



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 333 561**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99925611 .8**

(96) Fecha de presentación : **28.05.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1083899**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.03.2001**

(54) Título: **Derivados de 1-desoxi-galactonojirimicina y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal potenciando la α -galactosidasa a lisosomal.**

(30) Prioridad: **01.06.1998 US 87804**

(73) Titular/es: **The Mount Sinai School of Medicine of New York University One Gustave L. Levy Place, Box 1675 New York, New York 10029, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.02.2010

(72) Inventor/es: **Fan, Jian-Qiang y Ishii, Satoshi**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.02.2010

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Derivados de 1-desoxi-galactonojirimicina y su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal potenciando la α -galactosidasa a lisosomal.

5

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a un procedimiento para potenciar la actividad de α -galactosidasa A lisosomal (α -Gal A) en células de mamífero y para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucoesfingolípidos, en particular la enfermedad de Fabry, por administración de 1-desoxi-galactonojirimicina y compuestos relacionados.

15 **2. Información sobre antecedentes**

La enfermedad de Fabry (1) es una enfermedad relacionada con el almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales provocada por una deficiencia heredada relacionada con el cromosoma X de α -galactosidasa lisosomal A (α -Gal A), una enzima responsable de la hidrólisis de un resto α -galactosilo terminal de los glucoesfingolípidos. Una deficiencia en la actividad enzimática da como resultado una deposición progresiva de los glucoesfingolípidos neutros, predominantemente globotriaosilceramida (ceramida trihexósido, CTH), en células endoteliales vasculares provocando insuficiencia renal junto con infarto de miocardio prematuro y apoplejías en pacientes con esta afección (2). Este trastorno se clasifica según las manifestaciones clínicas en dos grupos: una forma clásica con vasculopatía generalizada y una forma variante atípica, con manifestaciones clínicas limitadas al corazón. Recientemente, la variante atípica de la enfermedad se ha encontrado en un 10% de los pacientes masculinos adultos con hipertrofia ventricular izquierda sin explicación, aumentando la estimación de la frecuencia para el trastorno (3). Como otra enfermedad relacionada con el almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales, la terapia de sustitución de enzimas, terapia génica, transplante de médula ósea, y privación de sustrato se sugieren como estrategias potenciales para el tratamiento de esta enfermedad (4). Sin embargo, por el momento el único tratamiento para este trastorno es el tratamiento sintomático. Por lo tanto, el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para esta enfermedad se necesita urgentemente.

Los estudios (5) sobre la actividad de α -Gal A residual de enzimas mutantes pusieron de manifiesto que algunas de las enzimas mutantes tenían propiedades cinéticas similares respecto a α -Gal A normal pero con una inestabilidad significativa. Se considera que este es el caso para la mayoría de pacientes con variante atípica que generalmente mostraban mayor actividad de α -Gal A residual que los pacientes de Fabry clásicos. Por ejemplo (6), una α -Gal A mutante purificada con un genotipo de Q279E, encontrada en un paciente con variante atípica de la enfermedad de Fabry, tenía los mismos Km y Vmax que la enzima normal, pero perdió la mayor parte de la actividad enzimática cuando se incubó la enzima a un pH de 7,0 a 37°C durante 30 min mientras que la enzima normal era estable en estas mismas condiciones. Tanto las enzimas mutantes como las normales eran estables a pH 5,0 a 37°C. Adicionalmente, la mayor parte de la proteína enzimática mutante en las células formadas se agregó en el retículo endoplásmico (RE) y se degradó rápidamente (7), lo que sugería que la deficiencia de la actividad enzimática en este mutante puede estar provocada principalmente por la salida infructuosa del RE que conduce a una degradación excesiva de la proteína enzimática. La presente invención se centra en contribuir al escape suave de la enzima del RE para evitar la degradación de la enzima mutante. Platt F. M. et al. 1997 (Science 276, pág. 428-431) describe N-butil-desoxinojirimicina (NB-DNJ) que tiene un grupo alquilo de mayor número de carbonos, 4 en lugar de 2 como máx., y que inhibe la enzima glucosiltransferasa requerida para la síntesis de glucoesfingolípidos basados en GlcCer (GLS), mientras que los compuestos allí reivindicados inhibían las enzimas hidrolíticas que degradan los GLS en el lisosoma.

50 **Sumario de la invención**

La estrategia de la invención se basa en el siguiente modelo. La proteína enzimática mutante tiende a plegarse en una conformación incorrecta en el RE cuando el pH es de aproximadamente 7. Como resultado de esto, la enzima se retrasa respecto a la ruta de transporte normal desde el RE a través del aparato de Golgi y del endosoma al lisosoma, y en lugar de ello se somete a degradación. Por otro lado, la proteína enzimática con una conformación apropiada se transporta al lisosoma suavemente y permanece en una forma activa porque la enzima es más estable a un pH de menos de 5. Por lo tanto, un compuesto que es capaz de inducir una conformación apropiada en una enzima mutante puede servir como potenciador para la enzima. Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que los inhibidores competitivos fuertes para α -Gal A a bajas concentraciones potencian la actividad enzimática mutante en células, incluyendo células COS-1 transfectadas con el gen de α -Gal A mutante, fibroblastos de un ratón transgénico que sobreexpresa α -Gal A mutante, y linfoblastos de pacientes de Fabry.

Se observa que aunque lo anterior se cree que es el mecanismo de operación de la presente invención, el éxito de la invención no depende de que este sea el mecanismo correcto.

65

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para evitar la degradación de α -Gal A mutante en células de mamífero, particularmente en células humanas.

ES 2 333 561 T3

Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para potenciar la actividad de α -Gal A en células de mamífero, particularmente en células humanas. Los procedimientos de la presente invención potencian la actividad de α -Gal A tanto normal como mutante, particularmente de α -Gal A mutante que está presente en ciertas formas de la enfermedad de Fabry.

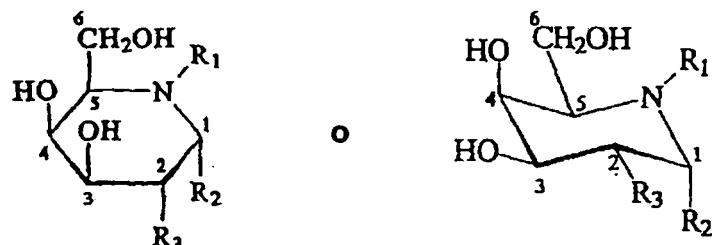
5

Además, se espera también que los procedimientos de la invención sean útiles en células que no son de mamífero, tales como, por ejemplo, células de insecto cultivadas y células CHO que se usan para la producción de α -Gal A para terapia de sustitución de enzimas.

10 Los compuestos que se espera que sean eficaces en los procedimientos de la invención son derivados de galactosa y glucosa que tienen un nitrógeno que sustituye al oxígeno del anillo, preferiblemente los derivados de galactosa tales como 1-desoxigalactonojirimicina y 3,4-diepi- α -homonojirimicina. Con derivado de galactosa quiere decirse que el grupo hidroxilo en la posición C-3 es ecuatorial y el grupo hidroxilo en la posición C-4 es axial, como se representa, por ejemplo, mediante las siguientes estructuras:

15

20



25

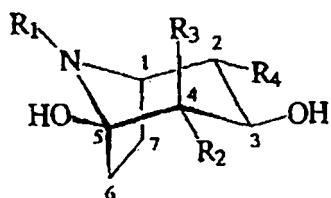
en las que R_1 representa H, metilo o etilo; R_2 y R_3 representan independientemente H, OH, un azúcar sencillo (por ejemplo, -O-galactosa), un grupo alquilo de 1-3 carbonos, alcoxi o hidroxialquilo (por ejemplo, CH_2OH).

30

Otros inhibidores competitivos específicos para α -galactosidasa, tales como por ejemplo, calistegina A₃, B₂ y B₃, y derivados de N-metilo de estos compuestos también podrían ser útiles en los procedimientos de la invención. Los compuestos de calistegina pueden representarse mediante la fórmula

35

40



45

en la que para calistegina A₃: $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = H$; para calistegina B₂: $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$; para calistegina B₃: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = OH$; para N-metil-calistegina A₃: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = H$; para N-metil-calistegina B₂: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$; y para N-metil-calistegina B₃: $R_1 = CH_3$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = OH$.

50

Otro objeto más de la invención es proporcionar un procedimiento de tratamiento para pacientes con la enfermedad de Fabry. La administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula

55

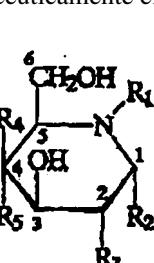
60

en la que

R_1 representa H, CH_3 o CH_3CH_2 ;

65

R_2 y R_3 representan independientemente H, OH, un grupo alquilo de 1-6 carbonos, hidroxialquilo o alcoxi (preferiblemente 1-3), o un azúcar sencillo;



R₄ y R₅ representan independientemente H o OH; o un compuesto seleccionado entre el grupo constituido por α -homonojirimicina, 3,4-diepi- α -homonojirimicina, 5-O- α -D-galactopiranosil- α -homonojirimicina, 1-desoxigalactonojirimicina, 4-*epi*-fagomina, y 1-desoxi-nojirimicina y sus derivados de N-alquilo, aliviarán los síntomas de la enfermedad de Fabry aumentando la actividad de α -Gal A mutante en pacientes que padecen la enfermedad de Fabry. Otros 5 inhibidores competitivos de α -Gal A, tales como los compuestos de calistegina y derivados de los mismos podrían ser útiles para tratar la enfermedad de Fabry.

Las personas especialistas en la técnica entenderán que una cantidad eficaz de los compuestos usados en los procedimientos de la invención puede determinarse por experimentación rutinaria, aunque se espera que sea una cantidad resultante en los niveles en suero entre 0,01 y 100 μ M, preferiblemente entre 0,01 y 10 μ M, más preferiblemente entre 0,05 y 1 μ M. Se espera que la dosis eficaz de los compuestos sea entre 0,5 y 1000 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente entre 0,5 y 100, más preferiblemente entre 1 y 50 mg/kg de peso corporal por día. Los compuestos pueden administrarse en solitario u opcionalmente junto con vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosificaciones pre-formuladas. La administración de una cantidad eficaz del compuesto dará como resultado un 15 aumento en la actividad de α -Gal A de las células de un paciente suficiente para mejorar los síntomas del paciente. Se espera que un nivel de actividad enzimática del 30% de lo normal podría mejorar significativamente los síntomas en pacientes de Fabry, porque el bajo intervalo de actividad enzimática encontrado en personas aparentemente normales es de aproximadamente el 30% del valor medio (2).

20 Los compuestos descritos en este documento y otros inhibidores competitivos para α -Gal A que conocerán los especialistas en la técnica serán útiles de acuerdo con la invención en procedimientos para potenciar la actividad intracelular de α -Gal A y tratar la enfermedad de Fabry.

Breve descripción de los dibujos

25 Figuras 1A-1C. Inhibición *in vitro* (1A) y potenciación intracelular (1B y 1C) de α -Gal A mediante compuestos alcaloides. Los compuestos alcaloides usados fueron: (2) α -Homonojirimicina, (3) 3,4-Diepi- α -homonojirimicina, (4) 5-O- α -D-Galactopiranosil- α -homonojirimicina, (5) 1-desoxigalactonojirimicina, (6) 4-*epi*-Fagomina, (7) 1-Desoxi-nojirimicina, (Gal) Galactosa. La actividad intracelular de α -Gal A en células COS-1 transfectadas por ADNc de una α -Gal A mutante (R301Q) se ensayó como se describe en los "Procedimientos". (A) El ensayo de inhibición se realizó de acuerdo con dichos Procedimientos. Las CI₅₀ de los compuestos fueron de 1,3 mM (1), 2,6 mM (2), 2,9 μ M (3), 0,62 mM (4), 4,7 nM (5), 0,25 mM (6), 0,8 mM (7), y 24 mM (Gal, galactosa), respectivamente.

30 Figuras 2A-2B. Potenciación de α -Gal A por DGJ en fibroblastos procedentes de ratones Tg (2A) y linfoblastos procedentes de pacientes de Fabry (2B).

Figura 3. Transcurso de tiempo de la potenciación de α -Gal A por DGJ en fibroblastos TgM (A) y linfoblastos (B). Los cultivos celulares se realizaron según la sección de Procedimientos. La concentración de DGJ añadido era de 20 μ M. El genotipo de los linfoblastos humanos era R301Q. ●, célula mutante cultivada sin DGJ; ○, célula mutante cultivada con DGJ; ▲, linfoblasto normal cultivado sin DGJ; Δ, linfoblasto normal cultivado con DGJ.

40 Figura 4. Dependencia de la concentración de DGJ de la potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas (A), fibroblastos TgM (B) y linfoblastos con un genotipo de R301Q (C). Las células se cultivaron a 37°C en medio F-10 de Ham (células COS-1, fibroblastos TgM) o medio RPMI-1640 complementado con FCS al 10% (linfoblastos) que contenía DGJ a una concentración variable durante 4 días. El ADNc transfectado en las células COS-1 codificó una α -Gal A mutante (R301Q).

50 Figura 5. Dependencia de la concentración de DE-HNJ de la potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas.

Figura 6. Estabilización de α -Gal A potenciado con DGJ en linfoblastos. Δ, linfoblastos R301Q cultivado sin DGJ; ▲, linfoblastos R301Q cultivados con DGJ.

55 Figura 7. Análisis por TLC del metabolismo de [¹⁴C]-CTH en fibroblastos TgN cultivados con DGJ. Los fibroblastos TgN se cultivaron a 37°C en medio F-10 de Ham-FCS al 10% que contenía DGJ a 0 (carril 1), 2 (carril 2) y 20 μ M (carril 3) durante 4 días. Despues de lavar con el medio sin DGJ, se añadió [¹⁴C]-CTH (200.000 cpm) en 2,5 ml de medio Opti-MEM (Gibco, Gaithersburg, MD EE.UU.) a las células, y se incubó durante 5 h. Las células se lavaron con 2 ml de BSA al 1% y 2 ml de PBS tres veces cada uno. Los glucolípidos neutros se extrajeron con CHCl₃:MeOH (2:1), y se purificaron por tratamiento alcalino moderado, extracción con MeOH:n-hexano (1:1) y extracción de Folch (19).

60 Figura 8A. Determinación del ARNm de α -Gal A en linfoblastos mutantes (R301Q) cultivados con DGJ. Los linfoblastos mutantes humanos (R301Q) se cultivaron con o sin DGJ 50 μ M durante 4 días. Los ARNm de α -Gal A se determinaron mediante un procedimiento de RT-PCR competitivo (15).

Figura 8B. Transferencia de Western de α -Gal A mutante (R301Q) expresado en fibroblastos TgM. El sobrenadante del homogenado celular que contenía 10 μ g de proteína se aplicó a SDS-PAGE, y se realizó la transferencia de Western con un anticuerpo anti- α -Gal A expresado en conejo.

ES 2 333 561 T3

Figura 9. Centrifugación con gradiente de densidad en Percoll con fibroblastos TgM (A), fibroblastos TgM cultivados con DGJ 20 μ M (B), y fibroblastos TgN (C). La centrifugación con gradiente de densidad en Percoll se realizó con marcadores de densidad (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) como se ha descrito previamente por Oshima *et al.* (8). p-Hexosaminidasa, una enzima marcadora lisosomal, se ensayó con 4-metilumbeliferil-p-N-acil-D-glucosamina como sustrato. Línea continua, actividad de α -Gal A; línea discontinua, actividad de β -hexosaminidasa.

Figura 10. Potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas con DGJ. Los ADNc transfectados a células COS-1 eran α -Gal A con las mutaciones en L166V, A156V, G373S y M296I. La concentración de DGJ añadida era de 20 μ M.

Figura 11. Potenciación de la actividad de α -Gal A por administración de DGJ a ratones TgM. Se pusieron soluciones de DGJ (0,05 mM o 0,5 mM) como fuentes de bebida para ratones TgM (cuatro ratones por grupo). Después de 1 semana de administración, los órganos se homogeneizaron para la determinación de la actividad enzimática. Los datos eran la resta de la actividad endógena de α -Gal A del ratón obtenidos a partir de ratones no-Tg alimentados con DGJ de la actividad de ratones TgM. Las actividades enzimáticas presentadas eran los valores medios y las desviaciones típicas eran menores del 10%.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

Las abreviaturas usadas en este documento se indican a continuación por comodidad: α -Gal A, α -galactosidasa lisosomal A humana; ratón TgN, un ratón transgénico que sobreexpresa α -galactosidasa lisosomal A humana normal; ratón TgM, un ratón transgénico que sobreexpresa una α -galactosidasa lisosomal A humana mutante con la sustitución de un solo aminoácido de Arg en la posición 301 por Gin (R301Q); fibroblasto TgN, fibroblasto generado a partir de un ratón TgN; fibroblasto TgM, fibroblasto generado a partir de un ratón TgM; DGJ, 1-desoxi-galactonojirimicina; DE-HNJ, 3,4-di-*epi*- α -homonojirimicina; pNP- α -Gal, p-nitrofenil- α -D-galactósido; 4-mU- α -Gal, 4-metilumbeliferil- α -D-galactósido; FCS, suero de ternera fetal; PBS, solución salina tamponada con fosfato; BSA, albúmina de suero bovina; TLC, cromatografía en capa fina; CTH, globotriaosilceramida o ceramida trihexósido; CDH, ceramida dihexósido; CMH, ceramida monohexósido; RE, retículo endoplásmico.

Materiales y Procedimientos

Materiales

Los compuestos alcaloides se purificaron a partir de plantas o derivados parcialmente modificados químicamente de los productos vegetales (9). Los ratones TgN y TgM se generaron como se ha informado previamente (10, 11). Los fibroblastos TgN o TgM se estabilizaron en ratón TgN o TgM de forma rutinaria. Los linfoblastos humanos eran líneas de linfoblasto transformadas por el virus Epstein-Barr a partir de un adulto normal o pacientes con la enfermedad de Fabry (6). Los ADNc de α -Gal A normal y mutante para la expresión transitoria en células COS-1 se clonaron como se informa en (12). α -Gal A para el estudio de inhibición *in vitro* de alcaloides se expresó y se purificó del medio de cultivo de células Sf-9 infectadas por un baculovirus recombinante que codificaba un gen de α -Gal A normal (13). [¹⁴C]-CTH se preparó mediante una combinación de reacciones químicas y de *N*-desacilasa de ceramida de esfingolípido (14).

Procedimientos

Cultivo celular. Las células COS-1, fibroblastos TgN y TgM se cultivaron en medio F-10 de Ham complementado con FCS al 10% y antibióticos. Los linfoblastos se cultivaron en RPMI-1640 con FCS al 10% y antibióticos. Todos los cultivos celulares se realizaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Como un modelo para fibroblastos y linfoblastos, las células (3 x 10⁵ para fibroblastos y 5 x 10⁵ para linfoblastos) se cultivaron en 10 ml del medio preferido con o sin DGJ a 20 μ M durante 4 días antes de llevarlas al ensayo para la actividad intracelular enzimática.

Expresión transitoria de α -Gal A en células COS-1. Las células COS-1 (5 x 10⁵) se transfecaron con 1 μ g de plásmido de AND y 8 μ l de Lipofectamina (Gibco, Gaithersburg, MD EE.UU.) en 1,2 ml de medio Opti-MEM (Gibco) por platillo de 60 mm. Después de incubar a 37°C durante 6 h, se añadieron 1,2 ml del mismo medio que contenía FCS al 20% y el cultivo se incubó durante una noche. Después de sustituir el medio por 2,4 ml de medio F-10 de Ham completo, se añadió un alcaloide a una concentración apropiada, y se incubó adicionalmente durante 1 día, antes de realizar el ensayo para la actividad intracelular enzimática.

Ensayo enzimático intracelular para α -Gal A. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato dos veces, las células se homogeneizaron en 200 μ l de H₂O, y 10 μ l del sobrenadante obtenido por centrifugación a 10.000 x g se incubaron a 37°C con 50 μ l de la solución de sustrato compuesta por 4-mU- α -Gal 6 mM y *N*-acetilgalactosamina 90 mM en tampón citrato 0,1 M (pH 4,5) para el ensayo enzimático. Todos los datos son las medias de mediciones por triplicado con una desviación típica menor del 10%. Una unidad de actividad enzimática se definió como un nmol de 4-metilumbeliferona liberada por hora a 37°C.

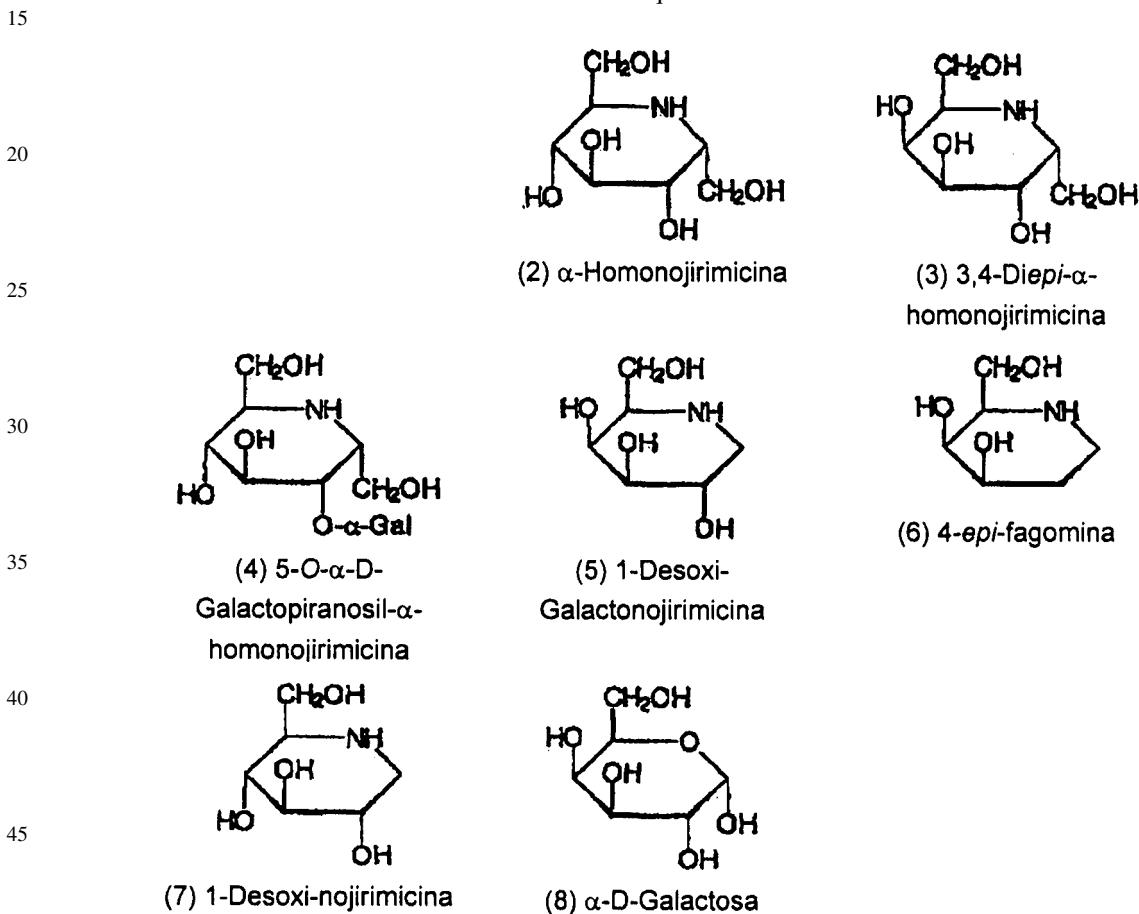
ES 2 333 561 T3

Ensayo de inhibición *in vitro* de α -GalA. La actividad enzimática se ensayó con pNP- α -Gal como sustrato. Una reacción de inhibición típica se realizó en una mezcla de 200 nmol de pNP- α -Gal, la enzima y el inhibidor apropiados en un volumen total de 120 μ l con tampón citrato 0,05 M (pH 4,5). Después de la incubación a 37°C durante 15 min, la reacción se terminó mediante la adición de 1 ml de tampón borato 0,2 M (pH 9,8), y la cantidad de pNP liberado se midió como la absorbancia a 490 nm.

Ejemplo 1

Se usó una serie de plantas alcaloides (Esquema 1, ref. 9) para estudios *in vitro* tanto de inhibición como de potenciación de la actividad de α -Gal A. Los resultados de los experimentos de inhibición se muestran en la Figura 1A.

Esquema 1



Entre los compuestos ensayados, 1-desoxi-galactonojirimicina (DGJ, 5) conocido como un potente inhibidor competitivo para α -Gal A, mostró la mayor actividad inhibidora con IC_{50} a 4,7 nM. α -3,4-Di-*epi*-homonojirimicina (3) era un inhibidor eficaz con IC_{50} a 2,9 μ M. Otros compuestos mostraban una actividad inhibidora moderada con IC_{50} que variaba de 0,25 mM (6) a 2,6 mM (2). Sorprendentemente, estos compuestos potenciaban también eficazmente la actividad de α -Gal A en células COS-1 transfectadas con un gen de α -Gal A mutante (R301Q), identificados de una variante atípica de la enfermedad de Fabry con una actividad de α -Gal A residual del 4% de lo normal. Cultivando las células COS-1 transfectadas con estos compuestos a concentraciones cat. 3-10 veces de la IC_{50} de los inhibidores, la actividad de α -Gal A se potenció 1,5-4 veces (Figura 1C). La eficacia de potenciación intracelular fue paralela a la actividad inhibidora *in vitro* cuando los compuestos se añadieron al medio de cultivo a una concentración de 10 μ M (Figura 1B).

Ejemplo 2

DGJ, el inhibidor más fuerte *in vitro* y el potenciador intracelular más eficaz, se eligieron para una caracterización más detallada. Se añadió DGJ a los fibroblastos TgM o TgN (Figura 2A) y los linfoblastos procedentes de pacientes de Fabry con genotipos de mutaciones R301Q o Q279E (Figura 2B). La actividad enzimática encontrada en fibroblastos

ES 2 333 561 T3

TgM aumentó 6 veces por cada co-cultivo con DGJ 20 μ M y alcanzó un 52% de lo normal. El DGJ mostró también un efecto similar sobre los linfoblastos en los que la actividad enzimática residual se potenció 8 y 7 veces en R301Q y Q279E, es decir, un 48% y un 45% de lo normal. La actividad enzimática en fibroblastos Tg normales (TgN) y linfoblastos normales mostró también un aumento por cultivo con DGJ.

5

Ejemplo 3

Los fibroblastos TgM y linfoblastos humanos de pacientes normales y con una mutación en R301Q se cultivaron 10 en presencia de DGJ a 20 μ M. En los cultivos sin DGJ, la actividad de α -Gal A en fibroblastos TgM o linfoblastos mutantes no cambió (Figura 3). Sin embargo, al incluir DGJ, la actividad enzimática mostró un aumento significativo en estos cultivos celulares. La actividad enzimática en linfoblastos mutantes alcanzó el 64% de aquellos encontrados 15 en linfoblastos normales cultivados sin DGJ en el quinto día. La actividad enzimática en linfoblastos normales se potenció también un 30% después del cultivo con DGJ.

15

Ejemplo 4

Se examinó la dependencia de la concentración de DGJ de la potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas, fibroblastos TgM y linfoblastos con un fenotipo de R301Q.

Como se muestra en la Figura 4, la actividad enzimática aumentó con el aumento en la concentración de DGJ en el intervalo de 0,2-20 μ M en células COS-1 transfectadas (Figura 4A) y linfoblastos (Figura 4C), y entre 0,2-200 μ M en fibroblastos TgM (Figura 4B), respectivamente. Una mayor concentración de DGJ suprimió el efecto de potenciación.

25

DE-HNJ mostró el mismo efecto sobre la potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas con un ADNc mutante de la enzima (R301Q) a las concentraciones más altas (1-1000 μ M) comparado con DGJ (Figura 5). Queda claro que DE-HNJ a 1 mM en medio de cultivo no inhibía la actividad intracelular enzimática de las células CO S -1.

30

Ejemplo 5

La Figura 6 muestra un experimento para medir la estabilización de α -Gal A potenciado con DGJ en linfoblastos. Las células se cultivaron a 37°C en 10 ml de medio RPMI-1640 complementado con FCS al 10% que contenía DGJ a 35 20 μ M durante 4 días, y 5×10^5 células se transfirieron a 13 ml de RPMI1640 con FCS al 10% sin DGJ. Dos ml del medio se tomaron cada día para el ensayo enzimático. El excedente inicial de la actividad total de α -Gal A entre el pre-cultivo con y sin DGJ se mantuvo durante 5 días después de la sustitución del medio sin DGJ (Figura 6), lo que sugería que la enzima potenciada es estable en las células durante al menos 5 días.

40

Ejemplo 6

Para estudiar el funcionamiento de la enzima potenciada en las células, se cargó [14 C]-CTH en el cultivo de fibroblastos TgN.

45

La determinación de glucolípidos se realizó por cromatografía en capa fina usando CHCl₃:MeOH:H₂O (65:25:4) como un disolvente de revelado, y se visualizó mediante un sistema de formación de imágenes Fuji-BAS (Figura 7). La cantidad de ceramida di-hexósido (CDH), un producto metabólico de CTH por α -Gal A, era comparable entre las 50 células cultivadas con DGJ 20 μ M y sin DGJ (4,5% frente a 4,3% de los glucolípidos neutros totales), indicando que la enzima intracelular no se inhibía mediante DGJ a la concentración usada.

Ejemplo 7

55

Para determinar si DGJ afecta o no a la biosíntesis de α -Gal A, el nivel de ARNm de α -Gal A en linfoblastos mutantes (R301Q) cultivados con DGJ se midió mediante un procedimiento competitivo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (15). La Figura 8A muestra claramente que el ARNm de α -Gal A no cambió con el cultivo de linfoblastos con 50 μ M de DGJ.

60

Por otro lado, el análisis por transferencia de Western indicó un aumento significativo de la proteína enzimática en fibroblastos TgM, y el aumento correspondía a la concentración de DGJ (Figura 8B). Una mayor cantidad de proteína enzimática con menor peso molecular (aprox. 46 kD) en las células cultivadas con DGJ sugería el nivel más alto de enzima madurada (16). Estos resultados indican que el efecto de DGJ sobre la potenciación de la enzima es un acontecimiento post-transcripcional.

65

ES 2 333 561 T3

Ejemplo 8

Para confirmar que la enzima potenciada se transporta al lisosoma, se realizó un fraccionamiento sub-celular con fibroblastos de ratones Tg (Figura 8). La actividad enzimática global en fibroblastos TgM era menor y se eluyó con un marcador de densidad de 1,042 g/ml que contenía fracciones del aparato de Golgi (20) (Figura 9A).

- 5 Por cultivo con DGJ 20 μ M, la actividad enzimática en fibroblastos TgM mostró una mayor actividad enzimática global y la mayor parte de la enzima eluyó con la misma fracción de una enzima marcadora lisosomal, p-hexosaminidasa (Figura 9B). El patrón de elución de la actividad de α -Gal A en TgM cambió también respecto a los encontrados en fibroblastos TgN (Figura 9C).

10

Ejemplo 9

Los genotipos de R301Q y Q279E se encontraron a partir de pacientes con la enfermedad de Fabry de tipo atípico.

- 15 La eficacia de DGJ sobre la potenciación de la actividad de α -Gal A se examinó con otros genotipos y fenotipos de la enfermedad de Fabry. En este experimento, se usaron tres ADNc de α -Gal A mutante, L166V, A156V y G373S encontrados en pacientes con la enfermedad de Fabry de tipo clásico y una mutación de M296I encontrada en pacientes con la forma atípica de la enfermedad. La Figura 10 muestra que la inclusión de DGJ aumentaba la actividad enzimática en los cuatro genotipos ensayados, especialmente para L166V (aumento de 7 veces) y A156V (aumento de 5 veces).
- 20 Los datos indicaban que este procedimiento es útil no solo para la forma atípica, sino también para la forma clásica de la enfermedad.

20

Ejemplo 10

25

Se administró DGJ a ratones Tg por suministro de soluciones 0,05 o 0,5 mM de DGJ como una fuente de bebida durante una semana correspondiente a la dosificación de DGJ a aproximadamente 3 o 30 mg por kilogramo de peso corporal por día. La actividad enzimática se elevó 4,8 y 18 veces en el corazón, 2,0 y 3,4 veces en el riñón, 3,1 y 9,5 veces en el bazo y 1,7 y 2,4 veces en el hígado, respectivamente (Figura 11). El aumento de la actividad enzimática en los órganos respondía al aumento de la dosificación de DGJ. Como el gen mutante (R301Q) se encontró en pacientes de Fabry con el tipo de la variante atípica que tenían síntomas clínicos limitados al corazón, el hecho de que la administración oral de DGJ potenciara específicamente la actividad de α -Gal A en el corazón de ratón TgM es particularmente significativo.

35

Análisis

Se sabe que el RE posee un sistema de control de calidad eficaz para asegurar que el transporte al complejo de Golgi se limita a proteínas plegadas y ensambladas apropiadamente, y el procedimiento principal del control de calidad lo ejecutan diversos chaperones (17). Una explicación de los resultados presentados en la presente solicitud es la siguiente: en algunos fenotipos de la enfermedad de Fabry, la mutación provoca un plegado imperfecto, aunque flexible, de la enzima, mientras que el centro catalítico permanece intacto. Los inhibidores normalmente tienen una alta afinidad con el centro catalítico de la enzima, y la presencia del inhibidor fija el centro catalítico de la enzima y reduce la flexibilidad del plegado, conduciendo quizás a la conformación "apropiada" de la enzima. Como resultado, la enzima podría pasar a través del "sistema de control de calidad", y transportarse al complejo de Golgi para alcanzar la maduración. Una vez que la enzima se transporta al lisosoma donde el pH es ácido, la enzima tiende a ser estable con la misma conformación, porque la enzima es estable en condiciones ácidas (6). En dichos casos, el inhibidor actúa como un chaperón para forzar a la enzima a asumir la conformación apropiada. Se propone el uso de un "chaperón químico" como un término para dicho compuesto químico de bajo peso molecular con dichas funciones.

50

Es crucial para el funcionamiento de la enzima que pueda tener lugar la disociación suave del compuesto desde el centro catalítico de la enzima en el lisosoma. Como los compuestos usados en este estudio son inhibidores competitivos, la disociación de los inhibidores depende de dos factores: i) la concentración del inhibidor, y ii) el pH. Dale *et al.* (18) han de mostrado que la unión de 1-desoxinojirimicina a α -glucosidasa es dependiente del pH, uniéndose el inhibidor a la enzima 80 veces más fuertemente a pH 6,5 comparado con un pH de 4,5, lo que sugiere que los derivados de nojirimicina funcionan como una forma no protonada. Esto puede explicar los resultados sobre el funcionamiento de α -Gal A en las células mostrados en la Figura 7, porque el inhibidor puede unirse a la enzima en un estado neutro, y liberarse de la enzima en el estado ácido en el que DGJ tiende a estar protonado.

55

Los resultados descritos en este documento demuestran que DGJ puede potenciar eficazmente las actividades de α -Gal A mutante en linfoblastos de pacientes con variante atípica de la enfermedad de Fabry con genotipos de R301Q y Q279E. La eficacia de DGJ sobre otros fenotipos de mutación de Fabry, incluyendo las formas clásica y atípica, se ha examinado también. DGJ potenciaba eficazmente la actividad enzimática en los tres genotipos de cepas celulares obtenidos de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Fabry atípica, y algunas de las cepas celulares con formas clásicas de Fabry que tienen alta actividad enzimática residual. De acuerdo con la presente invención, una estrategia de administración de un inhibidor de α -Gal A debería resultar ser un tratamiento eficaz para los pacientes de Fabry cuya mutación ocurre en un sitio distinto del centro catalítico, y también debería ser útil para otras enfermedades relacionadas con el almacenamiento de glucoesfingolípidos.

ES 2 333 561 T3

Las referencias citadas en este documento se incorporan al mismo por referencia y se listan a continuación por conveniencia:

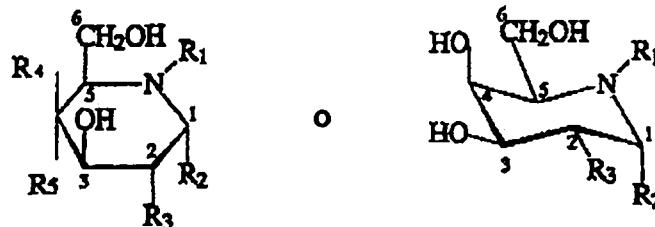
1. R. O. **Brady**, A. E. **Gal**, R. M. **Bradley**, E. **Martensson**, A. L. **Warshaw**, y L. **Laster**, *N. Engl. J. Med.* 276, 1163 (1967).
2. R. J. **Desnick**, Y. A. **Ioannou**, y C. M. **Eng**, en *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, eds. C. R. Scriver, A. L Beaudet, W. S. Sly, y D. Valle (*McGraw-Hill*, Nueva York), pág. 2741 (1995).
3. S. **Nakao**, T. **Takenaka**, M. **Maeda**, C. **Kodama**, A. **Tanaka**, M. **Tahara**, A. **Yoshida**, M. **Kuriyama**, H. **Hayashibe**, H. **Sakuraba**, y H. **Tanaka**, *N. Engl. J. Med.* 333, 288 (1995).
4. E. **Beutler**, *Science* 256, 794 (1992); F. M. **Platt**, G. R. **Neises**, G. **Reikensmeier**, M. J. **Townsend**, V. H. **Perry**, R. L **Proia**, B. **Winchester**, R. A. **Dwek**, y T. D. **Butters**, *Science* 276, 428 (1997).
5. G. **Romeo**, M. **D'Urso**, A. **Pisacane**, E. **Blum**, A. de **Falco**, y A. **Ruffilli**, *Biochem. Genet.* 13, 615 (1975); D. F. **Bishop**, G. A. **Grabowski**, y R. J. **Desnick**, *Am. J. Hum. Genet* 33, 71A (1981).
6. S. **Ishii**, R. **Kase**, H. **Sakuraba**, e Y. **Suzuki**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 197, 1585 (1993).
7. S. **Ishii**, R. **Kase**, T. **Okumiya**, H. **Sakuraba**, e Y. **Suzuki**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220, 812 (1996).
8. A. **Oshima**, K. **Yoshida**, K. **Itoh**, R. **Kase**, H. **Sakuraba**, e Y. **Suzuki**, *Hum Genet* 93, 109 (1994).
9. N. **Asano**, K. **Oseki**, H. **Kizu**, y K. **Matsui**, *J. Med. Chem.* 37, 3701 (1994); N. **Asano**, M. **Nishiba**, H. **Kizu**, K. **Matsui**, A. A. **Watson**, y R. J. **Nash**, *J. Nat. Prod.* 60, 98 (1997).
10. M. **Shimmoto**, R. **Kase**, K. **Itoh**, K. **Utsumi**, S. **Ishii**, C. **Taya**, H. **Yonekawa**, y H. **Sakuraba**, *FEBS Lett* 417, 89 (1997).
11. S. **Ishii**, R. **Kase**, H. **Sakuraba**, C. **Taya**, H. **Yonekawa**, T. **Okumiya**, Y. **Matsuda**, K. **Mannen**, M. **Tekeshita**, e Y. **Suzuki**, *Glycoconjugates J.* in press (1998).
12. T. **Okumiya**, S. **Ishii**, T. **Takenaka**, R. **Kase**, S. **Kamei**, H. **Sakuraba**, e Y. **Suzuki**, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 214, 1219 (1995)
13. S. **Ishii**, R. **Kase**, H. **Sakuraba**, S. **Fujita**, M. **Sugimoto**, K. **Tomita**, T. **Semba**, e Y. **Suzuki**, *Biochim. Biophys. Acta* 1204, 265 (1994).
14. S. **Neuenhofer**, G. **Schwarzmann**, H. **Egge**, y K. **Sandhoff**, *Biochemistry* 24, 525 (1985); S. **Mitsutake**, K. **Kita**, N. **Okino**, y M. **Ito**, *Anal. Biochem.* 247, 52 (1997).
15. G. **Gilliland**, S. **Perrin**, K. **Blanchard**, y H. F. **Bunn**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2725 (1990); TaKaRa Bio Catalog Vol. 1, D-59(1997).
16. P. **Lemansky**, D. F. **Bishop**, R. J. **Desnick**, A. **Hasilik**, K. **Von Figura**, *J. Biol. Chem.* 262, 2062 (1987).
17. S. M. **Hurtley**, y A. **Helenius**, *Annual Rev. Cell Biol.* 5, 277 (1989).
18. M. P. **Dale**, H. E. **Ensley**, K. **Kern**, K. A. R. **Sastray** y L. D. **Byers**, *Biochemistry* 24, 3530 (1985).
19. **Folch** et al. *J. Biol. Chem.* 226:497 (1957).
20. **Fleisher**, S. y M. **Kervina**, *Methods in Enzymology* 31, 6 (1974).

Se apreciará que pueden hacerse diversas modificaciones en la invención como se ha descrito anteriormente sin alejarse del alcance y propósito de la invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad eficaz de un compuesto de la siguiente fórmula:

5



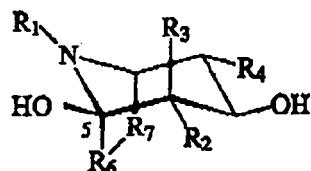
10

en la que R_1 representa H, CH_3 , o CH_2CH_3

20 R_2 y R_3 representan independientemente H, OH, un alquilo de 1-6 carbonos, hidroxialquilo, alcoxi, o un azúcar sencillo; y

R_4 y R_5 representan independientemente H o OH; o

25



30

35 en la que para calistegina A₃: $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = H$;

para calistegina B₂: $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$;

40

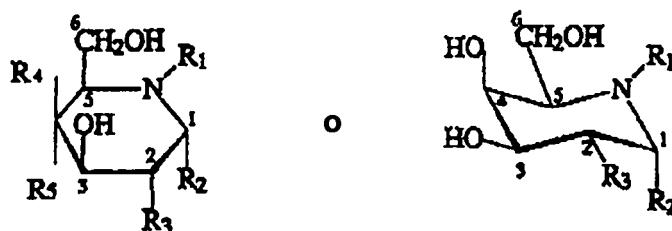
para calistegina B₃: $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = OH$; y

para N-metil-calistegina: $R_1 = CH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$, $R_4 = OH$;

45 en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad del almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales, en el que el compuesto es un inhibidor de una enzima que es deficiente en la enfermedad del almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales.

2. Un compuesto de la siguiente fórmula:

50



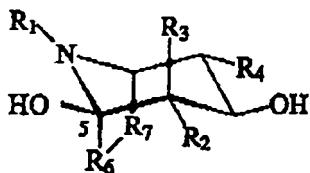
55

60 en la que R_1 representa H, CH_3 , o CH_2CH_3 ;

65 R_2 y R_3 representan independientemente H, OH, un alquilo de 1-6 carbonos, hidroxialquilo, alcoxi, o un azúcar sencillo; y

ES 2 333 561 T3

R₄ y R₅ representan independientemente H o OH; o



en la que para calistegina A₃: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = H;

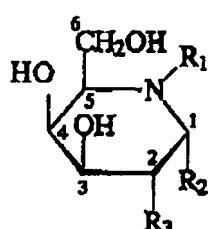
para calistegina B₂: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH;

15 para calistegina B₃: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = OH; y

para N-metil-calistegina: R₁ = CH₃, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH;

20 para su uso en el tratamiento de una enfermedad del almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales, en el que el compuesto es un inhibidor de una enzima que es deficiente en la enfermedad del almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales.

25 3. El uso de la reivindicación 1 o el compuesto de la reivindicación 2, en el que el compuesto tiene la siguiente fórmula:



en la que R₁ representa H, CH₃, o CH₂CH₃; y

40 R₂ y R₃ representan independientemente H, OH, un grupo alquilo de 1-3 carbonos, alcoxilo, O-galactosa, o hidroxialquilo.

45 4. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 1-3, en el que la enzima deficiente es α-galactosidasa A.

50 5. El uso o el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad del almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Fabry.

6. El uso o el compuesto de la reivindicación 5, en el que la enfermedad es la enfermedad de Fabry atípica.

55 7. El uso o el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto se selecciona entre el grupo constituido por 3,4-diepi-a-homonojirimicina; 5-O-a-D-galactopiranósil-a-homonojirimicina; 1-desoxigalactonojirimicina; y 4-*epi*-fagomina.

8. El uso o el compuesto de la reivindicación 6, en el que el compuesto es 1-desoxigalactonojirimicina.

55 9. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 1-3, en el que la enzima lisosomal está mutada y se pliega en una conformación incorrecta en el retículo endoplásmico.

10. El uso o el compuesto de la reivindicación 8, en el que la enzima lisosomal es α-galactosidasa A.

60 11. El uso o el compuesto de la reivindicación 9, en el que la α-galactosidasa lisosomal mutante está seleccionada entre el grupo constituido por R301Q, Q279E, L166V, A156V, y G373S.

12. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 1-3, en el que la enzima lisosomal está estabilizada.

65 13. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 1-3 en el que se evita que se degrade la enzima lisosomal.

14. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 1-4, en el que la actividad de la enzima deficiente está potenciada.

ES 2 333 561 T3

15. El uso o el compuesto de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales da como resultado la deposición de glucoesfingolípidos neutros en las células endoteliales vasculares de un sujeto, y en el que el medicamento evita la deposición de dichos glucoesfingolípidos.

5 16. El uso o el compuesto de la reivindicación 15 en el que el compuesto está seleccionado entre el grupo constituido por 3,4-diepi-a-homonojirimicina; 5-O-a-D-galactopiranósil-a-homonojirimicina; 1-desoxigalactonojirimicina; y 4-*epi*-fagomina.

10 17. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 15 o 16, en el que el compuesto es 1-desoxigalactonojirimicina.

18. El uso o el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 15-17 en el que el sujeto ha sido diagnosticado con una enfermedad relacionada con glucoesfingolípidos lisosomales.

15 19. El uso o el compuesto de la reivindicación 18, en el que la enfermedad del almacenamiento lisosomal es la enfermedad de Fabry.

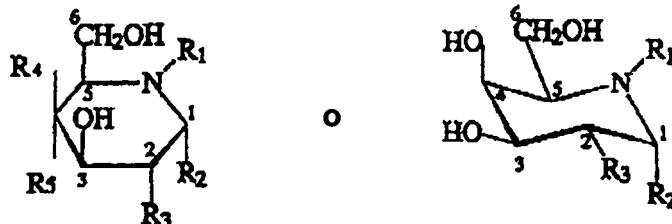
20 20. El uso o el compuesto de las reivindicaciones 15-19 en el que los glucoesfingolípidos son predominantemente ceramida trihexósido.

21. El uso o el compuesto de la reivindicación 20, en el que el medicamento evita adicionalmente la insuficiencia renal asociada con la con deposición de glucoesfingolípidos neutros en las células endoteliales vasculares.

25 22. El uso o el compuesto de la reivindicación 20, en el que el medicamento evita adicionalmente infartos de miocardio prematuros y apoplejías asociados con la deposición de glucoesfingolípidos neutros en las células endoteliales vasculares de un sujeto.

23. Un procedimiento para potenciar la actividad de una enzima lisosomal *in vitro* en una celda de mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula:

30



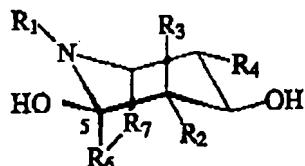
40

en la que R₁ representa H, CH₃, o CH₂CH₃; y

45 R₂ y R₃ representan independientemente H, OH, un alquilo de 1-6 carbonos, hidroxialquilo, alcoxilo o un azúcar sencillo; y

R₄ y R₅ representan independientemente H o OH; o

50



55

60 en la que para calistegina A₃: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = H;

para calistegina B₂: R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH;

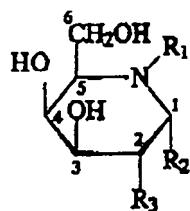
para calistegina B₃: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = OH, R₄ = OH; y

65 para N-metil-calistegina: R₁ = CH₃, R₂ = OH, R₃ = H, R₄ = OH.

ES 2 333 561 T3

24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que el compuesto tiene la siguiente fórmula:

5



10

en la que R₁ representa H, CH₃, o CH₂CH₃; y

15 R₂ y R₃ representan independientemente H, OH, un grupo alquilo de 1-3 carbonos, alcoxilo, O-galactosa, o hidro-xialquilo.

25. El procedimiento de las reivindicaciones 23 o 24, en el que la enzima lisosomal es α -galactosidasa A.

20 26. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 23-25, en el que el compuesto está seleccionado entre el grupo constituido por 3,4-diepi- α -homonojirimicina; 5-O- α -D-galactopiranosil- α -homonojirimicina; 1-desoxigalac-tonojirimicina; y 4-*epi*-fagomina.

25 27. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 25-28, en el que el compuesto es 1-desoxigalactonoji-rimicina.

28. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, en el que las células se han transfectado con un plásmido que contiene un gen que codifica la enzima lisosomal.

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1A

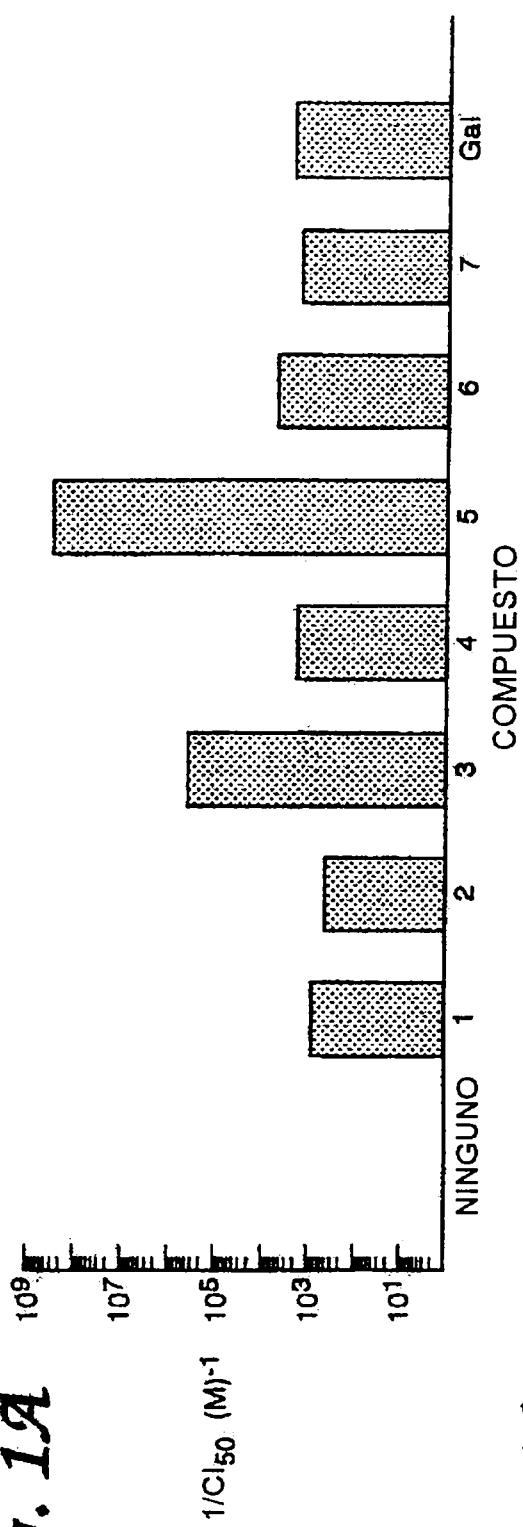
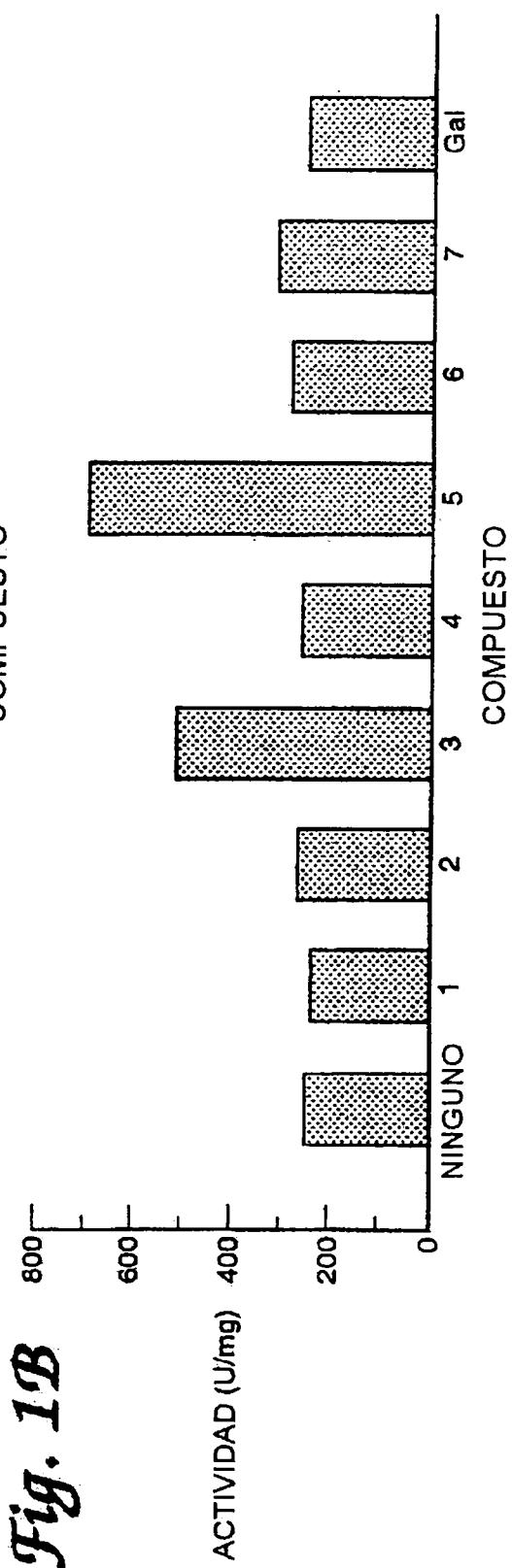


Fig. 1B



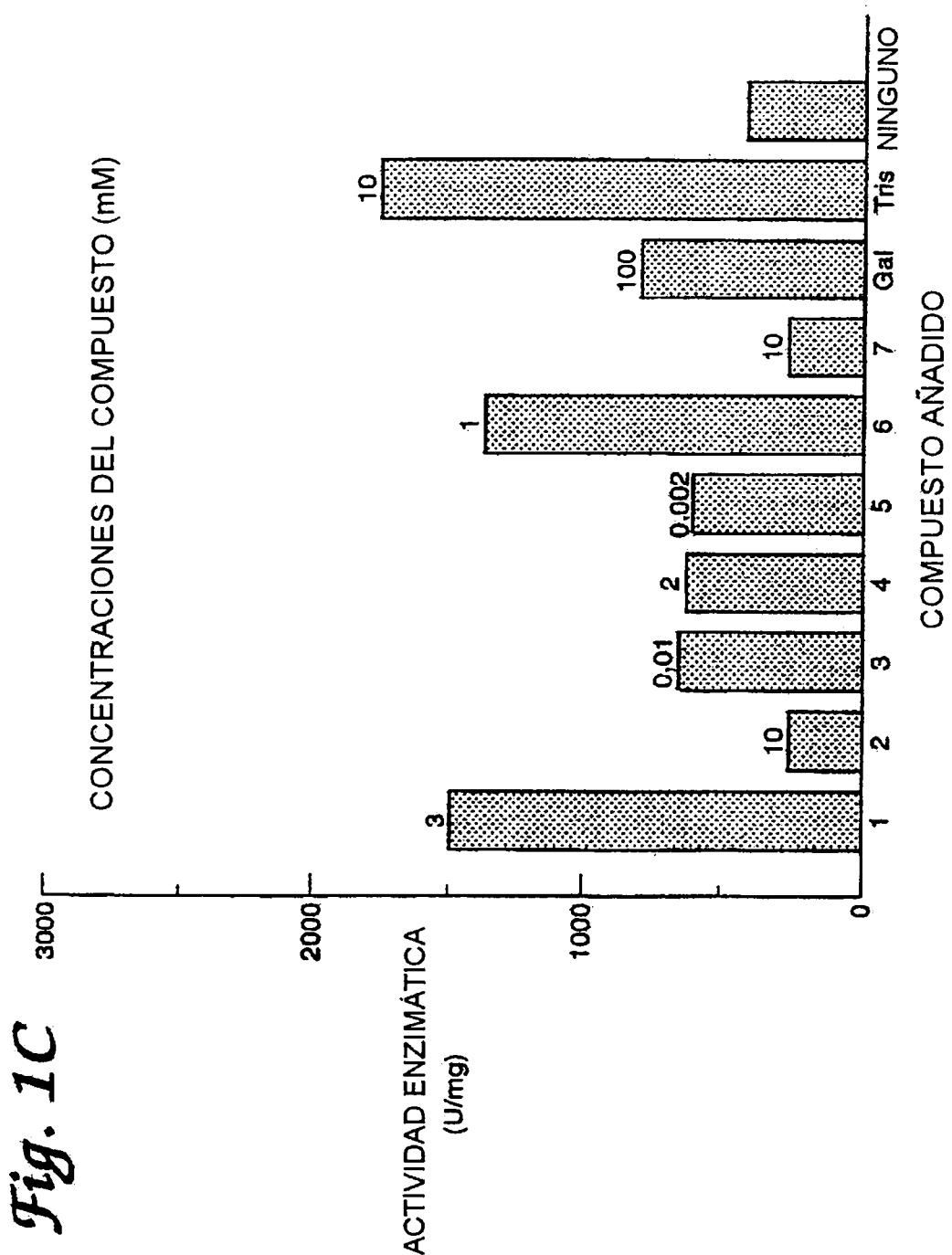


Fig. 2A

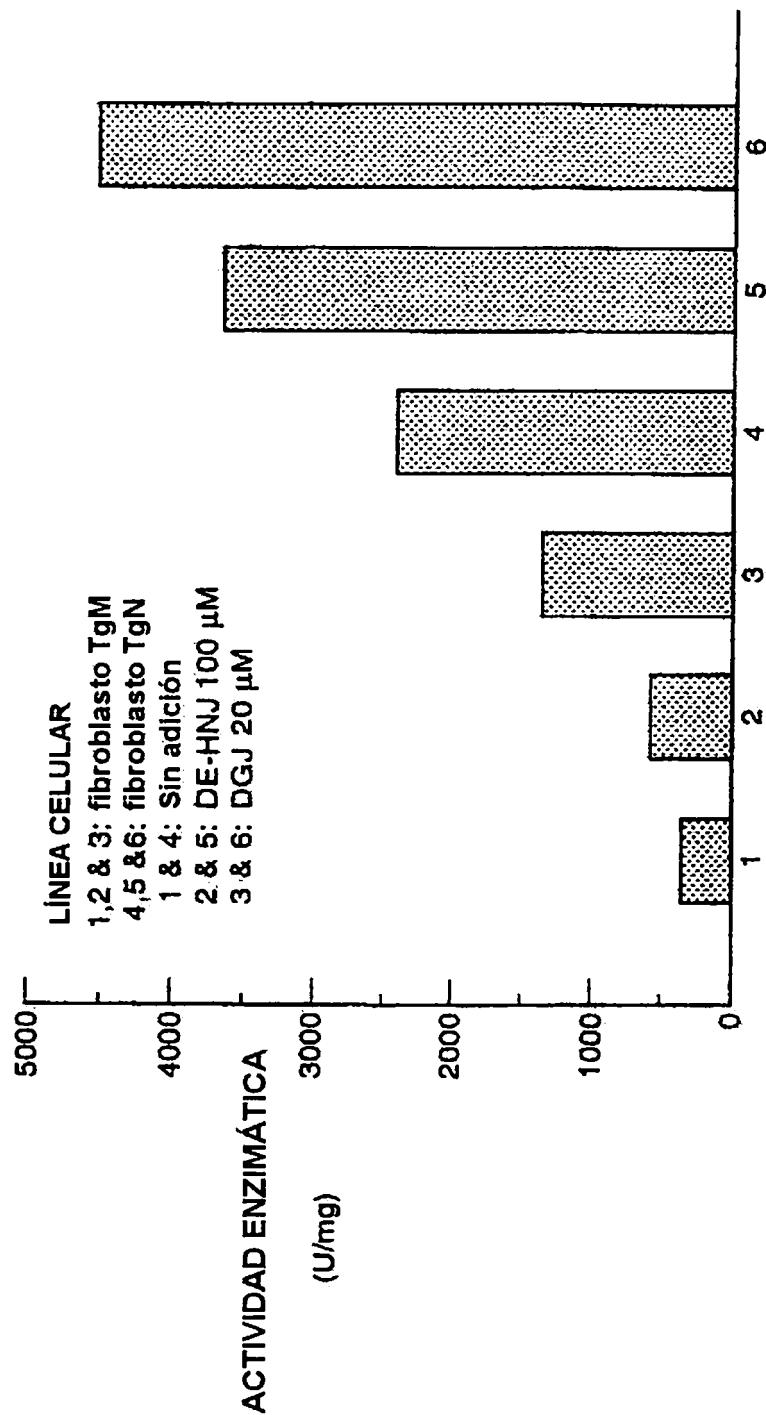


Fig. 2B

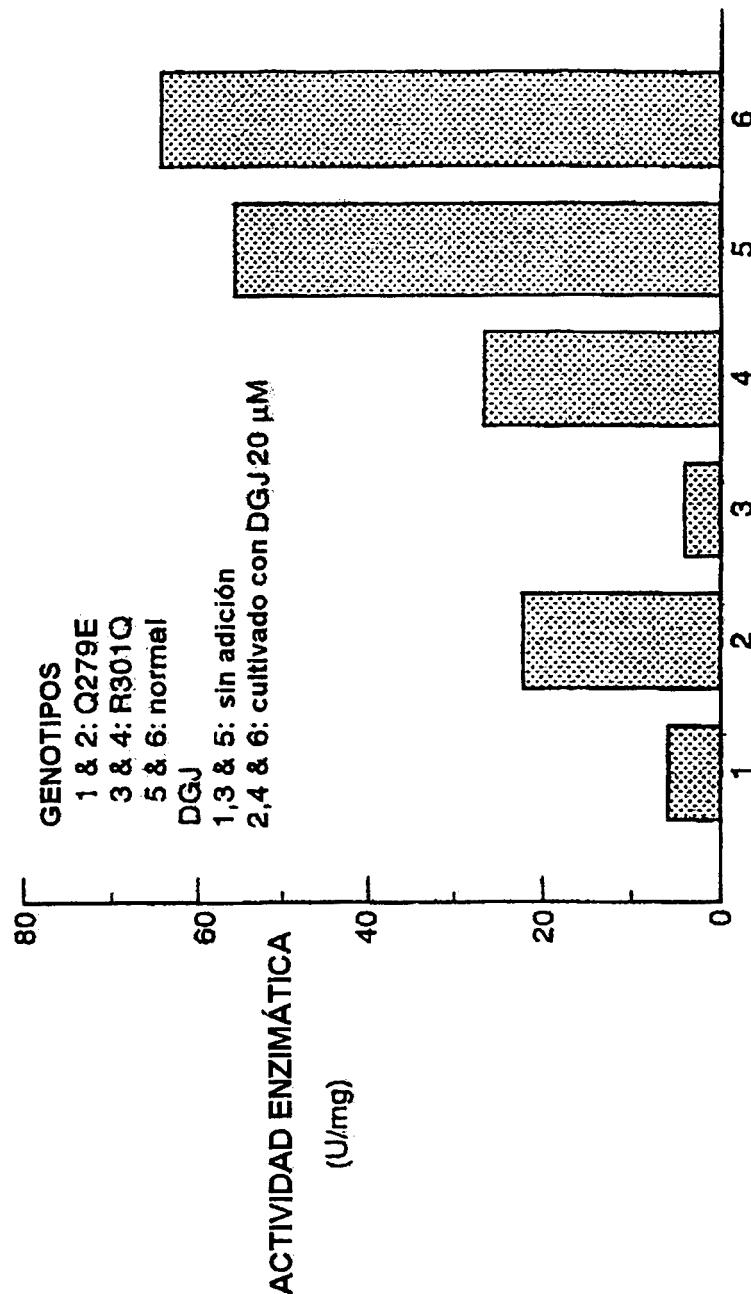


Fig. 3B

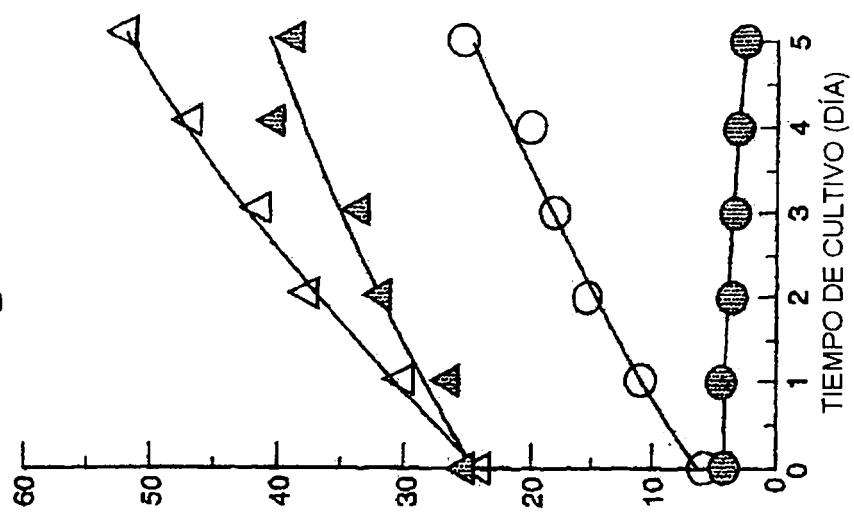


Fig. 3A

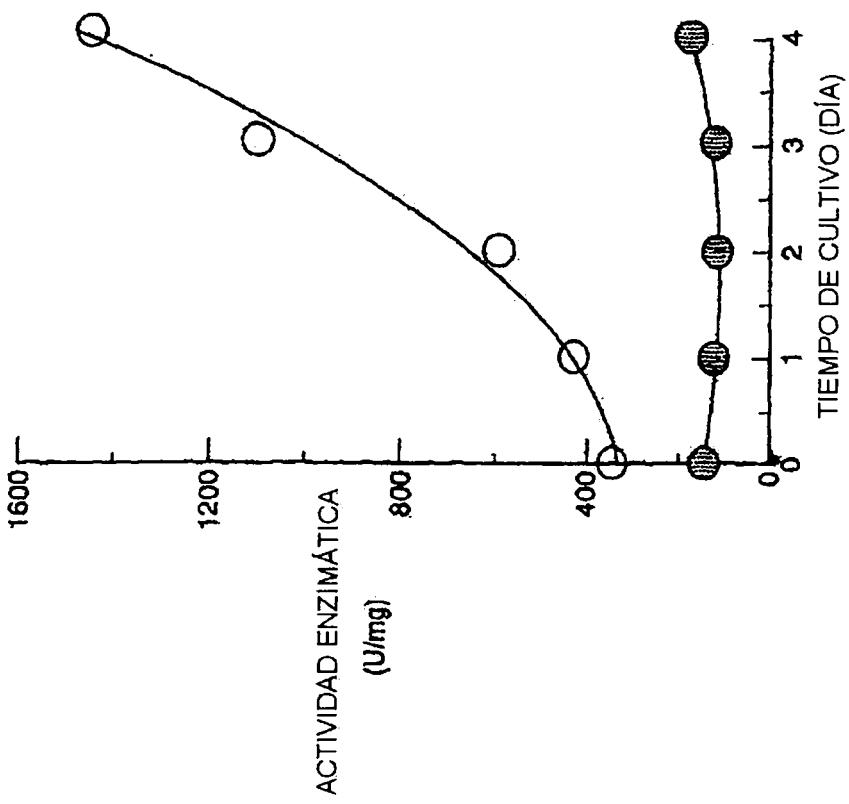


Fig. 4A

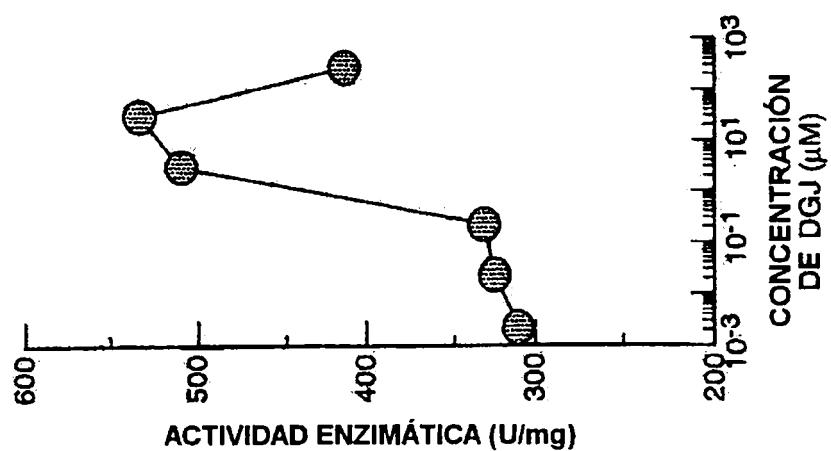


Fig. 4B

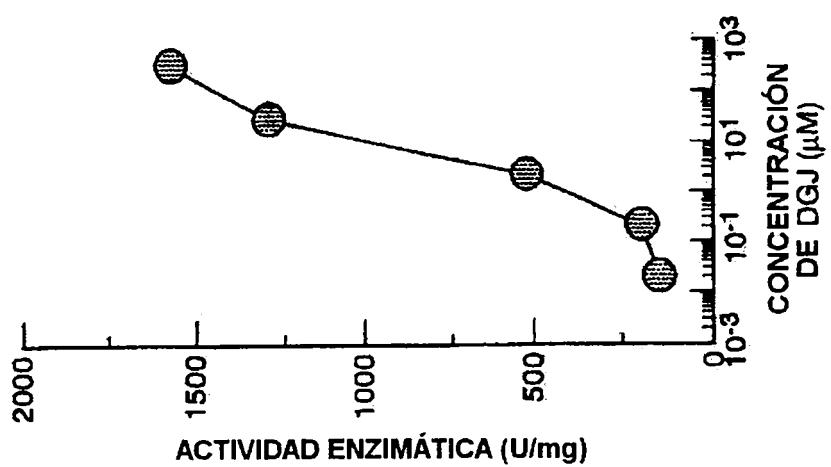


Fig. 4C

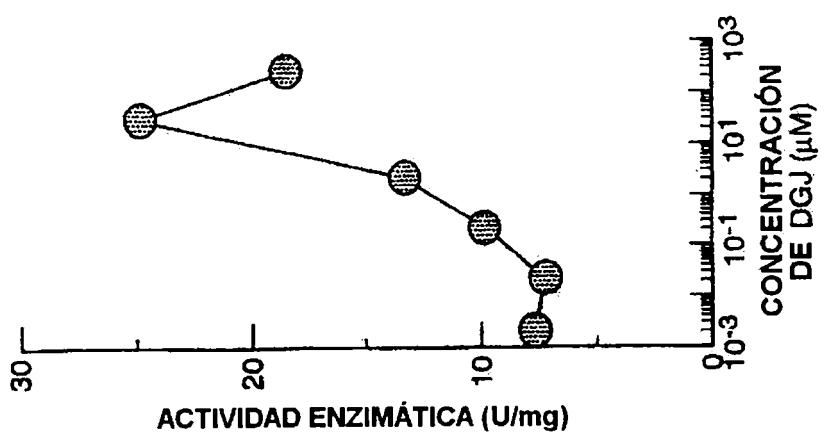


Fig. 5

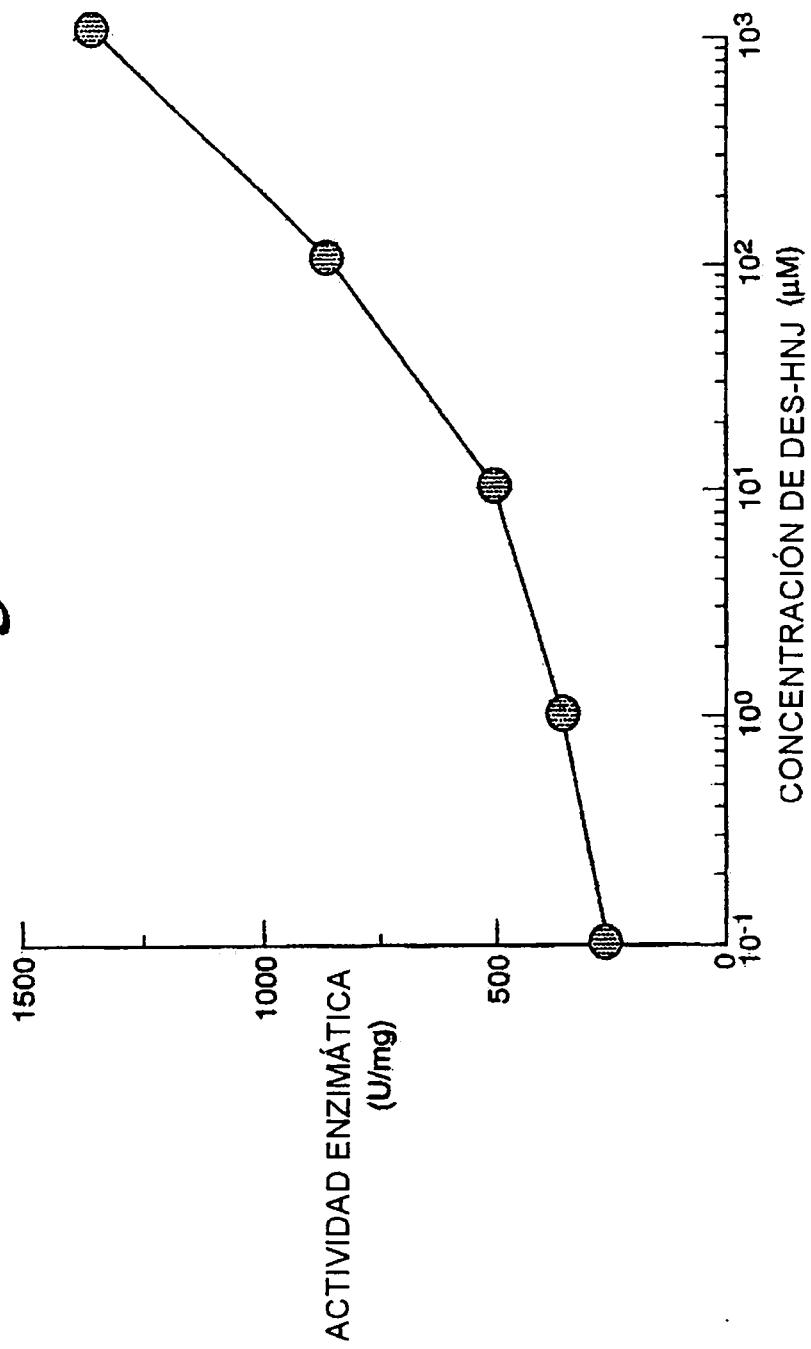


Fig. 6

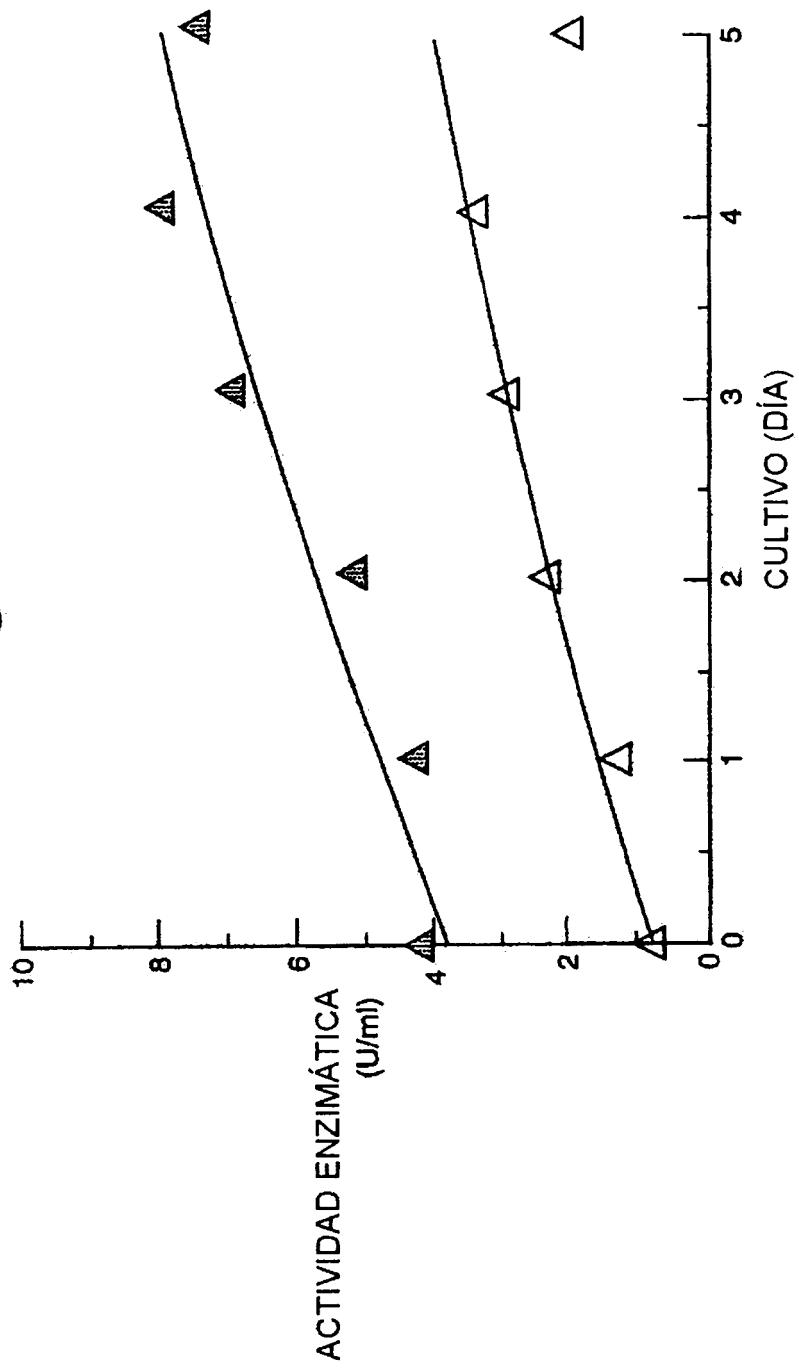


Fig. 7

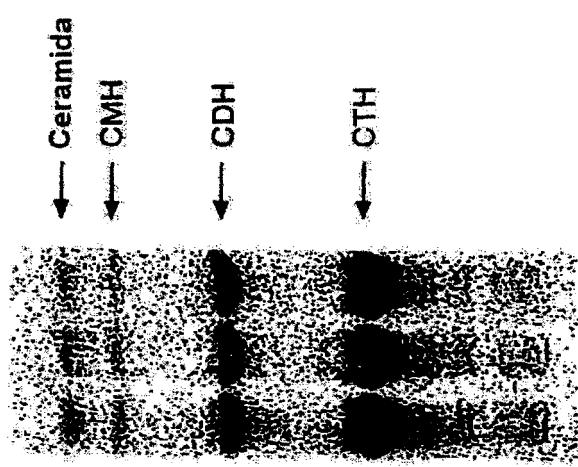


Fig. 8A

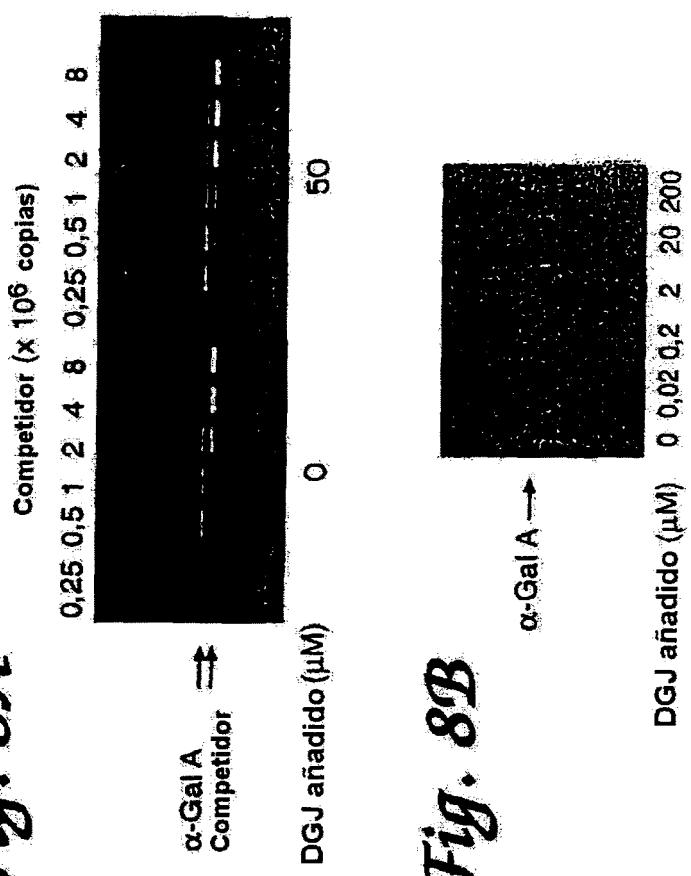


Fig. 8B



Fig. 9A

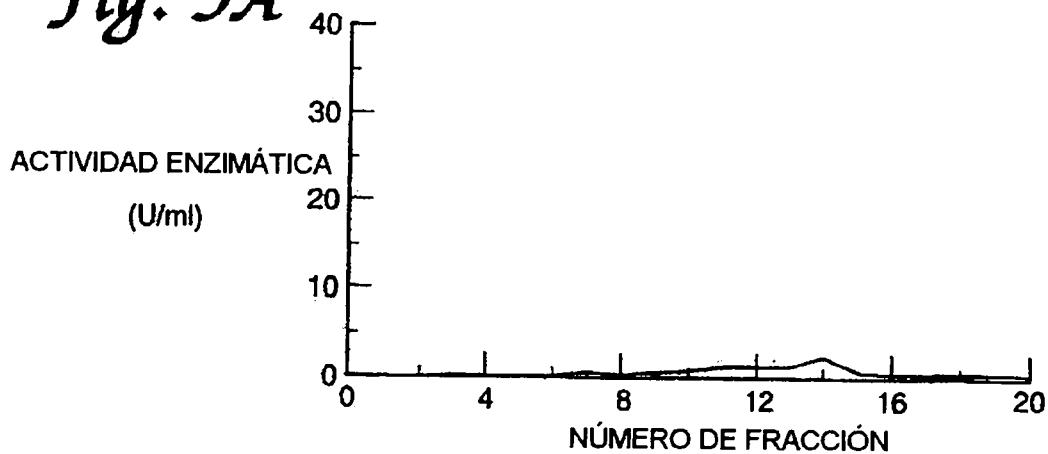


Fig. 9B

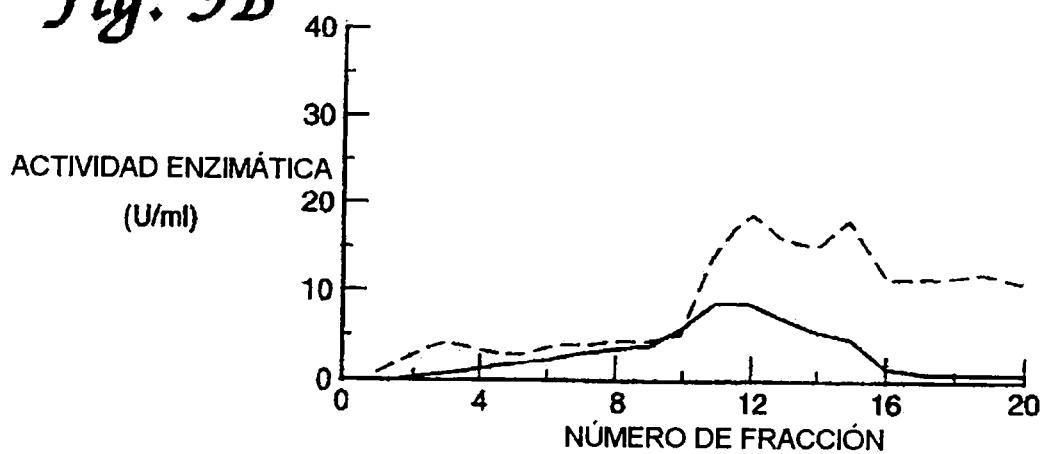


Fig. 9C

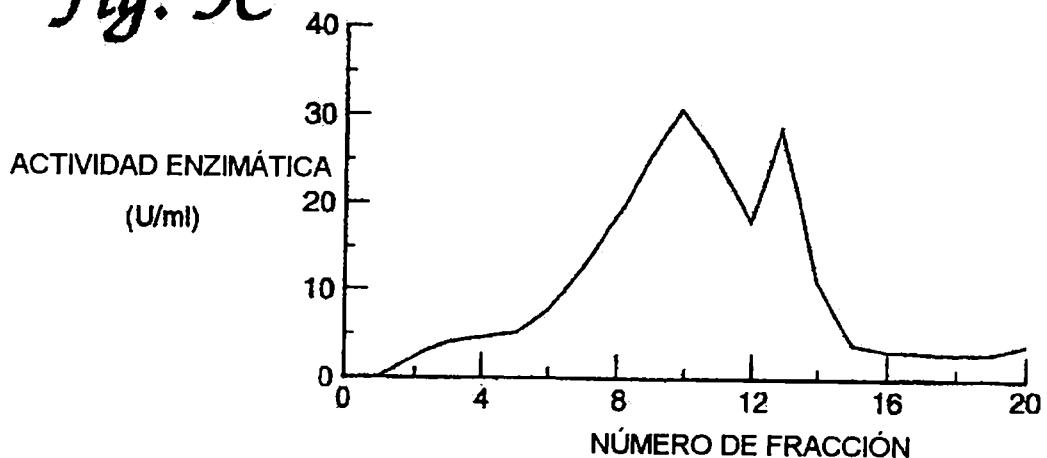


Fig. 10

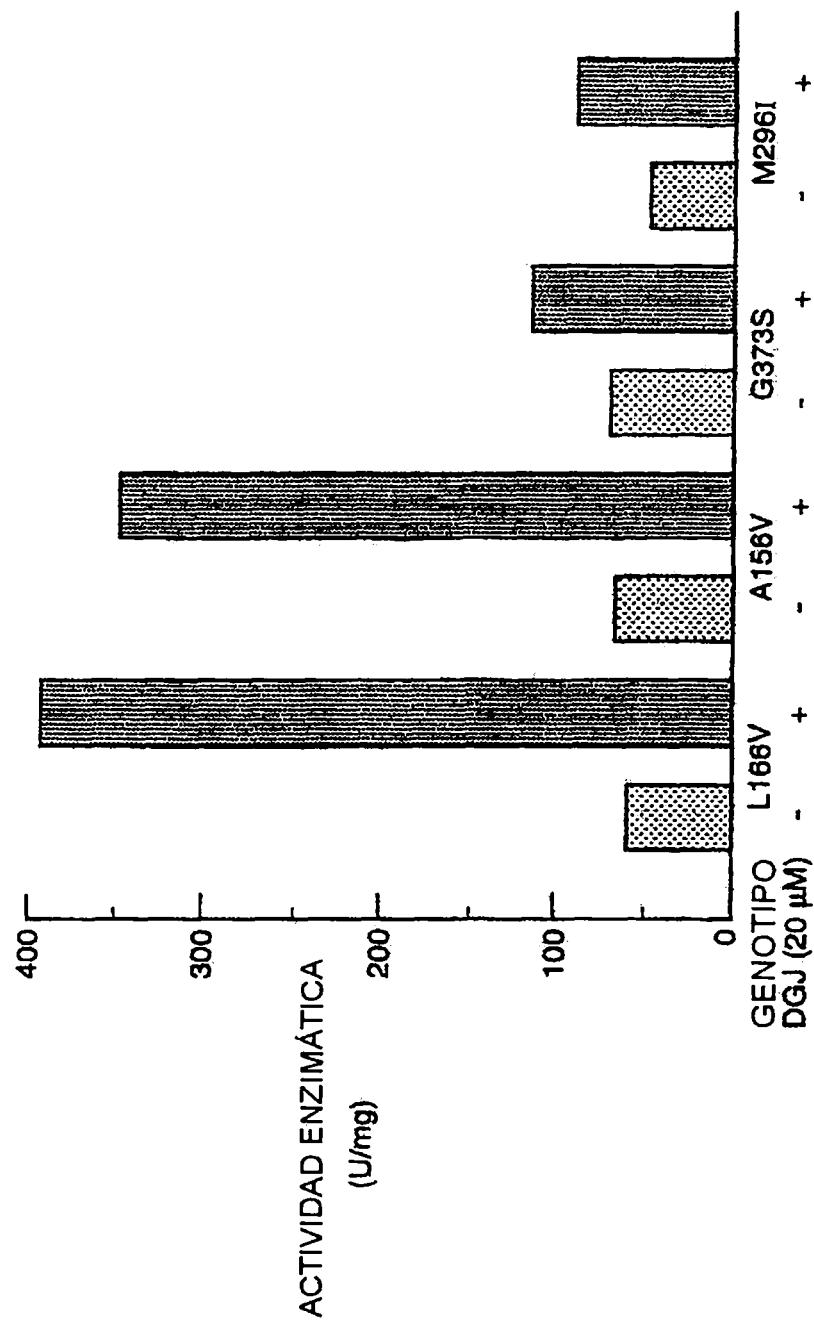


Fig. 11

