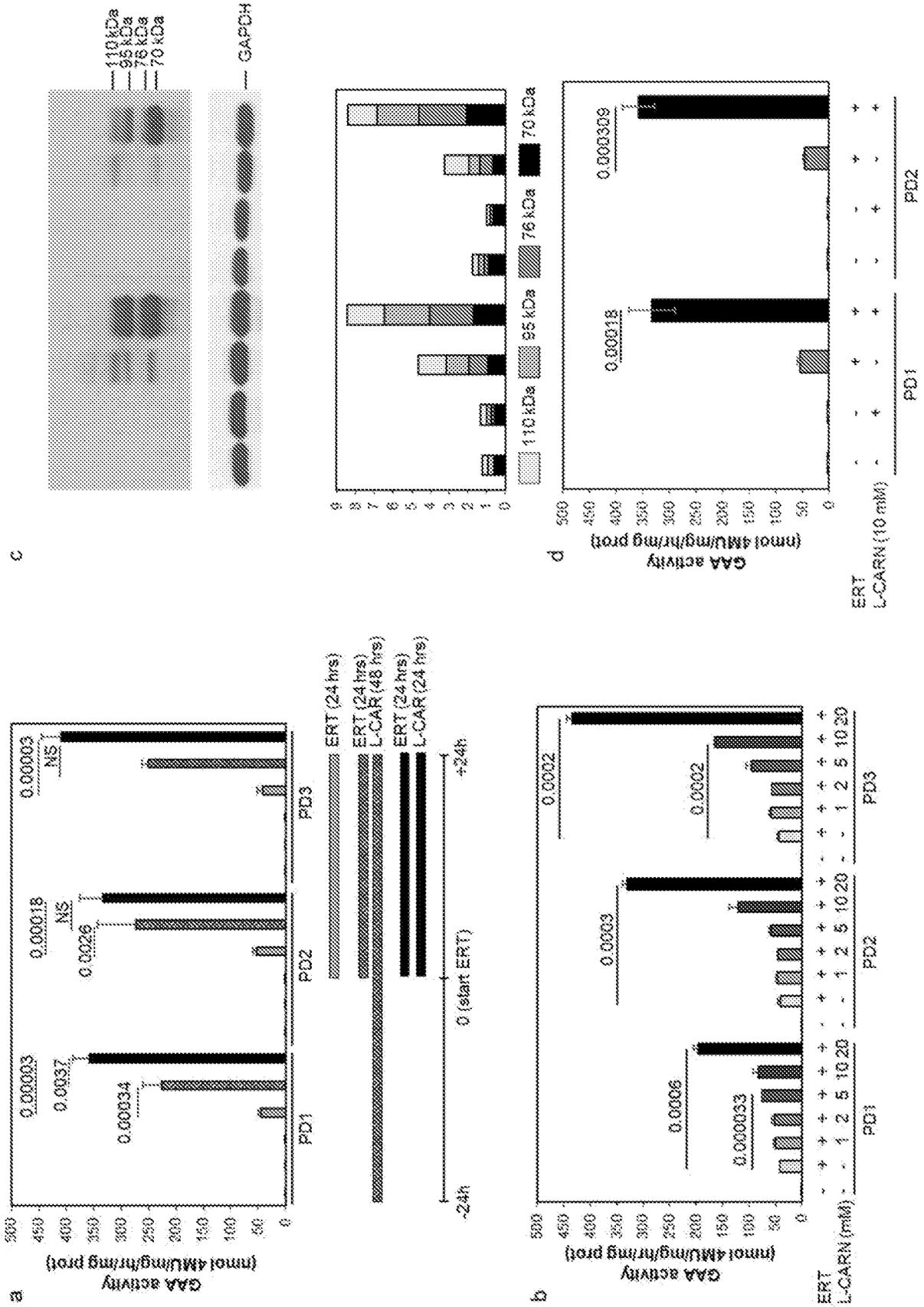


Figure 13

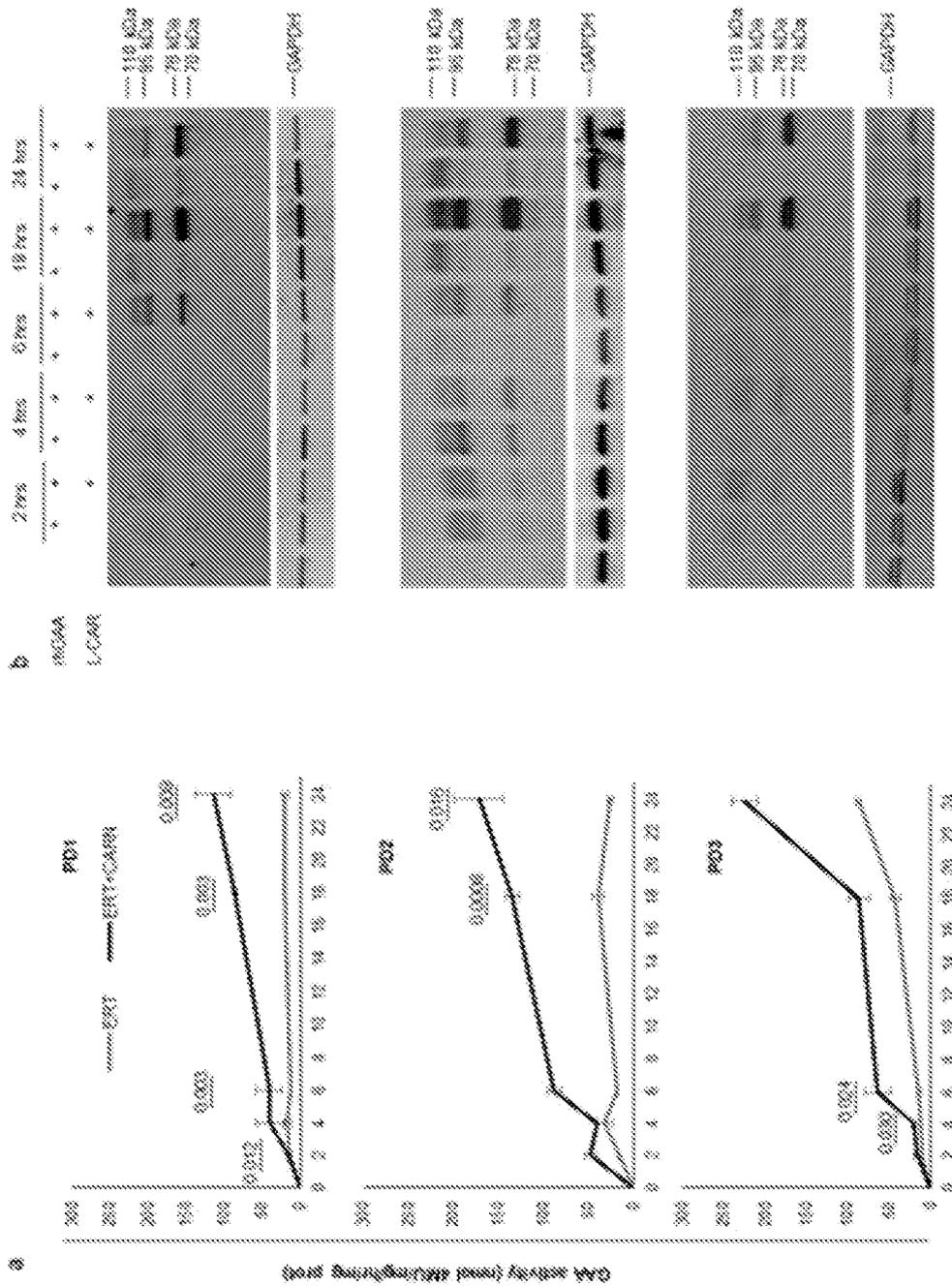


Figure 14

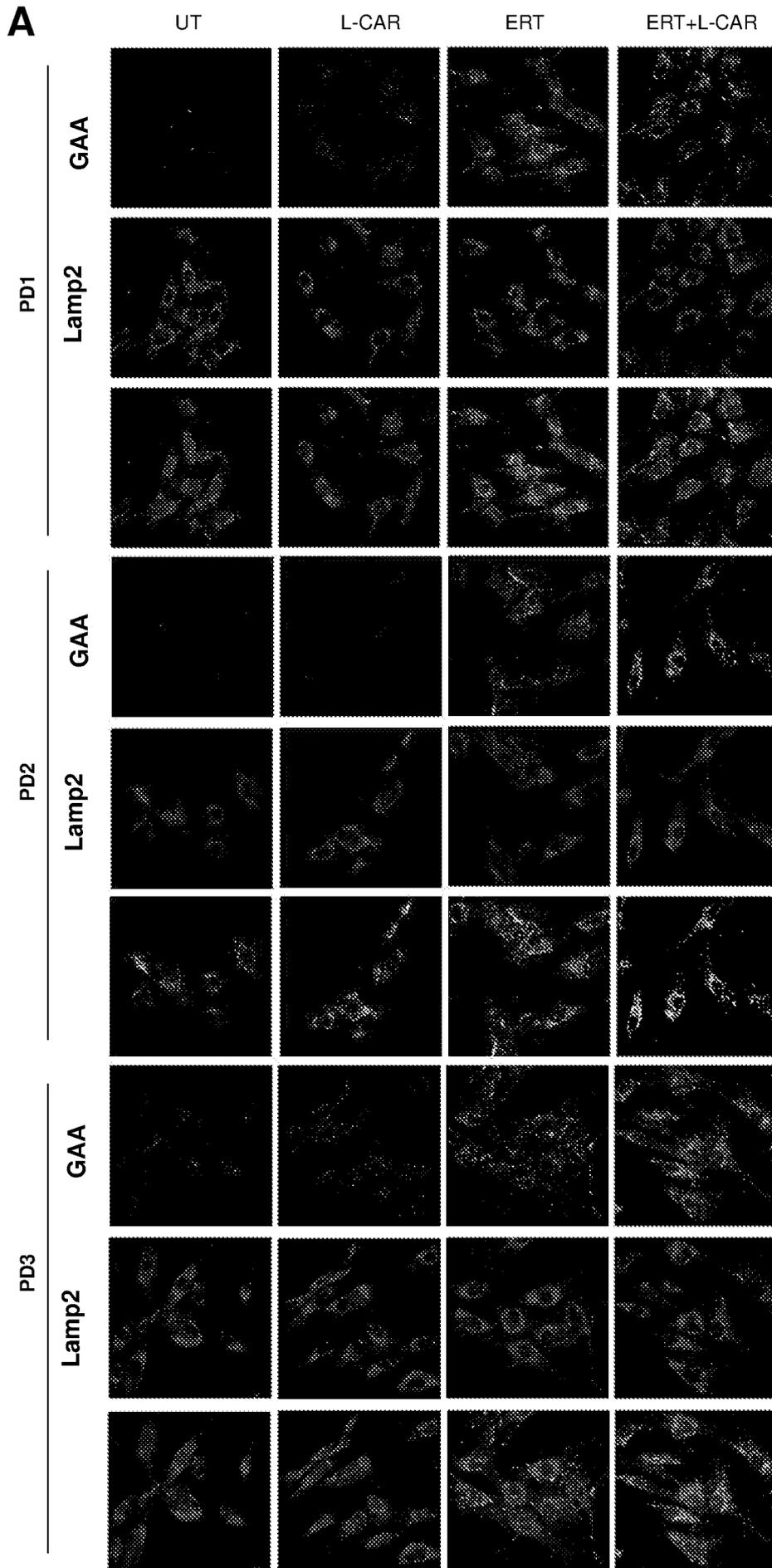


Figure 15

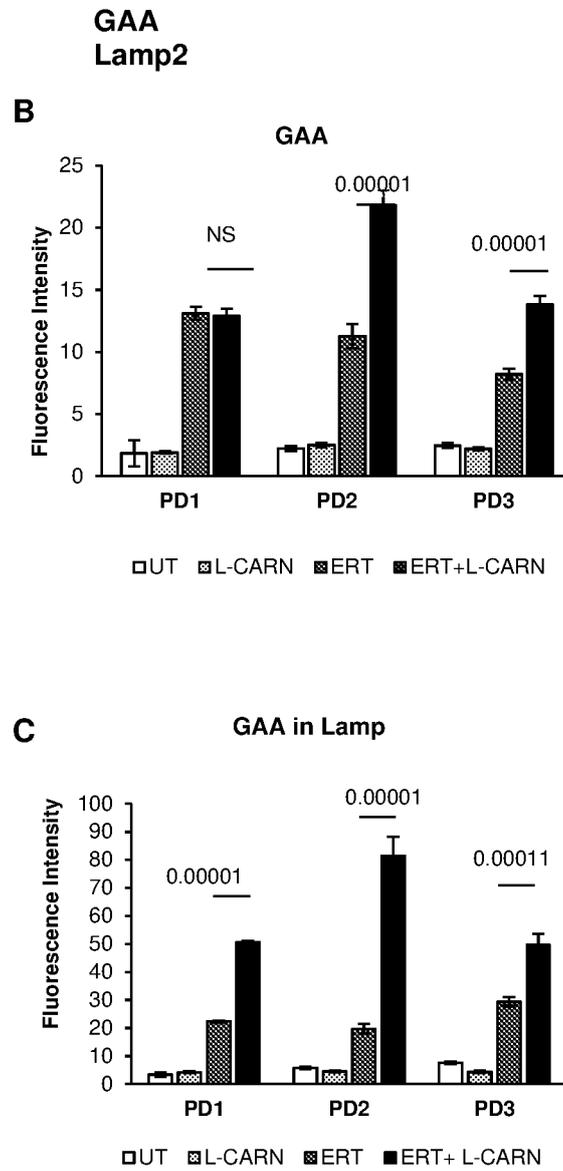


Figure 15