

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 171**

51 Int. Cl.:

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2017** **PCT/US2017/012455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017** **WO17120420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2017** **E 17736394 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3400025**

54 Título: **Uso del guayacol para la prevención y el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno**

30 Prioridad:

06.01.2016 US 201662275471 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2024

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (33.3%)
412 Low Memorial Library 535 West 116th Street
New York, NY 10027, US;
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT LTD. (33.3%) y
RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (33.3%)**

72 Inventor/es:

**AKMAN, HASAN, ORHAN;
DIMAURO, SALVATORE;
KAKHLON, OR y
MIGUEL, WEIL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 979 171 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

Uso del guayacol para la prevención y el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] Esta invención está en el campo de la prevención y el tratamiento de ciertas enfermedades o trastornos caracterizados por la acumulación de glucógeno y/o poliglucosano mediante la prevención de la síntesis y/o descomposición del glucógeno.

10

FONDO DE LA INVENCIÓN

15

[0002] El glucógeno es un polisacárido ramificado con un peso molecular de nueve a diez millones de daltons. La molécula media de glucógeno contiene aproximadamente 55.000 residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos α -1,4 (92%) y α -1,6 (8%). La síntesis del glucógeno está catalizada por dos enzimas: (i) la glucógeno sintasa, que "encadena" la glucosa para formar cadenas lineales; y (ii) la enzima de ramificación del glucógeno (GBE), que une una nueva rama corta de unidades de glucosa a una cadena lineal en un enlace α -1,6 glicosídico. El glucógeno se almacena principalmente en el hígado y los músculos, donde representa una reserva de energía que puede movilizarse rápidamente. El trastorno más común del metabolismo del glucógeno se observa en la diabetes, en la que una cantidad anormal de insulina o una respuesta anormal a la insulina provocan la acumulación o el agotamiento del glucógeno hepático. Aunque la síntesis y la degradación del glucógeno se han estudiado durante décadas, su control no se conoce por completo.

20

25

[0003] Las enfermedades hereditarias por almacenamiento de glucógeno se han asociado a diversas deficiencias enzimáticas. Por ejemplo, la glucogenosis tipo IV (GSD-IV) es un trastorno autosómico recesivo causado por la deficiencia de la enzima de ramificación del glucógeno. Una forma de GSD, la enfermedad con cuerpos de poliglucosano del adulto (APBD), se caracteriza por la aparición, después de los 50 años, de paraparesia piramidal progresiva, déficits sensoriales distales, vejiga neurógena, pérdida de la deambulación y muerte prematura debido a complicaciones de mielopatía y neuropatía periférica (Klein 2009; Mochel *et al.* 2012). El sello neuropatológico de la APBD, como el de todas las GSD, es la acumulación de glucógeno, pero en el caso de la GSD-IV, el glucógeno está poco ramificado y se denomina poliglucosano (PG). El PG precipita en la célula formando grandes cuerpos denominados cuerpos de poliglucosano (PGB), que se agregan en el sistema nervioso central (CNS) y el sistema nervioso periférico (SNP). En las neuronas, los PGB se encuentran principalmente en los axones, y a menudo parecen llenarlos. Actualmente no existe tratamiento para la APBD ni para ninguna enfermedad GSD-IV.

30

35

[0004] La APBD es alélica de la GSD-IV. Los pacientes con GSD-IV clásica presentan una deficiencia profunda de GBE y mueren en la infancia de insuficiencia hepática con acumulaciones masivas de poliglucosanos hepáticos y extrahepáticos. Los individuos con deficiencia completa suelen morir prenatalmente (Andersen 1956). La mayoría de los pacientes con APBD son descendientes de judíos asquenazíes, y el 70% son homocigotos para la mutación NM_000158:c.986A>C/p.Y329S *GBE1*. No se conocen pacientes judíos asquenazíes con APBD que no sean portadores de al menos una copia de la mutación p.Y329S.

40

45

[0005] Aunque no se conoce bien la patogenicidad del PGB, también se encuentran agregados de PG similares en la enfermedad de Lafora (LD), en la deficiencia parcial de glucogenina y en el cerebro normal que envejece (Marquez *et al.* 2010; Meng *et al.* 2009), a pesar de la actividad normal de GBE en estas condiciones. Se ha demostrado que la eliminación de PG en modelos de ratón Lafora mediante la reducción de la actividad de la glucógeno sintasa mejora los síntomas (Turnbull *et al.* 2011).

50

55

[0006] Aunque la LD y la GSD-IV comparten la misma característica histopatológica de cuerpos de poliglucosano (PGB) PAS-positivos resistentes a la diastasa, las dos enfermedades están causadas por mutaciones en genes diferentes y presentan cuadros clínicos muy distintos. La LD es un trastorno autosómico recesivo que se presenta en la adolescencia con epilepsia mioclónica progresiva que conduce a la muerte en la década siguiente a su aparición. La patogénesis de la LD no implica directamente a las enzimas glucolíticas, sino a enzimas reguladoras que pueden afectar indirectamente a las enzimas glucolíticas (lanzano *et al.* 2005). Se han identificado dos genes causantes de la enfermedad de Lafora, EPM2A y NHLRC1 (EPM2B) (Chan *et al.* 2004; Minassian *et al.* 1998). El producto del gen EPM2A, laforina, es una proteína tirosina fosfatasa con un dominio de unión a carbohidratos. NHLRC1 codifica la proteína malina, una E3 ubiquitina ligasa que actúa sobre laforina. En LD, la transducción anormal de señales o el control de la degradación de proteínas a través de la ubiquitinilación parecen alterar el trabajo de colaboración de GS y GBE. Recientemente, este laboratorio y otros colaboradores han descrito otros dos genes. Una de ellas es otra E3 ubiquitina ligasa responsable de PGB sólo en músculo y corazón, de nuevo diferente tanto de Lafora como de GSD-IV (Nilsson *et al.* 2013). La segunda resulta en una cantidad reducida (pero no deficiente) de glucogenina muscular descrita en un grupo selecto de pacientes de la isla de Cerdeña (Malfatti *et al.* 2014).

60

65

[0007] Por lo tanto, todavía se desconoce mucho sobre los mecanismos que conducen a la formación de poliglucosano en la LD, GSD-IV y otras glucogenosis (Deutsch y Young 2000; Tonin *et al.* 1992). Dado el inicio tardío y la actividad GBE residual de la APBD, sería importante idear estrategias dirigidas a potenciar, si no a restaurar, la actividad de ramificación del glucógeno o dirigidas a eliminar el poliglucosano acumulado.

[0008] La plataforma de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos adecuados para la enfermedad con cuerpos de poliglucosano del adulto (APBD) y la enfermedad de Lafora (LD) se divulgó previamente (The 8th Annual Conference of the Israeli Society of Gene & Cell Therapy; HUMAN GENE THERAPY, vol. 24, no. 3, 1 de marzo de 2013, páginas A1-A15; DOI: 10.1089/num.2013.2501).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0009] Según un aspecto, se proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de guayacol para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de almacenamiento de glucógeno en un sujeto que la necesita, en la que dicha enfermedad se caracteriza por la acumulación de poliglucosano o la acumulación anormal de glucógeno.

[0010] La presente invención está dirigida a una composición que comprende guayacol para su uso en un método de prevención y/o tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la acumulación de glucógeno y/o poliglucosano en un sujeto que lo necesite.

[0011] Según la invención, las enfermedades de almacenamiento de glucógeno que pueden prevenirse y/o tratarse mediante la administración de guayacol se eligen del grupo que consiste en la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de los tipos I-IX, la enfermedad con cuerpos de poliglucosano del adulto o APBD y la enfermedad de Lafora o LD.

[0012] En otro aspecto de la invención, las enfermedades y trastornos por almacenamiento de glucógeno pueden prevenirse y/o tratarse mediante la administración de guayacol.

[0013] En una realización, el sujeto es un mamífero y en la realización más preferida, el mamífero es un humano.

[0014] En una realización, la administración es oral y la dosis es de aproximadamente 22,5 a 720 miligramos de guayacol por kilogramo del sujeto.

[0015] La administración del guayacol puede ser una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, hasta seis veces al día, preferiblemente a intervalos regulares.

[0016] La administración del guayacol debe comenzar tan pronto como se sospeche la enfermedad o trastorno caracterizado por la acumulación de glucógeno y/o poliglucosano y continuar durante toda la vida del paciente. Las pruebas para el diagnóstico de tales trastornos, incluidas las pruebas genéticas, son conocidas en la técnica.

[0017] Los métodos para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia excluidos por el Artículo 53(c) EPC no están comprendidos en la invención. Las referencias en el presente documento a tales métodos deben interpretarse como métodos en los que las sustancias y composiciones descritas en el presente documento son para su uso de acuerdo con las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0018] Con el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas realizaciones de la invención. No obstante, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentos precisos de las realizaciones representadas en los dibujos.

La **Figura 1** muestra la orientación génica y la caracterización molecular de un modelo de ratón deficiente en *GBE1*. La **Figura 1A** es el mapa parcial del locus *Gbe1* y el vector de orientación que contiene sitios FRT flanqueando el exón 7, antes y después de la recombinación homóloga en células ES. El cruce de ratones *Gbe1*^{+/neo} con ratones ROSA 26-flpe extirpa el exón 7 de un alelo del gen *Gbe1* mediante la recombinasa Flpe. La posterior reproducción de ratones heterocigotos *Gbe1*^{+/-} crea un ratón *Gbe1* knockout (*Gbe1*^{-/-}). En la **Figura 1B** se muestran electroferogramas con los resultados de la RT-PCR y el análisis de la secuencia del ARNm extraído del tejido muscular neonatal de los exones 6 a 8 del ADNc de tipo salvaje (arriba) y *Gbe1*^{-/-} (abajo).

La **Figura 2** muestra que las acumulaciones de PGB PAS positivas resistentes a la diastasa en *Gbe1*^{neo/-} MEF son detectables tanto por microscopía óptica como por microscopía fluorescente. La **Figura 2A** muestra que las células *Gbe1*^{+/+} no presentan tinción PAS positiva en el citosol. La **figura 2B** muestra que los fibroblastos *Gbe1*^{neo/-} acumulan PGB indicado por las cabezas de flecha. Las **Figuras 2C** y **2D** muestran MEF de control teñidos con PAS con menor aumento (**Figura 2C**) e imagen fluorescente del mismo campo (**Figura 2D**), utilizando la misma técnica de imagen empleada para detectar PGB en MEF *Gbe1*^{neo/-} en las **Figuras 2E** y **2F**, respectivamente. Las cabezas de flecha indican el PGB en las figuras **2E** y **2F**. Ampliación digital de los campos cuadrados de las figuras **2E** y **2F** que muestran grandes PGB redondos en las figuras **2G** y **2H**.

La **Figura 3** muestra que el guayacol disminuye la síntesis de glucógeno. La **Figura 3A** muestra que los cultivos de MEF teñidos con PAS y tratados con 10 μM de guayacol disminuyeron los gránulos teñidos con PAS en el citosol indicados por las cabezas de flecha. La **Figura 3B** muestra una disminución del contenido de glucógeno en MEF (n=3). La **Figura 3C** es un gráfico que muestra los resultados del contenido relativo de glucógeno de las células cultivadas en medios suplementados con cobalto tras 3 días de tratamiento con guayacol a las

concentraciones indicadas en el eje horizontal.

La **Figura 4** es un Western blot de GYS1 y GAPDH en extractos musculares obtenidos de ratones de tipo salvaje dos horas después de la administración con guayacol, suspendido en agua, en las cantidades de dosificación indicadas en el panel superior por sonda oral.

La **Figura 5** es un gráfico que representa los resultados del contenido de glucógeno en corazón, cerebro, músculo e hígado en ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}*, y en ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}* tratados con guayacol. Se midió el glucógeno tras un ayuno de 16 horas (n = 4 para cada tratamiento). El contenido de glucógeno se expresa como porcentaje de glucosa mg/gramo de tejido fresco. Las barras de error representan la media ± DE, P < 0,001 donde se indica (*).

La **Figura 6** es un gráfico que muestra que el guayacol aumenta la concentración de glucosa en sangre. El contenido de glucosa en sangre se midió a las horas indicadas en ratones de tipo salvaje y APBD (p.Y329s) tratados con guayacol y no tratados. n=3 en cada grupo.

La **Figura 7** es un Western blot de fosfo AMPK-α y AMPK total en extractos musculares obtenidos de ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}*, y de ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}* tratados con guayacol.

La **Figura 8** es un gráfico que muestra los resultados del análisis por cromatografía líquida de alta resolución de la adenosina en el músculo de ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}*, y de ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}* tratados con guayacol.

La **Figura 9** es un gráfico de Kaplan-Meier que ilustra la incidencia de muerte en ratones *Gbe1^{ys/ys}* (n=47), frente a ratones de tipo salvaje (n=29), y ratones *Gbe1^{ys/ys}* y de tipo salvaje tratados con guayacol (n=4 cada uno).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

[0019] Los términos utilizados en esta especificación tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y del contexto específico en el que se utiliza cada término. Ciertos términos se discuten a continuación, o en otra parte de la especificación, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones para su uso en métodos de tratamiento o prevención de acuerdo con las reivindicaciones. Además, se apreciará que lo mismo puede decirse de más de una manera. Por consiguiente, se puede utilizar un lenguaje alternativo y sinónimos para uno o más de los términos aquí tratados, y no se debe dar ninguna importancia especial al hecho de que un término se elabore o trate aquí o no. Se facilitan sinónimos de algunos términos. La mención de uno o varios sinónimos no excluye el uso de los demás sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de la especificación, incluidos los ejemplos de cualquiera de los términos aquí tratados, es meramente ilustrativo y no limita en modo alguno el alcance y el significado de la invención o de cualquiera de los términos ejemplificados. Asimismo, la invención no se limita a sus realizaciones preferidas.

[0020] "Enfermedad con cuerpos de poliglucosano del adulto" o "APBD" se utilizará indistintamente y es una enfermedad de almacenamiento de glucógeno caracterizada por una constelación de síntomas progresivos y debilitantes, incluyendo paraparesia piramidal progresiva, déficits sensoriales distales, vejiga neurogénica, pérdida de deambulación y muerte prematura debido a complicaciones de mielopatía y neuropatía periférica.

[0021] Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "cuerpos de poliglucosano" o "PGB" se refiere a acumulaciones de glucógeno insoluble agregado y poco ramificado, poliglucosano o PG, en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP), que son el sello neuropatológico de la APBD. En las neuronas, los PGB se encuentran principalmente en los axones, y a menudo parecen llenarlos.

[0022] El término "agente", tal como se utiliza aquí, significa una sustancia que produce o es capaz de producir un efecto e incluiría, pero no se limita a, productos químicos, farmacéuticos, biológicos, pequeñas moléculas orgánicas, anticuerpos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas.

[0023] La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se utiliza aquí para significar una cantidad suficiente para causar una mejora en una condición clínicamente significativa en el sujeto, o retrasa o minimiza o mitiga uno o más síntomas asociados con la enfermedad, o resulta en un cambio beneficioso deseado de la fisiología en el sujeto.

[0024] Los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a un medio para ralentizar, aliviar, mejorar o aliviar al menos uno de los síntomas de la enfermedad, o revertir la enfermedad tras su aparición.

[0025] Los términos "prevenir", "prevención" y similares se refieren a actuar antes de la aparición manifiesta de la enfermedad, para evitar que ésta se desarrolle o minimizar la extensión de la enfermedad o ralentizar su curso de desarrollo.

[0026] El término "sujeto", tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere a un animal con un sistema inmunitario, como las aves y los mamíferos. Los mamíferos incluyen caninos, felinos, roedores, bovinos, equinos, porcinos, ovinos y primates. Las aves son, entre otras, las aves de corral, los pájaros cantores y las rapaces. Así, la invención puede utilizarse en medicina veterinaria, por ejemplo, para tratar animales de compañía, animales de granja, animales de laboratorio en parques zoológicos y animales en libertad. La invención es particularmente deseable para aplicaciones médicas humanas

[0027] El término "necesitado del mismo" sería un sujeto conocido o sospechoso de tener o estar en riesgo de desarrollar la enfermedad con cuerpos de poliglucosano del adulto (APBD), una enfermedad de almacenamiento de glucógeno (GSD) incluyendo los tipos I-IX, la enfermedad de Lafora (LD), una enfermedad caracterizada por la acumulación anormal de PGB, y/o una enfermedad o trastorno caracterizado por la acumulación anormal de glucógeno. También puede saberse o sospecharse que el sujeto padece o corre el riesgo de padecer diabetes.

[0028] Un sujeto que necesita tratamiento sería aquel que ya ha sido diagnosticado con APBD, una GSD o LD o una enfermedad o trastorno caracterizado por la acumulación anormal de PGB y/o glucógeno. Un sujeto con necesidad de prevención sería aquel con factores de riesgo de APBD, GSD o LD o una enfermedad o trastorno caracterizado por la acumulación anormal de PGBs y/o glucógeno o de ascendencia judía asquenazí.

[0029] El término "aproximadamente" significa dentro de un margen de error aceptable para el valor particular según lo determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición, es decir, el grado de precisión requerido para un fin particular, como una formulación farmacéutica. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, según la práctica en la materia. Alternativamente, "aproximadamente" puede significar un rango de hasta el 20%, preferiblemente hasta el 10%, más preferiblemente hasta el 5%, y aún más preferiblemente hasta el 1% de un valor dado. Alternativamente, en particular con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describan valores particulares en la solicitud y en las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, debe suponerse que el término "aproximadamente" significa dentro de un margen de error aceptable para el valor particular.

[0030] De acuerdo con la presente invención, puede haber numerosas herramientas y técnicas dentro de la habilidad del arte, tales como las comúnmente utilizadas en inmunología molecular, inmunología celular, farmacología y microbiología. Véase, p. ej., Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel et al. eds. (2005) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc: Hoboken, N.J.; Bonifacino et al. eds. (2005) *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley and Sons, Inc: Hoboken, N.J.; Coligan et al. eds. (2005) *Current Protocols in Immunology*, John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N.J.; Coico et al. eds. (2005) *Current Protocols in Microbiology*, John Wiley and Sons, Inc: Hoboken, N.J.; Coligan et al. eds. (2005) *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley and Sons, Inc: Hoboken, N.J.; and Enna et al. eds. (2005) *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley and Sons, Inc: Hoboken, N.J. Abbondanzo et al. (1993) *Derivation of embryonic stem cell lines. Methods in Enzymology*, 225:803-855; Hogan et al. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Guayacol como Agente Terapéutico y/o Profiláctico para la Enfermedad del Almacenamiento de Glucógeno

[0031] Se encontró que un compuesto disminuía la síntesis y acumulación de poliglucosano en un 50% (Ejemplo 5). Este compuesto era el guayacol.

[0032] Después de determinar que el guayacol disminuía la síntesis de poliglucosano, el agente se probó en un modelo de ratón de deficiencia de GBE, creado mediante la recombinación homóloga de la mutación GBE1 humana más común (p.Y329S) encontrada en pacientes judíos asquenazíes, y designado *GBE1^{ys/ys}* (Ejemplos 6-10). Todos los ratones tratados con guayacol vivieron hasta los 24 meses, a diferencia de los ratones no tratados que empezaron a morir a los 12 meses aproximadamente y murieron todos a los 21 meses aproximadamente (Ejemplo 10 y Figura 9). El guayacol no afectó negativamente al comportamiento del animal y también tuvo otros beneficios, como la prevención del prolapso del pene que se observa en la enfermedad (Ejemplo 10).

[0033] El guayacol es un compuesto orgánico natural con la fórmula $C_6H_4(OH)(OCH_3)$, aislado por primera vez por Otto Unverdorben en 1826. Aunque lo biosintetizan diversos organismos, este aceite aromático amarillento suele proceder del guayaco o de la creosota de madera. Las muestras se oscurecen con la exposición al aire y a la luz. El guayacol está presente en el humo de la madera, resultante de la pirólisis de la lignina. El compuesto contribuye al sabor de muchos compuestos, por ejemplo, el café tostado. El guayacol es un precursor de varios aromatizantes, como el eugenol y la vainillina. Sus derivados se utilizan medicinalmente como expectorante, antiséptico y anestésico local. También puede utilizarse como indicador en reacciones químicas que producen oxígeno.

[0034] Hasta la fecha no hay ninguna descripción o sugerencia de que el guayacol pueda ser eficaz como prevención o tratamiento de APBD, GSD, LD o enfermedades o trastornos caracterizados por la acumulación de PGB.

[0035] Los sujetos que se beneficiarían de la administración de guayacol serían aquellos diagnosticados con una enfermedad por almacenamiento de glucógeno o GSD incluyendo los Tipos I-IX. Entre ellos se incluirían los que aún no han presentado síntomas de una GSD pero han sido sometidos a pruebas genéticas y se ha descubierto que tienen una mutación asociada a una GSD, incluida la APBD. Una de estas pruebas genéticas se describe en el documento PCT/US2015/063439.

[0036] Además, los hijos de un progenitor que tenga una GSD o sea portador de una mutación para la GSD estarían en riesgo de padecer una GSD y también podrían beneficiarse de la administración de guayacol.

[0037] Además, las personas de ascendencia judía asquenazí podrían tener riesgo de padecer una GSD, incluida la APBD.

5 **[0038]** Además, los sujetos que padecen la enfermedad de Lanora o LD también se beneficiarían de la administración de guayacol.

[0039] Además, los sujetos que padecen otras enfermedades y/o trastornos con histopatología distintiva de acumulación de glucógeno o cuerpos PG o PG también se beneficiarían de la administración de guayacol.

10 Composiciones Farmacéuticas para Uso en Métodos de Tratamiento o Prevención Según las Reivindicaciones en las que se Administra Guayacol

15 **[0040]** La presente invención abarca composiciones para su uso en métodos de tratamiento o prevención de acuerdo con las reivindicaciones en las que se administra guayacol. Los métodos de administración preferidos incluyen la administración oral; mucosa, como nasal, sublingual, vaginal, bucal o rectal; parenteral, como subcutánea, intravenosa, inyección en bolo, intramuscular o intraarterial; o transdérmica, a un sujeto. Así pues, el guayacol debe estar en la forma adecuada para la administración de elección. Una forma de dosificación preferida es la oral.

20 **[0041]** Tales composiciones para administración pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del guayacol y un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no suelen producir reacciones alérgicas o reacciones adversas similares, como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano, y están aprobadas por una agencia reguladora del gobierno federal o de un estado, o incluidas en la lista de la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. "Portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el terapéutico. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como soluciones salinas en agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, como el aceite de cacahuete, de soja, mineral, de sésamo y similares. Una solución salina es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como soportes líquidos, especialmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada en polvo, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH.

35 **[0042]** Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, cachés, troqueles, pastillas para chupar, dispersiones, supositorios, ungüentos, cataplasmas (cataplasmas), pastas, polvos, apósitos, cremas, emplastos, parches, aerosoles, geles, formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente, y sólidos estériles (p. ej., sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración parenteral a un paciente. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una forma adecuada de portador para proporcionar la forma de administración adecuada al paciente. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

45 **[0043]** Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración oral pueden ser cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, soluciones, jarabes, suspensiones (en líquidos acuosos o no acuosos) o emulsiones. Los comprimidos o cápsulas de gelatina dura pueden contener lactosa, almidón o sus derivados, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, ácido esteárico o sus sales. Las cápsulas de gelatina blanda pueden contener aceites vegetales, ceras, grasas, polioles semisólidos o líquidos. Las soluciones y jarabes pueden contener agua, polioles y azúcares. Un agente activo destinado a la administración oral puede recubrirse o mezclarse con un material que retrase la desintegración y/o absorción del agente activo en el tracto gastrointestinal. Así, la liberación sostenida puede lograrse durante muchas horas y, si es necesario, el agente activo puede protegerse de la degradación dentro del estómago. Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden formularse para facilitar la liberación de un agente activo en una localización gastrointestinal concreta debido a condiciones específicas de pH o enzimáticas.

55 **[0044]** Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración transdérmica pueden suministrarse en forma de parches discretos destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo prolongado.

60 **[0045]** Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración nasal y pulmonar pueden comprender portadores sólidos como polvos que pueden administrarse por inhalación rápida a través de la nariz. Las composiciones para administración nasal pueden comprender portadores líquidos, como aerosoles o gotas. Alternativamente, la inhalación directamente a través en los pulmones puede lograrse mediante la inhalación profunda o la instalación a través de una boquilla. Estas composiciones pueden comprender soluciones acuosas o oleosas del principio activo. Las composiciones para inhalación pueden suministrarse en dispositivos especialmente adaptados que incluyen, entre otros, aerosoles presurizados, nebulizadores o insufladores, que pueden construirse para proporcionar dosis predeterminadas del principio activo.

[0046] Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración rectal pueden suministrarse como supositorios o enemas. Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal pueden presentarse en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol.

[0047] Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración parenteral incluyen soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, baceróstatos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre del sujeto. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones son el agua, los alcoholes, los polioles, la glicerina y los aceites vegetales. Las composiciones adaptadas para la administración parental pueden presentarse en envases unidosos o multidosos, como ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en estado liofilizado (liofilizado) requiriendo únicamente la adición de un portador estéril, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles. Los vehículos adecuados que pueden utilizarse para proporcionar formas de dosificación parenteral de la invención son bien conocidos por los expertos en la materia. Algunos ejemplos son: Agua para inyección USP; vehículos acuosos como cloruro sódico inyectable, Ringer inyectable, dextrosa inyectable, dextrosa y cloruro sódico inyectable y Ringer lactato inyectable; vehículos miscibles en agua, como alcohol etílico, polietilenglicol y polipropilenglicol; y vehículos no acuosos, como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, oleato de etilo, miristato de isopropilo y benzoato de bencilo.

[0048] La selección de una dosis terapéuticamente eficaz será determinada por el experto teniendo en cuenta varios factores que serán conocidos por un experto en la materia. Dichos factores incluyen la forma particular del inhibidor y sus parámetros farmacocinéticos, como la biodisponibilidad, el metabolismo y la semivida, que se habrán establecido durante los procedimientos habituales de desarrollo empleados normalmente para obtener la aprobación reglamentaria de un compuesto farmacéutico. Otros factores a tener en cuenta para determinar la dosis son la afección o enfermedad a tratar o el beneficio a obtener en un individuo normal, la masa corporal del paciente, la vía de administración, si la administración es aguda o crónica, las medicaciones concomitantes y otros factores bien conocidos que afectan a la eficacia de los agentes farmacéuticos administrados. Así pues, la dosis precisa debe decidirse según el criterio del experto en la materia y las circunstancias de cada paciente, y de acuerdo con las técnicas clínicas habituales.

[0049] Una dosis terapéuticamente eficaz preferida de guayacol oscila entre aproximadamente 6 mg/kg y 720 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre 6 mg/kg y 12 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre 6 mg/kg y 22,5 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre 6 mg/kg y 45 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 22,5 mg/kg y aproximadamente 45 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 22,5 mg/kg y aproximadamente 90 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 22,5 mg/kg y aproximadamente 180 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 22,5 mg/kg y aproximadamente 360 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 45 mg/kg y aproximadamente 90 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 45 mg/kg y aproximadamente 180 mg/kg. Otra dosis preferida oscila entre aproximadamente 45 mg/kg y aproximadamente 360 mg/kg.

[0050] La administración de guayacol puede ser una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día, cinco veces al día, hasta seis veces al día, preferiblemente a intervalos regulares. Por ejemplo, cuando el guayacol se administra cuatro veces al día, las dosis serían a las 8:00, 12:00, 16:00 y 20:00.

[0051] Una forma de dosificación preferida es la oral. El guayacol puede suspenderse en agua para su administración oral.

[0052] Las dosis pueden ajustarse para optimizar los efectos en el sujeto. Por ejemplo, el guayacol puede administrarse a una dosis más baja al principio, como 22,5 mg/kg, y aumentarse con el tiempo a 45 mg/kg, 90 mg/kg, 180 mg/kg, 360 mg/kg, hasta 720 mg/kg, dependiendo de la respuesta del sujeto. Antes de aumentar la dosis, puede controlarse la mejoría del sujeto.

EJEMPLOS

[0053] La presente invención puede comprenderse mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que se presentan para ilustrar mejor las realizaciones preferidas de la invención. En ningún caso deben interpretarse como una limitación del amplio alcance de la invención.

Ejemplo 1- Generación de un Modelo de Ratón para la Deficiencia de GBE

[0054] Se generaron dos alelos del locus *Gbe1*, una delección nula completa *Gbe1*^{-/-}, y una mutación hipomórfica de inserción del casete de neomicina *Gbe1*^{neo/neo}. La supresión del exón 7 dio lugar a un modelo de enfermedad de Andersen fetal, mientras que la inserción del casete de neomicina aguas abajo del exón 7 dio lugar a una forma adulta de la enfermedad, la APBD. Las mutaciones nulas e hipomórficas se crearon utilizando secuencias consenso de recombinación FRT aguas arriba y aguas abajo del exón 7 de *Gbe1* de ratón mediante recombinación homóloga (Figura 1). Los animales *Gbe1*^{+/neo} se cruzaron para generar ratones *Gbe1*^{neo/neo}, o se cruzaron con una cepa de ratones que expresaba Flpe (GT(ROSA)^{26Sor-Flpe}) para eliminar las secuencias entre los dos sitios FRT (representados por la banda amarilla en la Figura 1A), generando así el alelo nulo. Los ratones heterocigotos con supresión del exón 7 (*Gbe1*^{+/-}) se cruzaron para obtener animales homocigotos *Gbe1*^{-/-}.

[0055] Para confirmar la ausencia del exón 7, se aisló ARN muscular total de camadas recién nacidas de progenitores *Gbe1*^{+/+} y se amplificó mediante análisis RT-PCR. En los ratones portadores de la delección mediada por FLPe, un fragmento de 210 pb de longitud correspondiente al exón 7 estaba ausente del ADNc. Los productos de RT-PCR se secuenciaron para demostrar la localización exacta de la delección (Figura 1B). Véase Akman *et al.* 2011.

Ejemplo 2- Generación de Células Embrionarias de Ratón a partir de Ratones deficientes en *Gbe1* con Cuerpos de Poliglucosano Detectables

[0056] Se generaron líneas celulares embrionarias de ratón (MEF) de ratones de tipo salvaje (*Gbe1*^{+/+}) y *Gbe1*^{neo/-}. La línea celular *Gbe1*^{neo/-} tenía el 7,5% ±5 de la actividad GBE normal, aproximadamente la mitad de la actividad GBE presente en los glóbulos blancos de pacientes con APBD. Este bajo nivel de actividad enzimática se consigue cruzando ratones heterocigotos con exón 7 suprimido con ratones *Gbe1*^{neo/neo} y generando descendencia heterocigota compuesta (Ejemplo 1).

[0057] Se cultivaron fibroblastos de piel de embriones de tipo salvaje o *Gbe1*^{neo/-} E17.5 para establecer la línea celular MEF por métodos conocidos en la técnica (Figura 2). La tinción PAS positiva resistente a la diastasa se utilizó específicamente para la tinción de carbohidratos. Tras la fijación con paraformaldehído, las células se lavaron con PBS y el glucógeno normal se degradó mediante digestión con alfa-amilasa. Los polisacáridos y PG residuales en MEF se trataron con ácido periódico para oxidar los azúcares a aldehídos, que reaccionan con el reactivo de Schiff y se tiñen de rosa. Aunque la tinción PAS fue muy eficaz para detectar PG (véanse las figuras 2A, 2B, 2C, 2E y 2G), el sistema de detección de células IN Cell 2000 se basa en la tinción de fluorescencia. La tinción PAS en sí es fluorescente debido a los reactivos de pararosanilina, como la rodamina y el TRITC, que pueden excitarse (400 nm) y emiten luz detectable en el rango del rojo (510 nm) (Figuras 2D, 2F y 2H).

Ejemplo 3- Configuración del Sistema de Detección Automatizado

[0058] El cribado de alto rendimiento (HTS) depende de un sistema de detección fiable capaz de mostrar claramente el efecto del tratamiento sobre las células en estudio. Dado que los PGB eran fácilmente detectables mediante tinción PAS tanto con microscopía óptica como con microscopía fluorescente en la línea celular derivada de ratones deficientes en GBE, este método de detección se adaptó a un sistema automatizado de cribado de alto rendimiento.

[0059] Para configurar el sistema de detección automatizado, se sembraron MEFs *Gbe1*^{+/+} y *Gbe1*^{neo/-} de control a diferentes densidades en placas de 384 pocillos para obtener una densidad celular óptima. Una segunda optimización importante se refería a la digestión con diastasa del glucógeno normal, teniendo en cuenta que los PGB son resistentes a la digestión con diastasa y que se necesitan tiempos de incubación más largos y/o concentraciones enzimáticas más elevadas para digerir los PG. Estas optimizaciones se realizaron ajustando el tiempo de digestión y la concentración de α-amilasa. Tras optimizar la digestión y la tinción, los MEF se cultivaron en placas de 384 pocillos en el mismo incubador que se utilizó para los tratamientos, Cell::Explorer (Perkin Elmer). Se cultivaron células semiconfluentes en medios con suero reducido durante tres días con Rapamicina (10, 20, 40 y 80 nM), glucosa alta (25 mM) y medios cetogénicos sin glucosa (Santra *et al.* 2004). Al cabo de tres días, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se fijaron en paraformaldehído al 4%. Tras la digestión con diastasa, se tiñeron con PAS y, tras una breve tinción nuclear con Hoechst, las placas se analizaron con IN Cell 2000, GE Healthcare (Piscataway, NJ), un sistema de obtención de imágenes de alto rendimiento capaz de realizar análisis de alto contenido utilizando una amplia gama de microplacas. El instrumento estaba equipado con una cámara CCD de gran tamaño (resolución de 2048 x 2048 píxeles), que permitía obtener imágenes de pocillos completos en microplacas de 384 pocillos. IN Cell 2000 dispone de varios modos de obtención de imágenes, incluida la restauración de imágenes y la deconvolución para obtener una calidad similar a la confocal con un alto rendimiento. En este montaje inicial, se utilizaron concentraciones de Rapamicina 2 y 4 veces superiores a las normales para evaluar la toxicidad y la muerte celular. Se obtuvieron resultados cuantitativos automatizados en términos de fluorescencia relativa por célula. Se analizó la fluorescencia relativa por células positivas y se determinó su importancia mediante la puntuación z según la media de la placa o mediante la puntuación B si existe un efecto posicional relacionado con la fila y la columna que se produce en los cultivos celulares de placas de pocillos múltiples (Brideau *et al.* 2003).

Ejemplo 4- Cribado de una Biblioteca de Compuestos Mediante HTS de las células MEF Materiales y Métodos

[0060] Usando las células del Ejemplo 2 en el formato HTS del Ejemplo 3, la Biblioteca de Compuestos Clínicos de la Universidad John Hopkins (JHCCL que contiene 1.700 compuestos) fue examinada en la instalación central HTS de la Universidad de Columbia.

[0061] Se sembraron 1500 células por pocillo en placas de 384 pocillos. Las células se cultivaron en su medio de crecimiento normal. El segundo día, el medio se cambió a un medio sin suero. El tercer día, las células se trataron con los compuestos. Al cabo de tres días, se retiró el medio y las células se fijaron en formaldehído al 4% en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se tiñeron y analizaron como se indica en el Ejemplo 3.

Resultados

[0062] Se obtuvo un acierto correspondiente a un compuesto que disminuía la síntesis de poliglucosano en más del 50% a una concentración de 6,75 μ M (Figura 3). Experimentos posteriores demostraron que esta inhibición se produce a nivel de la síntesis de glucógeno o a nivel de la importación de glucosa en la célula, ya que este compuesto también disminuyó el contenido de glucógeno en la línea celular epitelial hepática HepG2 cultivada en medio de Dulbecco's modified eagle suplementado con 150 μ M de cloruro de cobalto (resultados no mostrados). El cloruro de cobalto activa la importación de glucosa y la síntesis de glucógeno: en su ausencia, las células MEF no acumulan glucógeno suficiente para ser detectado bioquímicamente. Este compuesto identificado era el guayacol y se ha utilizado como expectorante y aditivo alimentario aromatizante, pero ya no se comercializa con fines médicos.

Ejemplo 5- El Guayacol Aumenta la Fosforilación de la Glucógeno Sintasa

[0063] La glucógeno sintasa es una enzima alostérica que puede ser activada por glucosa 6 fosfato o inactivada por fosforilación de un residuo de serina en la enzima. Así, se determinó el estado de fosforilación de GYS1 en extractos musculares, que es el indicador de la actividad de la glucógeno sintasa.

[0064] A ratones de tipo salvaje se les administró guayacol suspendido en agua a concentraciones de 45, 90, 180, 360 y 720 mg/kg. Dos horas después de la administración, se obtuvieron extractos musculares y se realizó un análisis Western blot de GYS1.

[0065] La Figura 4 muestra que la fosforilación de GYS1 aumentó con el tratamiento con guayacol en comparación con la proteína GYS 1 total. La carga de proteínas se controló mediante el gen de mantenimiento GAPDH.

[0066] Dado que el efecto del guayacol aumentó repentinamente la fosforilación de GYS1, se probaron concentraciones más bajas a 6, 12, 22,5 y 45 mg/kg y se descubrió que 22,5 mg/kg era la concentración más baja de guayacol que podía administrarse en el agua potable.

Ejemplo 6- Efecto del Tratamiento con Guayacol en el Contenido Tisular de Glucógeno

[0067] Los inventores han desarrollado un modelo de ratón de deficiencia de GBE creado mediante la recombinación homóloga de la mutación GBE1 humana más común (p.Y329S) que se encuentra en pacientes judíos asquenazíes, y lo han denominado *Gbe1^{ys/ys}* (Akman *et al.* 2015).

[0068] Tras un mes de tratamiento, se sacrificaron cuatro ratones de cada grupo (ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}* no tratados y ratones de tipo salvaje y *Gbe1^{ys/ys}* tratados con guayacol) y se midió el contenido de glucógeno tisular según lo descrito por Pederson *et al.* 2004.

[0069] Se observó una disminución significativa del contenido de glucógeno en el hígado, pero el contenido de glucógeno en el cerebro, el corazón y el músculo no cambió (Figura 5). En los tratamientos posteriores, el contenido de glucógeno en el cerebro y el músculo de los ratones tratados mostró un ligero aumento en comparación con los ratones *Gbe1^{ys/ys}* no tratados.

Ejemplo 7- El Hígado Responde Más al Guayacol que Otros Tejidos

[0070] Debido a que el tratamiento con guayacol disminuyó el glucógeno en el hígado, pero en realidad lo aumentó en el cerebro, el músculo y el corazón, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en los ratones.

[0071] Tras una noche en ayunas, se inyectó glucosa a los ratones y se midieron los niveles de glucosa en sangre. Como se muestra en la Figura 6, los ratones tratados con guayacol presentaron una glucemia más elevada y ésta se mantuvo elevada durante más tiempo que en los ratones de control.

[0072] Esto explica por qué el glucógeno aumenta en los otros tejidos aunque GYS1 y 2 son inhibidos por la fosforilación. La glucosa 6 fosfato es un ávido activador de GYS1 o 2 y una concentración elevada de glucosa anula la inhibición mediada por la fosforilación e inicia la síntesis de glucógeno.

Ejemplo 8- El Tratamiento con Guayacol Aumenta la Fosforilación de la AMP Quinasa

[0073] La síntesis y la degradación del glucógeno se regulan en función del estado energético de la célula. Cuando la glucosa es abundante la cantidad de ATP es alta y la AMP quinasa permanece sin fosforilar. Sin embargo, cuando las concentraciones de glucosa disminuyen, también lo hacen los niveles de ATP porque se convierte en ADP y AMP. Mayores concentraciones de ADP y AMP activan la AMP quinasa alfa (AMPK- α , (Suter *et al.* 2006). A su vez, la AMPK- α activa desencadena el metabolismo catabólico impidiendo la síntesis de glucógeno, lípidos y la mayoría de las proteínas, al tiempo que activa la descomposición del glucógeno la fosforilación oxidativa y la biogénesis mitocondrial. Por lo tanto, se comprobó el estado de fosforilación de la AMP quinasa en los extractos hepáticos y, como se muestra en la Figura 7, el tratamiento con guayacol aumentó la fosforilación Thr 172 de la AMP quinasa, que es el indicador de su activación. La proteína AMPK- α total estima la fosforilación relativa (Figura 7).

Ejemplo 9- Mecanismo de Activación de AMPK-α

[0074] AMPK-α tiene 3 subunidades, la proteína heterotrimérica AMPK está formada por las subunidades α, β y γ. Cada una de estas tres subunidades asume un papel específico tanto en la estabilidad como en la actividad de la AMPK. (Stapleton *et al.* 1996). En concreto, la subunidad γ incluye cuatro dominios particulares de la cistationina beta sintasa (CBS) que confieren a la AMPK su capacidad para detectar con sensibilidad los cambios en el AMP: Proporción de ATP. Los cuatro dominios CBS crean dos sitios de unión para el AMP comúnmente denominados dominios Bateman. La unión de un AMP a un dominio Bateman aumenta cooperativamente la afinidad de unión del segundo AMP al otro dominio Bateman (Akman *et al.* 2007). Dado que las concentraciones de AMP frente a las de ATP pueden activar la AMPK-α, se midieron los niveles de AMP, ADP y ATP en extractos musculares, aunque no hubo diferencias significativas entre los ratones de tipo silvestre o *Gbe1^{ys/ys}* y los ratones de tipo silvestre o *Gbe1^{ys/ys}* tratados con guayacol, se produjo una disminución significativa de los niveles de adenosina en los ratones tratados con guayacol (53% +/- 27.5 en los de tipo salvaje y 48% +/- 36,8 en los *Gbe1^{ys/ys}* (n=4 en cada grupo y p<0,02 y 0,03 respectivamente) (Figura 8).

Ejemplo 10 - El Guayacol Aumenta la Esperanza de Vida de los Ratones con la Mutación p.Y329S

[0075] Se trató a ratones con guayacol en agua potable durante 12 meses cada dos días preparando solución fresca de guayacol en agua (3,8 g/litro o 3,1 ml/litro) considerando el hecho de que un ratón adulto bebe 6 ml de agua cada día (Bachamov *et al.* 2002).

[0076] 22.5 mg/kg de guayacol no afectó adversamente el comportamiento animal, como se concluyó por las pruebas de agarre y la ganancia o pérdida de peso que fue la misma en ambos grupos.

[0077] Los ratones *Gbe1^{ys/ys}* tratados vivieron hasta 24 meses en el momento en que fueron sacrificados según lo exigido por el protocolo (Figura 9).

[0078] Un beneficio obvio del tratamiento con guayacol en ratones machos es que no tuvieron prolapso peneano, una condición observada en ratones no tratados a partir de una edad tan temprana como 1 año. Aunque los ratones tratados vivieron más tiempo, tenían marcha espástica y un nivel ligeramente superior de poliglucosano en el músculo cerebral y el corazón. Aunque el tratamiento con guayacol disminuyó el contenido de PG en el hígado, esta inhibición tisular específica de la glucógeno sintasa no puede explicar el aumento de la duración de la vida y la corrección del prolapso peneano. Esto sugiere que el poliglucosano en APBD tiene otra función tóxica que fue parcialmente prevenida por el tratamiento con guayacol.

REFERENCIAS

[0079]

- Akman et al. *Pediatr. Res.* 2007. 62(4):499-504
- Akman et al. *Hum. Mol. Genet.*, agosto de 2011. 20(22):4430-39
- Akman et al. *Hum. Mol. Genet.* Septiembre de 2015. 24(23):6801-10
- Andersen, *Lab. Invest.* 1956. 5; 1; 11-20.
- Bachmanov et al. *Behav.*, 2012, 100, 498-505.). *Genet.*, 2002. 32(6):435-43
- Brideau et al. *J. Biomol. Screen*, 2003. 8(6):634-47
- Bruno et al. *Ann. Neurol.*, 1993. 33(1):88-93
- Chan et al. *Neurology*, 2004. 63(3):565-7
- Deutsch y Young, *Pediatr. Dev. Pathol.*, 2009. 12(6):475-80
- lanzano et al. *Hum. Mutat.*, 2005. 26(4):397
- Illingworth et al. *J. Biol. Chem.*, 1952. 199(2):631-40.
- Jiang et al. *J. Biol. Chem.*, 2010. 285(45):34960-71
- Klein, *Gene Reviews*, 2 de abril de 2009
- Malfatti et al. *Ann. Neurol.*, diciembre 2014, 76(6):891-8
- Marquez et al. *Vet. J.*, 2010. 183(2):222-5
- Meng et al. *Neuropathology*, 2009. 29(6):664-71
- Minassian et al. *Nat. Genet.*, 1998. 20(2):171-4
- Mochel et al. *Ann. Neurol.*, September 2012 72(3):433-441
- Nilsson et al. *Ann. Neurol.*, diciembre de 2013 74(6):914-9
- Pederson et al. *Mol. Cell. Biol.*, 2004. 24(16):7179-87
- Santra et al. *Ann Neurol.*, 2004. 56(5):662-9.
- Skurat et al. *J. Biol. Chem.*, 2002. 277(22): p. 19331-8
- Stapleton et al. *J. Biol. Chem.*, 1996. 271(2):611
- Suter et al. *J. Biol. Chem.*, 2006. 281: 32207-16
- Todaro y Green *J. Cell. Biol.* 1963. 17:299-313
- Tonin et al. *Neuromuscul. Disord.*, 1992. 2(5-6):419-22
- Turnbull et al. *PLoS Genet.*, 2011. 7(4):e1002037
- Wu et al. *Mol. Genet. Genomics*, 2001. 265(4): p. 622-35
- Zhai et al., *Gene*, 2000. 242(1-2):229-35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de guayacol para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad de almacenamiento de glucógeno en un sujeto que lo necesite, en el que dicha enfermedad se caracteriza por la acumulación de poliglucosano o acumulación anormal de glucógeno y se elige del grupo que consiste en: enfermedad de almacenamiento de glucógeno de los tipos I-IX y enfermedad de Lafora.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto es humano.
- 10 3. La composición de uso según la reivindicación 1, en la que el guayacol se administra por vía oral.
4. La composición de uso según la reivindicación 1, en la que el guayacol se administra en una dosis de aproximadamente 22,5 a 720 miligramos de guayacol por kilogramo del sujeto.
- 15 5. La composición de uso según la reivindicación 1, en la que el guayacol se administra en una dosis de aproximadamente 22,5 a 180 miligramos de guayacol por kilogramo del sujeto.
6. La composición de uso según la reivindicación 1, en la que el guayacol se administra en una dosis de aproximadamente 22,5 a 45 miligramos de guayacol por kilogramo del sujeto.
- 20 7. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad es la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo IV.
8. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que dicha enfermedad es la enfermedad con cuerpos de poliglucosano del adulto.
- 25

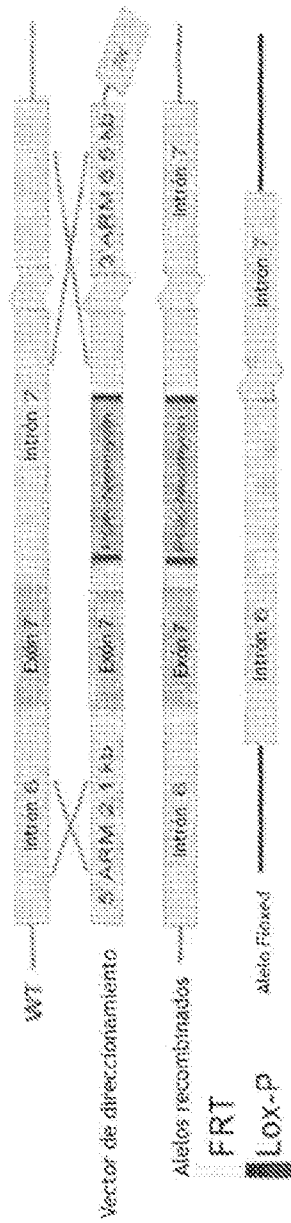


Figura 1A

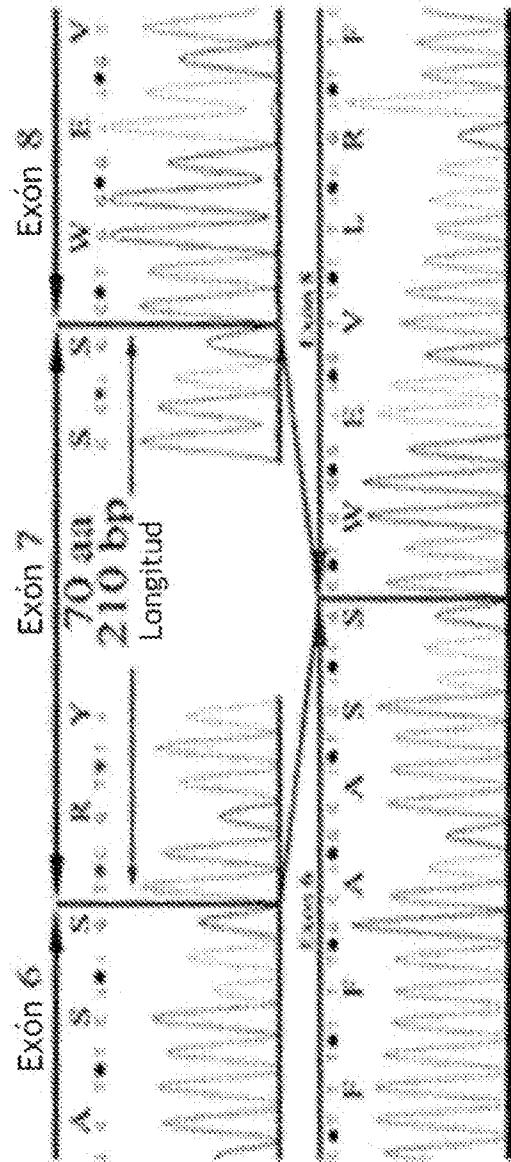


Figura 1B

Figura 2A



Figura 2B

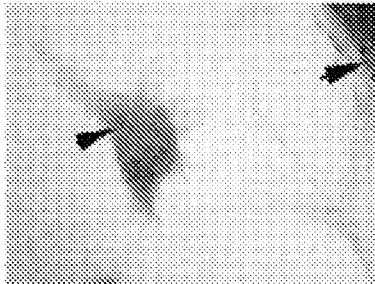


Figura 2C

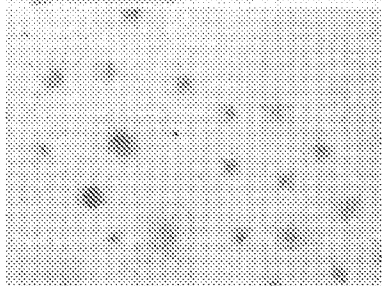


Figura 2D

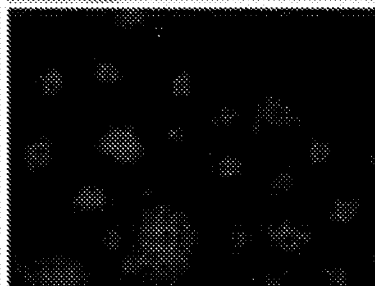


Figura 2E

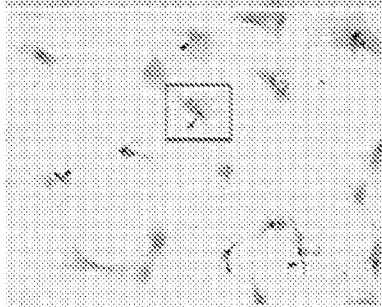


Figura 2F

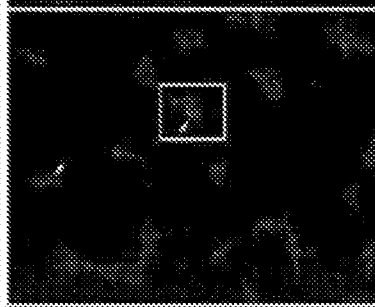


Figura 2G

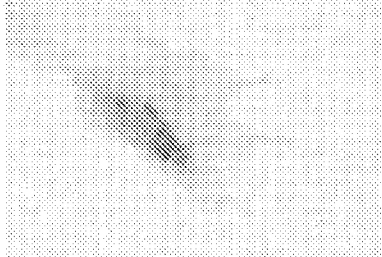
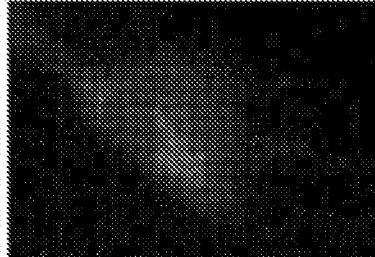


Figura 2H



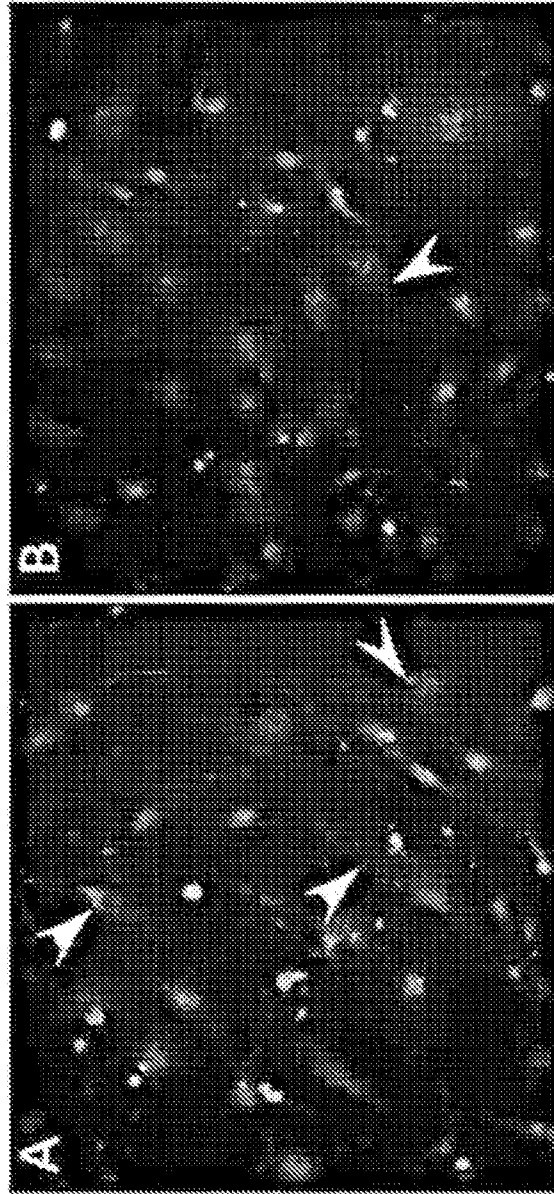


Figura 3B

Figura 3A

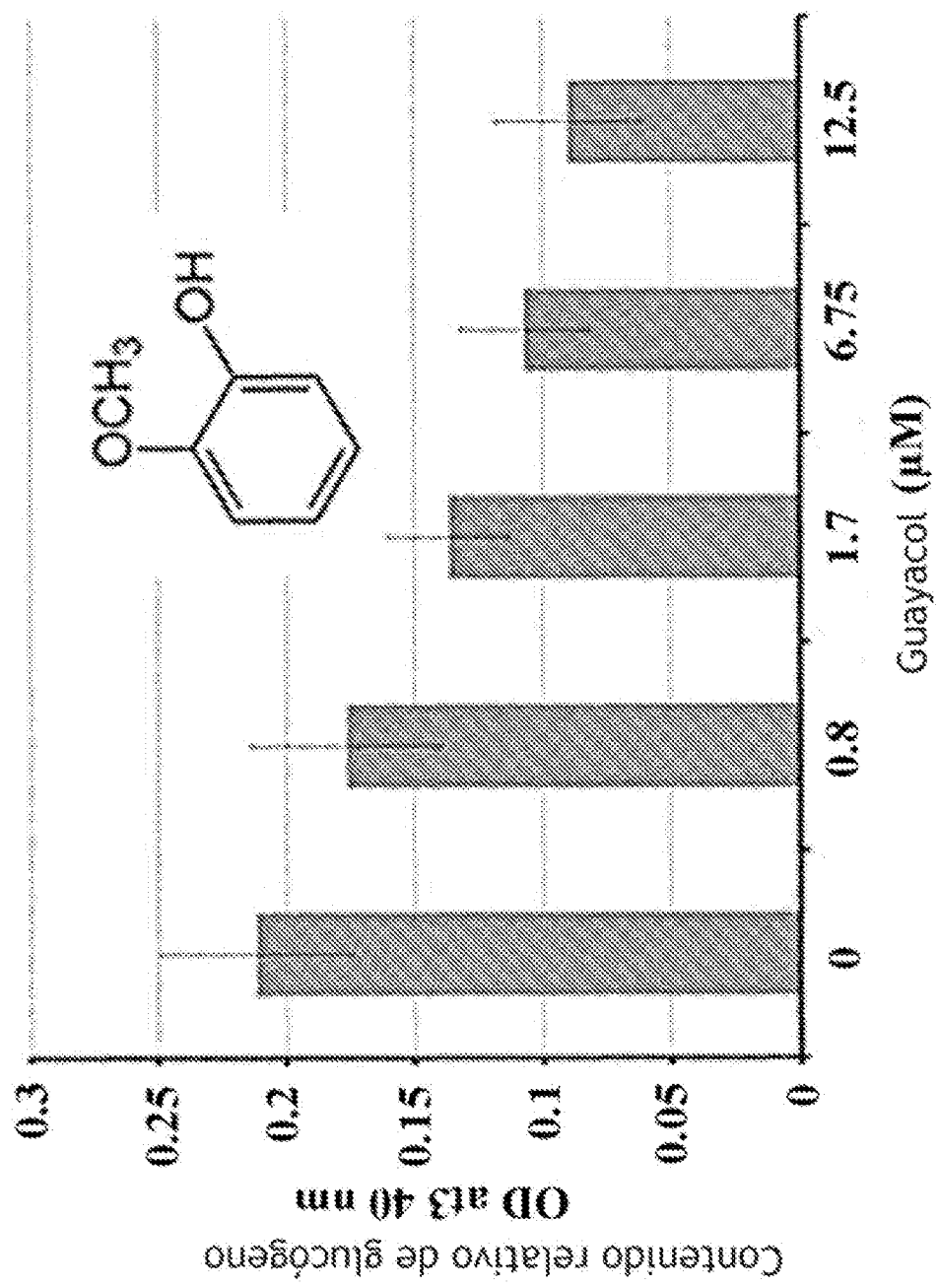


Figura 3C

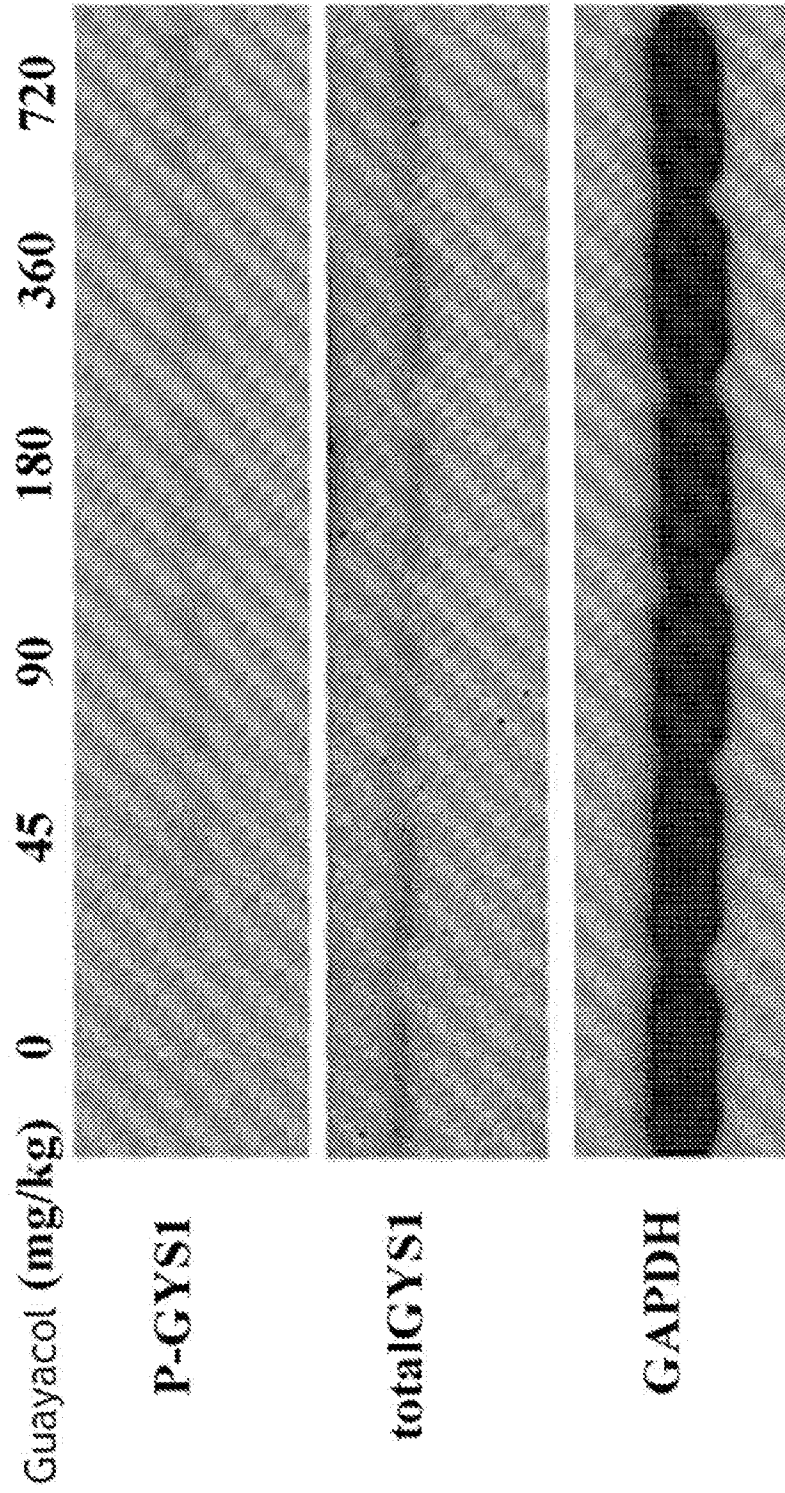


Figura 4

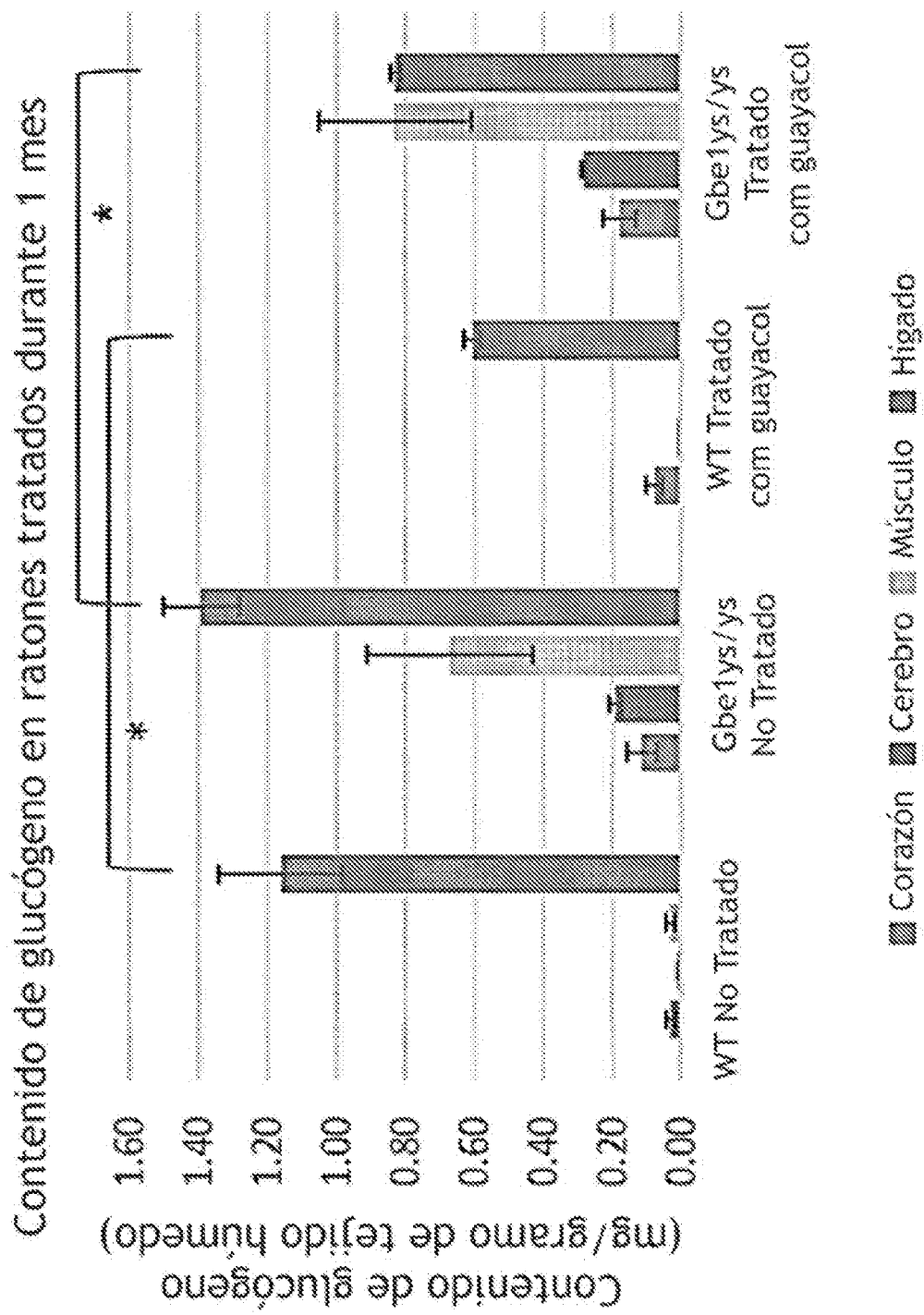


Figura 5

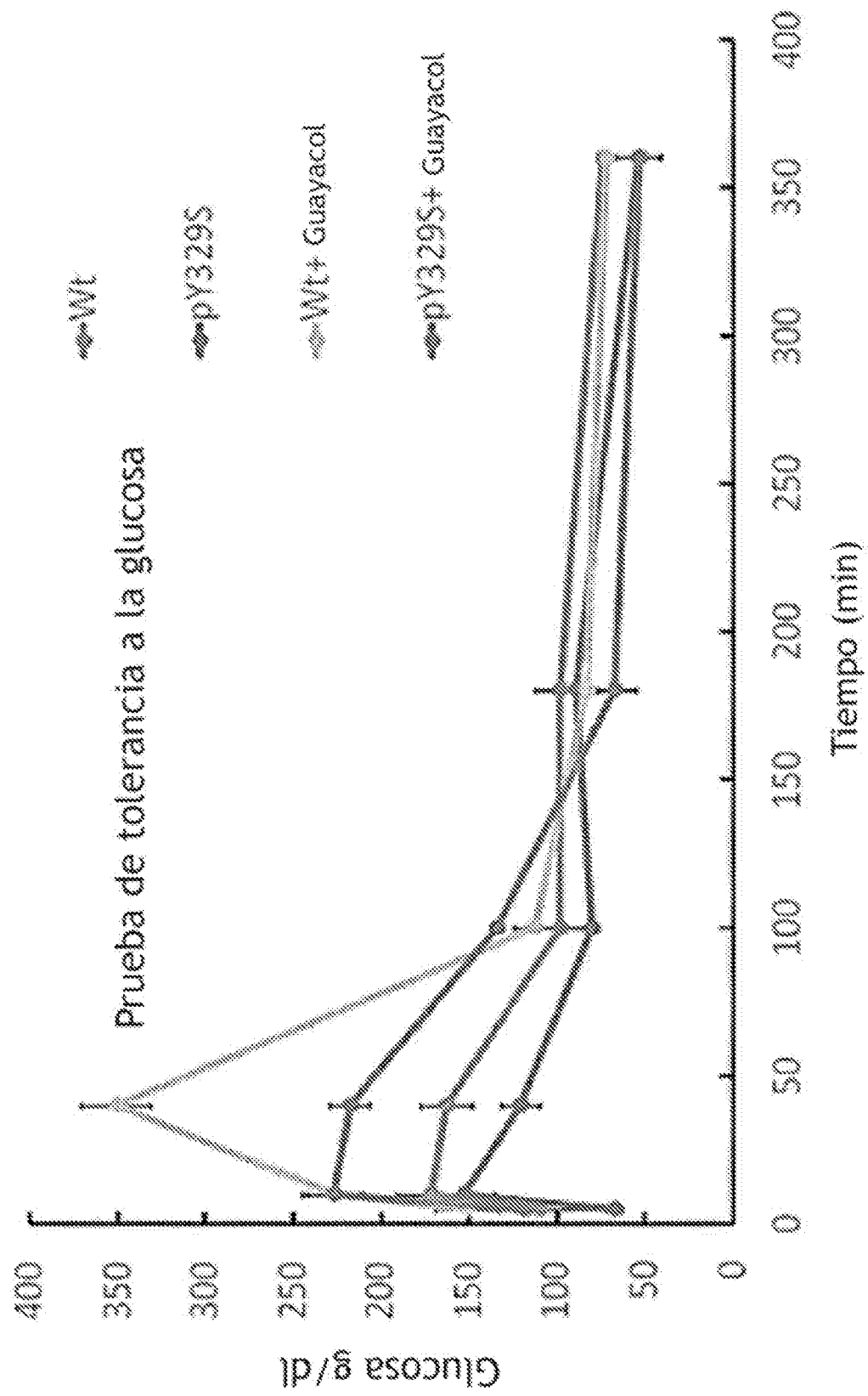


Figura 6

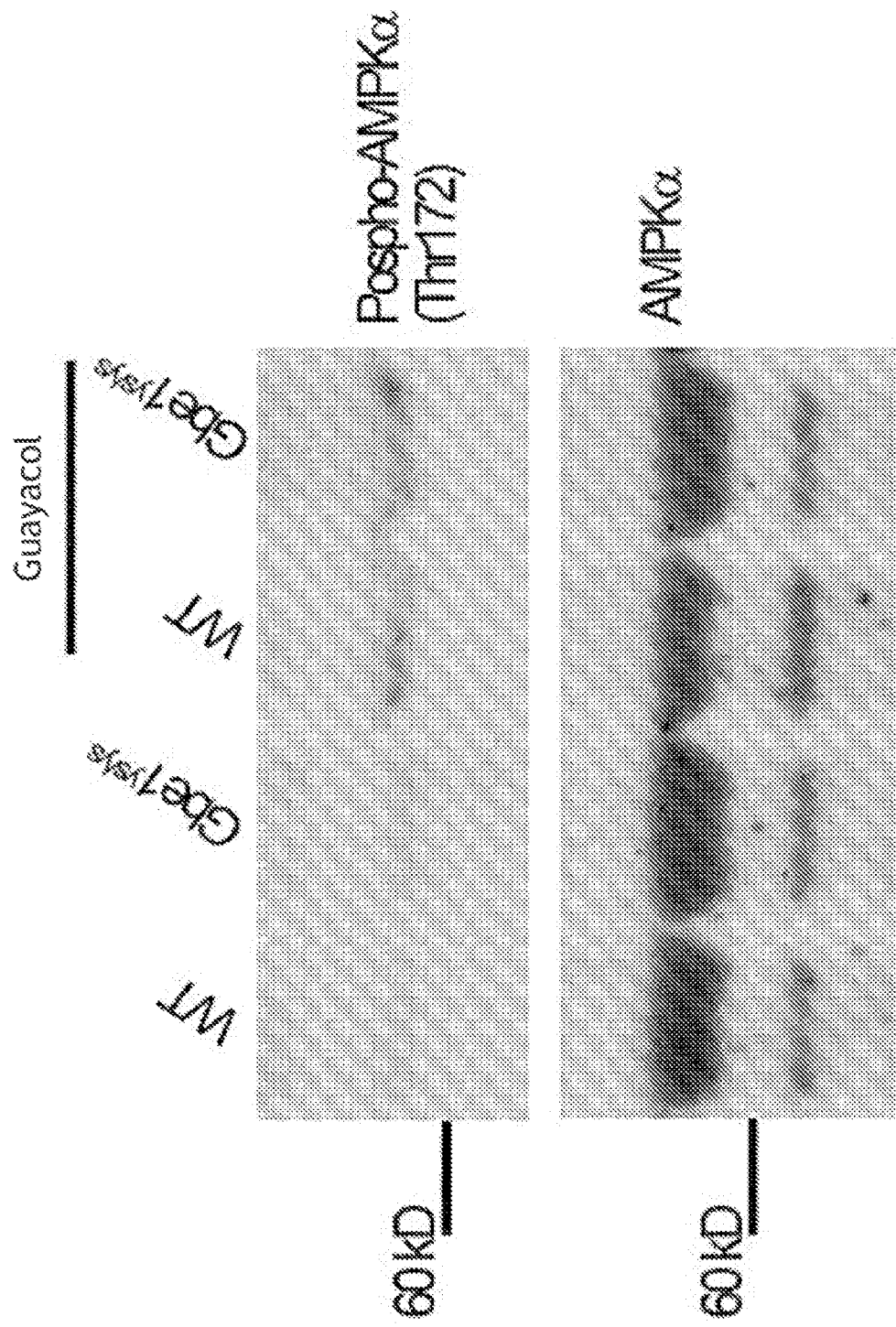


Figura 7

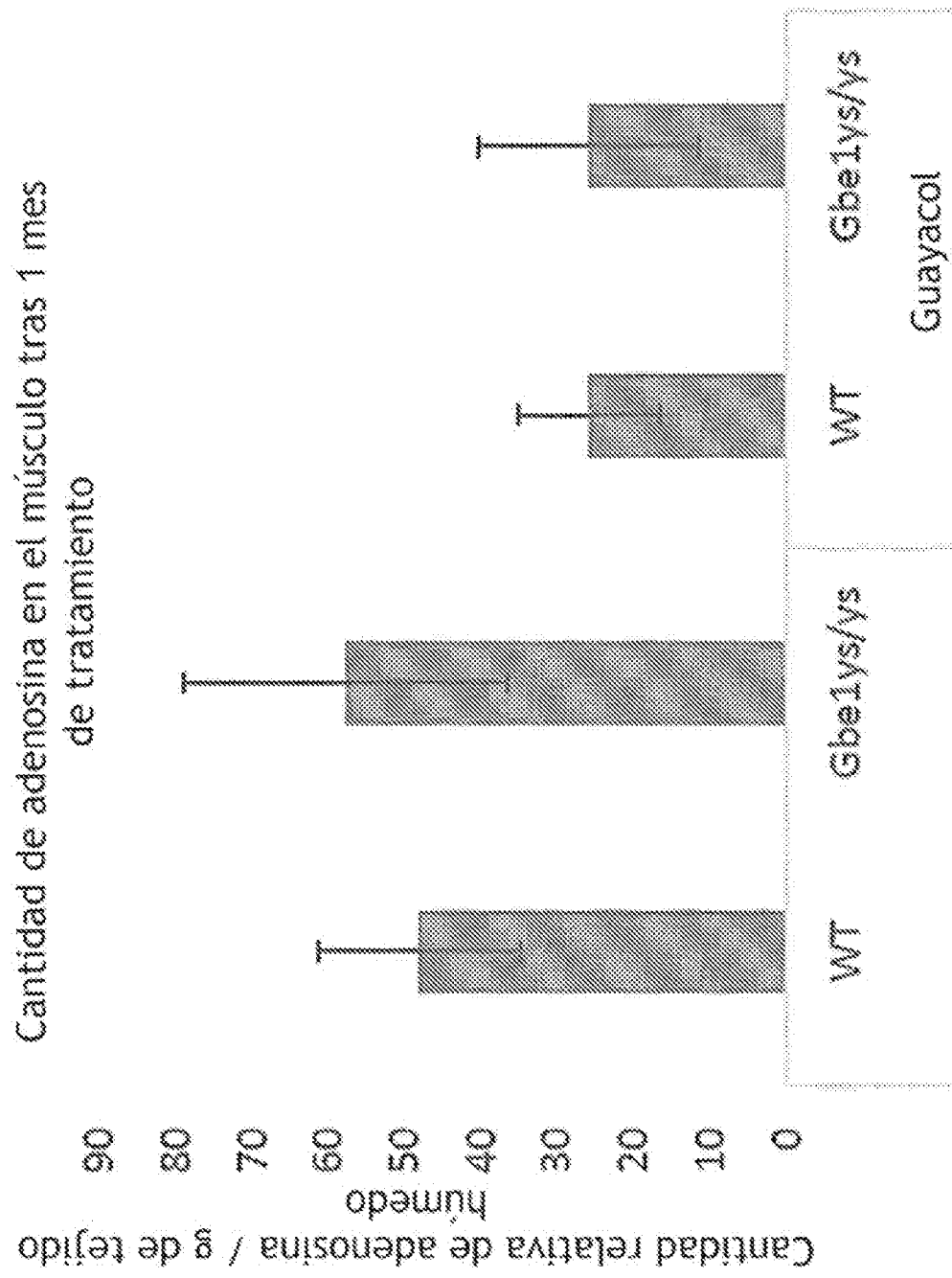


Figura 8

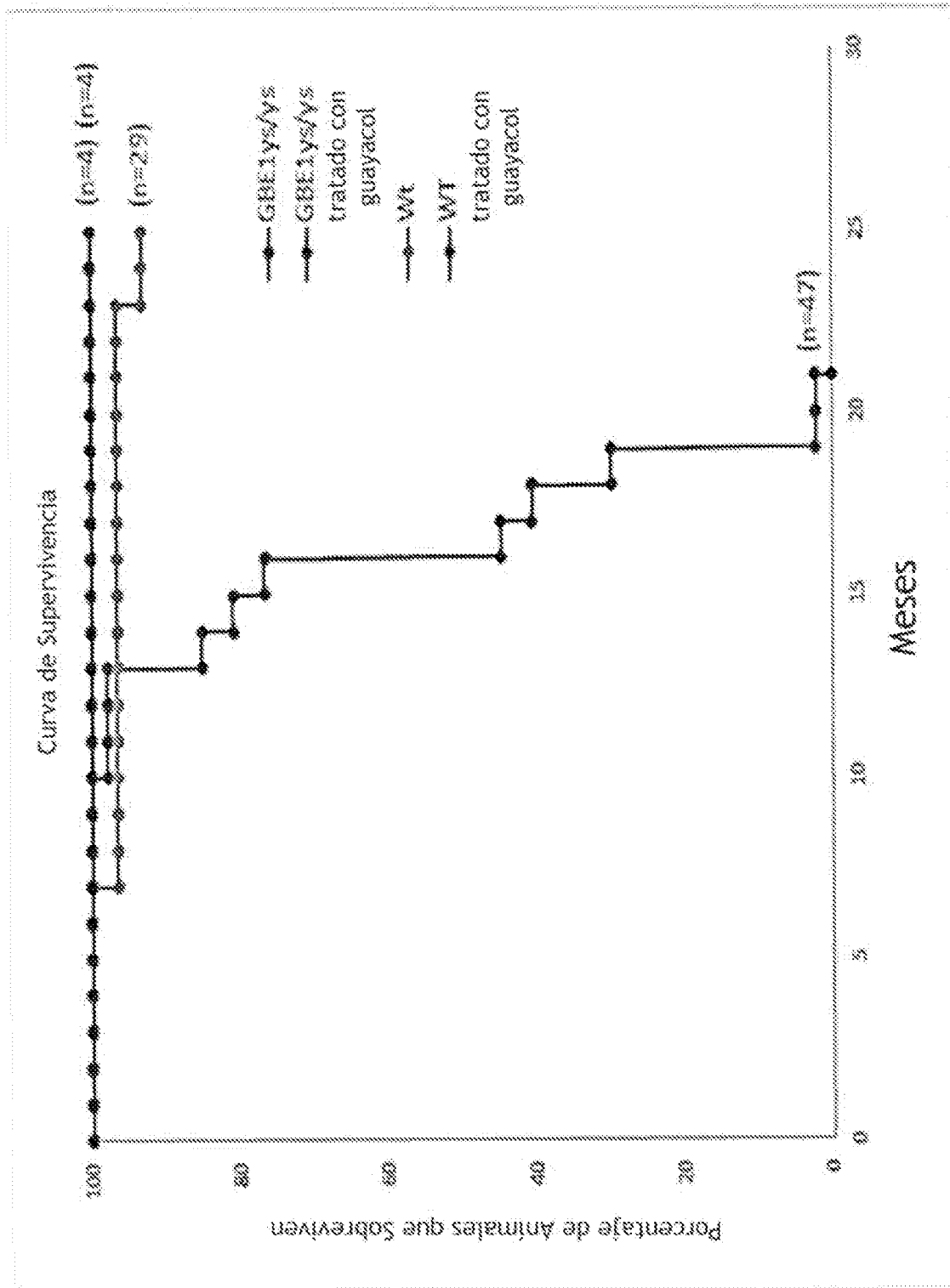


Figura 9