(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 012 794**

(51) Int. CI.:

G01N 33/53 (2006.01)
C07D 211/46 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2007 E 18197135 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 3457135**

(54) Título: **Opciones de tratamiento para enfermedad de Fabry**

(30) Prioridad:

16.05.2006 US 801089 P
23.10.2006 US 853631 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2025

(73) Titular/es:

AMICUS THERAPEUTICS, INC. (50.00%)
3675 Market Street
Philadelphia, PA 19104, US y
NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (50.00%)

(72) Inventor/es:

LOCKHART, DAVID y
CASTELLI, JEFF

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

Opciones de tratamiento para enfermedad de Fabry

Remisión a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número de serie 60/801.089, presentada el 16 de mayo de 2006, y de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos número de serie 60/853.631, presentada el 23 de octubre de 2006.

Campo de la invención

La presente invención proporciona 1-desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente humano que lo necesita, en donde el paciente tiene una mutación de α-galactosidasa A seleccionada del grupo que consiste en G328A, T41I, M51K, A97V, R112H, A143T, P205T, Y207S, N215S, P259R, L300P, S201F y F295C.

Antecedentes

La enfermedad de Fabry es un trastorno del almacenamiento lisosómico de glucoesfingolípidos (GSL) resultante de una deficiencia hereditaria ligada al X de α-galactosidasa A (α-GAL) lisosómica, una enzima responsable de la hidrólisis de residuos de α-galactosilo terminales de los glucoesfingolípidos (Brady *et al.* N Engl J Med 1967; 276: 1163-7). Una deficiencia de la actividad enzimática provoca depósito progresivo de glucoesfingolípidos neutros, predominantemente globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida, CTH, GL-3), en las células de pacientes con enfermedad de Fabry. Los síntomas pueden ser graves y debilitantes, incluyendo insuficiencia renal y riesgo aumentado de infarto de miocardio y apoplejía. Algunas de las mutaciones provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de α-GAL que pueden provocar la producción de α-GAL con estabilidad reducida que no se pliega en su forma tridimensional correcta. Aunque α-GAL producida en células de pacientes a menudo conserva el potencial de algún nivel de actividad biológica, los mecanismos de control de calidad de la célula reconocen y conservan α-GAL plegada incorrectamente en el retículo endoplásmico, o RE, hasta que finalmente se mueve a otra parte de la célula para su degradación y eliminación. En consecuencia, poco o nada de α-GAL se mueve al lisosoma, donde normalmente hidroliza GL-3. Esto da lugar a acumulación de GL-3 en las células, que se cree que es la causa de los síntomas de la enfermedad de Fabry. Además, la acumulación de la enzima α-GAL plegada incorrectamente en el RE puede dar lugar a agresión en las células y respuestas similares a inflamatorias, lo que puede contribuir a disfunción celular y enfermedad.

La enfermedad de Fabry se clasifica por manifestaciones clínicas en tres grupos: una forma clásica con vasculopatía generalizada, una forma variante atípica con manifestaciones clínicas limitadas al tejido cardiaco, y enfermedad de aparición posterior, que incluye mujeres portadoras con formas de leves a graves de la enfermedad.

La frecuencia de la forma clásica de la enfermedad se estima en aproximadamente 1:40 000 a 1:60 000 en hombres, y se presenta en todo el mundo dentro de diferentes grupos étnicos. Los hombres afectados con la forma clásica tienen poco o ningún nivel de α-GAL detectable y son los más gravemente afectados. Las manifestaciones clínicas incluyen angioqueratoma (mancas pequeñas, elevadas de color rojizo-púrpura en la piel), acroparestesias (quemazón en manos y pies), hipohidrosis (capacidad disminuida de sudar) y opacidades corneales y lenticulares características (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª edición 2001, Scriver *et al.*, ed., pág. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York). El almacenamiento de lípidos puede dar lugar a circulación arterial alterada y riesgo aumentado de infarto de miocardio o apoplejía. El corazón también puede quedar agrandado y los riñones pueden quedar progresivamente implicados. Otros síntomas incluyen fiebre y dificultades gastrointestinales, particularmente después de comer. La esperanza de vida de los hombres afectados está reducida, y habitualmente se produce la muerte en la cuarta o quinta década como resultado de vasculopatía del corazón, el cerebro y/o los riñones.

Los individuos con enfermedad de Fabry aparición posterior pueden ser hombres o mujeres. La enfermedad de Fabry de aparición posterior se presenta como la forma variante atípica, y las crecientes evidencias indican que puede haber un número importante de "variantes atípicas" que no estén contabilizadas en el mundo. Las mujeres, que heredan un cromosoma X que contiene una mutación en α-GAL, pueden presentar síntomas posteriormente en la vida, aumentando significativamente la prevalencia de esta enfermedad. Estos pacientes típicamente experimentan síntomas de la enfermedad por primera vez en la vida adulta, y a menudo tienen síntomas de la enfermedad centrados en un solo órgano. Por ejemplo, muchos hombres y mujeres con enfermedad de Fabry de aparición posterior tienen agrandamiento del ventrículo izquierdo del corazón. La enfermedad de Fabry de aparición posterior también puede presentarse en forma de apoplejías de causa desconocida. Según avanza la edad de los pacientes, las complicaciones cardiacas de la enfermedad progresan, y pueden dar lugar a la muerte.

En contraste, los pacientes con la "variante cardiaca" más suave de la enfermedad de Fabry normalmente tienen un 5-15 % de actividad α-GAL normal, y presentan hipertrofia ventricular izquierda o una cardiomiopatía. Estos pacientes de variante cardiaca permanecen esencialmente asintomáticos cuando sus equivalentes con afectación clásica están

gravemente comprometidos. Se encontraron variantes cardiacas en un 11 % de pacientes hombres adultos con cardiomiopatía hipertrófica ventricular izquierda sin causa aparente, lo que sugiere que la enfermedad de Fabry puede ser más frecuente que lo estimado previamente (Nakao *et al.*, N. Engl. J. Med. 1995; 333: 288-293).

El gen de α-GAL se ha cartografiado en Xq22 (Bishop *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 1985; 37: A144), y se ha presentado el ADNc de longitud completa y las secuencias genómicas enteras de 12 kb que codifican α-GAL (Calhoun *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 7364-7368; Bishop *et al.*, Proc. Natl. Acad Sci. USA. 1986; 83: 4859-4863; Tsuji *et al.*, Eur. J. Biochem. 1987; 165: 275-280; y Kornreich *et al.*, Nucleic Acids Res. 1989; 17: 3301-3302). Hay una marcada heterogeneidad genética en las mutaciones que provocan la enfermedad de Fabry (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8.ª edición 2001, Scriver *et al.*, ed., pág. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York; Eng *et al.*, Am, J. Hum. Genet. 1993; 53: 1186-1197; Eng *et al.*, Mol. Med. 1997; 3: 174-182; y Davies *et al.*, Eur. J. Hum. Genet. 1996; 4: 219-224). Hasta la fecha, se ha informado de una diversidad de mutaciones de aminoácido, terminadoras y de empalme, además de pequeñas eliminaciones e inserciones, y grandes reordenamientos génicos, aunque la mayoría de las mutaciones son mutaciones de aminoácido.

La enfermedad de Fabry es heterogénea y a menudo es difícil de correlacionar el genotipo con el fenotipo. Las personas con el mismo genotipo a menudo presentan diferentes síntomas clínicos y patología de la enfermedad. Sin embargo, parece haber una correlación entre la actividad enzimática residual y la gravedad de la enfermedad, con la menor actividad de α-GAL resultante en la mayor gravedad de la enfermedad. Aunque la inmensa mayoría de las mutaciones de α-GAL son mutaciones de aminoácido, estando la mayoría fuera del sitio catalítico, es difícil predecir las mutaciones que provocan una enzima inestable que pudiera "rescatarse" por una chaperona farmacológica específica (SPC) que estabilice la enzima, y las que no pudieran estabilizarse usando una SPC.

Diagnóstico de enfermedad de Fabry

Como la enfermedad de Fabry es infrecuente, implica múltiples órganos, tiene un amplio intervalo de edad de aparición y es heterogénea, su diagnóstico apropiado es un desafío. El reconocimiento entre los profesionales de la salud es bajo y son frecuentes los diagnósticos incorrectos. Algunos ejemplos de diagnósticos considerados de forma importante en pacientes que finalmente se diagnostican con enfermedad de Fabry incluyen: prolapso de la válvula mitral, glomerulonefritis, proteinuria idiopática, lupus eritematoso diseminado, enfermedad de Whipple, síndrome abdominal agudo, colitis ulcerosa, porfirias intermitentes agudas y neoplasias ocultas. Por tanto, incluso para hombre afectado por la forma clásica, el diagnóstico típicamente tarda aproximadamente 5-7 años o incluso más. Esto es una preocupación porque cuanto más tiempo tiene una persona la enfermedad de Fabry, es probable que se produzcan más daños en los órganos y tejidos afectados y más grave puede llegar a ser el estado de la persona. El diagnóstico de la enfermedad de Fabry se confirma muy a menudo en función de la actividad de α-GAL disminuida en plasma o leucocitos periféricos (WBC) una vez un paciente es sintomático, acoplado con análisis mutacional. En mujeres, el diagnóstico es incluso más problemático ya que la identificación enzimática de las mujeres portadoras es menos fiable debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X en algunas células de las portadoras. Por ejemplo, algunas portadoras estrictas (hijas de hombres afectados por la forma clásica) tienen actividades de la enzima α-GAL que varían de actividades normales a muy bajas. Como las portadoras pueden tener actividad enzimática α-GAL normal en leucocitos, solo la identificación de una mutación de α-GAL por ensayo genético proporciona una identificación y/o diagnóstico preciso de la portadora.

Tratamiento de enfermedad de Fabry

El único tratamiento aprobado para tratar la enfermedad de Fabry es el tratamiento sustitutivo de enzimas, que típicamente implica infusión intravenosa de una forma purificada de la correspondiente proteína natural (Fabrazyme®, Genzyme Corp.). Una de las complicaciones principales con el tratamiento sustitutivo de proteínas es obtener y mantener cantidades terapéuticamente eficaces de proteína *in vivo* debido a la rápida degradación de la proteína infundida. La estrategia actual para superar este problema es realizar numerosas infusiones de dosis muy costosas.

El tratamiento sustitutivo de proteínas tiene varias precauciones adicionales, tales como dificultades con la generación a gran escala, purificación y almacenamiento de la proteína plegada apropiadamente; obtención de proteína natural glucosilada; generación de una respuesta inmunitaria antiproteína; e incapacidad de que la proteína cruce la barrera hematoencefálica para mitigar patologías del sistema nervioso central (por ejemplo, baja biodisponibilidad). Además, la enzima sustitutiva no puede penetrar en el corazón o el riñón en cantidades suficientes para reducir la acumulación de sustrato en los podocitos renales o los miocitos cardiacos, que ocupan un lugar destacado en la patología de Fabry.

Se está evaluando la genoterapia usando vectores recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína funcional, o usando células humanas modificadas genéticamente que expresan una proteína funcional, para tratar las deficiencias proteínicas y otros trastornos que se benefician de la sustitución de proteínas. Aunque es prometedora, esta estrategia también está limitada por dificultades técnicas tales como la incapacidad de los vectores de infectar o transducir células en división, la baja expresión del gen diana y la regulación de la expresión una vez administrado el gen.

Una tercera estrategia relativamente reciente para tratar algunas deficiencias enzimáticas implica el uso de inhibidores

micromoleculares para reducir la producción del sustrato natural de las proteínas enzimáticas deficientes, mejorando de ese modo la patología. Esta estrategia de "reducción de sustrato" se ha descrito específicamente para una clase de aproximadamente 40 trastornos enzimáticos relacionados denominados trastornos del almacenamiento lisosómico que incluyen trastornos del almacenamiento de glucoesfingolípidos. Los inhibidores micromoleculares propuestos para su uso como tratamiento son específicos para inhibir las enzimas implicadas en la síntesis de glucolípidos, reduciendo la cantidad de glucolípidos celulares a descomponer por la enzima deficiente. Esta estrategia también está limitada porque los glucolípidos son necesarios para la función biológica, especialmente la función neurológica, y la privación excesiva puede provocar efectos adversos.

Se ha demostrado previamente que la unión de inhibidores micromoleculares de enzimas asociadas con LSD puede aumentar la estabilidad tanto de la enzima mutante como de la enzima natural correspondiente (véanse las patentes de Estados Unidos n.º 6.274.597; 6.583.158; 6.589.964; 6.599.919; 6.916.829, y 7.141.582). En particular, se descubrió que la administración de derivados micromoleculares de glucosa y galactosa, que son inhibidores competitivos específicos y selectivos para varias enzimas lisosómicas diana, aumentaba de forma eficaz la estabilidad de las enzimas en células *in vitro* y, por tanto, aumentaba el tráfico de las enzimas al lisosoma. Por tanto, al aumentar la cantidad de enzimas en el lisosoma, se espera que la hidrólisis de los sustratos enzimáticos aumente. La teoría original detrás de esta estrategia fue como sigue: como la proteína enzimática mutante es inestable en el RE (Ishii *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retarda en la ruta de transporte normal (RE → aparato de Golgi → endosomas → lisosoma) y se degrada prematuramente. Por lo tanto, un compuesto que se une a una enzima mutante y aumenta su estabilidad, puede servir de "chaperona" para la enzima y aumentar la cantidad que puede salir del RE y pasar a los lisosomas. Además, como el plegamiento y tráfico de algunas proteínas naturales son incompletos, degradándose hasta un 70 % de algunas proteínas naturales en algunos casos antes de alcanzar su ubicación celular final, las chaperonas pueden usarse para estabilizar las enzimas naturales y aumentar la cantidad de enzima que puede salir del RE y transportarse a los lisosomas. Se ha demostrado que esta estrategia aumenta varias enzimas lisosómicas *in vitro* e *in vivo,* incluyendo la β-glucocerebrosidasa y α-glucosidasa, cuyas deficiencias están asociadas con la enfermedad de Gaucher y Pompe, respectivamente.

Sin embargo, como se indica anteriormente, los candidatos satisfactorios para tratamiento con SPC deben tener una mutación que provoque la producción de una enzima que tenga el potencial de estabilizarse y plegarse en una conformación que permita el tráfico fuera del RE. Mutaciones que truncan de forma importante la enzima, tales como mutaciones terminadoras o mutaciones en el dominio catalítico que evitan la unión de la chaperona, probablemente no serán "rescatables" o "potenciables" usando tratamiento con SPC. Aunque mutaciones de aminoácido fuera del sitio catalítico tienen más probabilidad de ser rescatables usando SPC, no hay garantías, necesitando cribado de mutaciones sensibles. Esto significa que, incluso cuando la enfermedad de Fabry se diagnostica detectando actividad de α-GAL deficiente en WBC, es muy difícil, si no imposible, predecir si un paciente particular con enfermedad de Fabry responderá al tratamiento con una SPC. Además, como los WBC sobreviven solamente durante un corto periodo de tiempo en cultivo (*in vitro*), es difícil el cribado de la potenciación por SPC de α-GAL.

Para aplicar el tratamiento con SPC de forma eficaz, antes del inicio del tratamiento tiene que adoptarse un método ampliamente aplicable, rápido y eficaz para cribar a los pacientes por su sensibilidad al tratamiento con SPC. Por tanto, sigue habiendo en la técnica una necesidad de métodos relativamente no invasivos para evaluar rápidamente la potenciación enzimática con posibles tratamientos antes de tomar decisiones sobre el tratamiento, por beneficios tanto de costes como emocionales del paciente.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona 1-desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente humano que lo necesita como se define en las reivindicaciones adjuntas.

También se describen dos métodos para determinar si un paciente será un candidato para tratamiento con SPC. Específicamente, se describen ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad de α-GAL en glóbulos sanguíneos derivados de pacientes con enfermedad de Fabry en presencia o ausencia de una SPC. También se describe la base para la evaluación de SPC como tratamiento para otras innumerables anomalías proteínicas y/o deficiencias enzimáticas.

También se describen kits de diagnóstico que contienen los componentes requeridos para realizar el ensayo. Se describe además un método mejorado de diagnóstico de la enfermedad de Fabry determinando la actividad de α-GAL en linfocitos T de pacientes sospechosos de tener enfermedad de Fabry.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Ciclo de tiempo para la potenciación de A97V. Se cultivaron linfocitos T que portan la mutación A97V en α-Gal A en ausencia (círculos vacíos) o presencia (círculos rellenos) de DGJ 20 μM durante uno a cuatro días, después se ensayaron para la actividad de α-GAL. Cambiar el medio después de 2 días y remplazarlo con medio fresco con (triángulo vacío) o sin DGJ (triángulo relleno) no tuvo efecto sobre la actividad enzimática observada.

Figura 2A-C. La dependencia en la concentración de DGJ en linfocitos T de pacientes de control normales y con enfermedad de Fabry. Se incubaron linfocitos T de individuos normales (2A) durante 3 días con DGJ de 2 nM a 200 µM, después se ensayaron para la actividad de α-GAL. Se muestran los resultados de tres experimentos en diferentes días. Se cultivaron linfocitos T de pacientes con enfermedad de Fabry con las mutaciones A97V (2B), R112H (2C) o R301Q (2C), respectivamente, con DGJ de 2 nM a 200 µM, después se ensayaron para la actividad de α-GAL. Se muestran tres conjuntos independientes de experimentos de dosificación de DGJ, de los que cada uno de ellos se realizó con conjuntos triplicados.

Figura 3. Se cultivaron linfocitos T de diversos pacientes con enfermedad de Fabry en ausencia o en presencia de DGJ 20 µM durante tres días, después se ensayaron para la actividad de α-GAL. Se representó en gráfico el porcentaje del normal promedio de actividad específica de α-GAL para mostrar el efecto de rescate de DGJ sobre los diferentes genotipos de pacientes con enfermedad de Fabry. El panel inferior muestra los resultados de transferencia de Western para cada mutación, sondeada con anticuerpo policlonal de conejo específico para α-GAL. Esto demuestra la estabilidad proteínica aumentada para las mutaciones potenciables A97V y R301Q y sin aumento en la cantidad de proteína para las mutaciones R356W, G132R y A143P.

Figura 4. Representación gráfica de la potenciación *in vivo* de la actividad de α-GAL en WBC de pacientes con enfermedad de Fabry después de tratamiento con DGJ.

Figura 5. Representación gráfica que compara la potenciación *in vitro* e *in vivo* de la actividad de α-GAL para 10 genotipos.

Descripción detallada

En este documento se describen dos ensayos para permitir la determinación precisa de si una SPC potencia la actividad enzimática a partir de células derivadas de pacientes con enfermedad de Fabry. Estos ensayos permiten una determinación de si el paciente será un candidato para tratamiento con SPC. El nuevo ensayo *in vitro* es extremadamente sensible y puede realizarse sobre linfocitos T aislados que no tienen que cultivarse ampliamente y mantenerse *in vivo,* lo que acelera el tiempo requerido para realizar el ensayo (en comparación con cuando se usan fibroblastos). Este ensayo también puede usarse como ensayo de diagnóstico para pacientes sospechosos de tener enfermedad de Fabry, especialmente mujeres, ya que es más sensible que el ensayo de WBC típicamente usado para detectar la actividad de α-GAL. El nuevo ensayo *in vivo* es asimismo no invasivo y proporciona un método muy fiable para determinar si un tratamiento con SPC será eficaz en un paciente particular. Además, junto con el genotipado, ambos ensayos proporcionan un método para determinar si las mutaciones de α-GAL recién descubiertas (tales como mutaciones espontáneas) provocan que α-GAL se pliegue incorrectamente y, por tanto, posiblemente sería "rescatables" usando SPC. La presente invención proporciona la SPC 1-desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente humano que tiene una mutación en α-galactosidasa A como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

Los términos y expresiones usados en esta memoria descriptiva tienen en general sus significados normales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se usa cada término o expresión. Determinados términos o expresiones se analizan a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al facultativo en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y la manera de prepararlas y usarlas.

La expresión "enfermedad de Fabry" se refiere a un error congénito ligado al X del catabolismo de glucoesfingolípidos debido a una actividad deficiente de la α-galactosidasa A lisosómica. Este defecto provoca acumulación de globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida) y glucoesfingolípidos relacionados en lisosomas endoteliales vasculares del corazón, los riñones, la piel y otros tejidos.

La expresión "enfermedad de Fabry atípica" se refiere a pacientes con manifestaciones principalmente cardiacas de la deficiencia de α-GAL, concretamente acumulación progresiva de globotriaosilceramida (GL-3) en células miocárdicas que da lugar a agrandamiento significativo del corazón, particularmente el ventrículo izquierdo.

Una "portadora" es una mujer que tiene un cromosoma X con un gen de α-GAL defectuoso y un cromosoma X con el gen normal y en la que la inactivación del cromosoma X del alelo normal está presente en uno o más tipos celulares. Una portadora a menudo está afectada con la enfermedad de Fabry.

Un "paciente" se refiere a un sujeto que se ha diagnosticado con una enfermedad particular. El paciente puede ser humano o animal. Un "paciente con enfermedad de Fabry" se refiere a un individuo que se ha diagnosticado con enfermedad de Fabry y tiene una α-GAL mutada como se define adicionalmente a continuación. Pueden existir marcadores de la enfermedad de Fabry en hombres hemicigóticos y mujeres portadoras con la misma prevalencia, aunque las mujeres típicamente se ven afectadas con menos gravedad.

La α-galactosidasa A (α-GAL) humana se refiere a una enzima codificada por el gen *Gla* humano. La enzima α-GAL humana consiste en 429 aminoácidos y está en GenBank con el n.º de acceso U78027.

Como se usa en este documento en una realización, la expresión "α-GAL mutante" incluye una α-GAL que tiene una mutación en el gen que codifica α-GAL que provoca la incapacidad de la enzima de conseguir una conformación estable en las condiciones normalmente presentes en el RE. El fracaso en conseguir una conformación estable provoca que una cantidad sustancial de la enzima se degrade, en lugar de transportarse al lisosoma. Dicha mutación se denomina a veces "mutante conformacional".

Mutaciones no limitantes de α-GAL ejemplares asociadas con la enfermedad de Fabry que provocan α-GAL inestable incluyen L32P; N34S, T41I; M51K; E59K; E66Q; 191T; A97V; R100K; R112C; R112H, F113L; T141L; A143T; G144V; S148N; A156V; L166V; D170V; C172Y, G183D; P205T; Y207C; Y207S; N215S; A228P; S235C; D244N; P259R; N263S; N264A; G272S; S276G; Q279E; Q279K; Q279H; M284T; W287C; 1289F, M296I; M296V; L300P; R301Q; V316E; N320Y; G325D; G328A; R342Q; E358A; E358K; R363C; R363H; G370S; y P409A.

Como se usa en este documento, la expresión "chaperona farmacológica específica" ("SPC") o "chaperona farmacológica" se refiere a cualquier molécula, incluyendo una molécula pequeña, proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, etc. que se una específicamente a una proteína y tenga uno o más de los siguientes efectos: (i) potencia la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) induce el tráfico de la proteína desde el RE a otra ubicación celular, preferiblemente una ubicación celular natural, es decir, evita la degradación asociada al RE de la proteína; (iii) evita la agregación de proteínas plegadas incorrectamente; y/o (iv) restablece o potencia al menos la función y/o actividad natural parcial de la proteína. Un compuesto que se une específicamente a, por ejemplo, α-GAL, significa que se une a y ejerce un efecto de chaperona sobre α-GAL y no un grupo genérico de enzimas relacionadas o no relacionadas. Más específicamente, este término no se refiere a chaperonas endógenas, tales como BiP, o a agentes no específicos que han demostrado actividad chaperona no específica contra diversas proteínas, tales como glicerol, DMSO o agua deuterada, es decir, chaperonas químicas (véase Welch *et al.*, Cell Stress and Chaperones 1996; 1(2):109-115; Welch *et al.*, Journal of Bioenergetics and Biomembranes 1997; 29(5):491-502; patente de Estados Unidos n.º 5.900.360; patente de Estados Unidos n.º 6.270.954; y patente de Estados Unidos n.º 6.541.195). La SPC puede ser un inhibidor competitivo reversible.

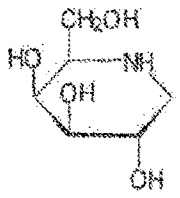
Un "inhibidor competitivo" de una enzima puede referirse a un compuesto que se parece estructuralmente a la estructura química y la geometría molecular del sustrato enzimático para unirse a la enzima en aproximadamente la misma ubicación que el sustrato. Por tanto, el inhibidor compite por el mismo sitio activo que la molécula de sustrato, aumentando, por tanto, la Km. La inhibición competitiva habitualmente es reversible si están disponibles suficientes moléculas de sustrato para desplazar el inhibidor, es decir, los inhibidores competitivos pueden unirse de forma reversible. Por lo tanto, la cantidad de inhibición enzimática depende de la concentración de inhibidor, la concentración de sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el sitio activo.

Lo siguiente es una descripción de algunas chaperonas farmacológicas específicas:

1-desoxigalactonojirimicina se refiere a un compuesto que tiene las siguientes estructuras:



o



Esta expresión incluye tanto la base libre como cualquier forma salina. La sal clorhidrato de DGJ es conocida como clorhidrato de migalastat (Migalastat).

Aún otras SPC para α-GAL se describen en las patentes de Estados Unidos 6.274.597, 6.774.135 y 6.599.919 de Fan *et al.*, e incluyen α-3,4-di-epi-homonojirimicina, 4-epi-fagomina y α-alo-homonojirimicina, N-metil-desoxigalactonojirimicina, β-1-C-butil-desoxigalactonojirimicina y α-galacto-homonojitimicina, calistegina A_3, calistegina B_2, calistegina B_3, N-metil-calistegina A_3, N-metil-calistegina B_2 y N-metil-calistegina B_3.

Como se usa en este documento, la expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con una proteína tal como α-GAL, específicamente, una interacción con residuos aminoacídicos de la proteína que participan directamente en el contacto con las chaperonas farmacológicas. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína diana, por ejemplo, α-GAL, para prolongar el efecto chaperona sobre α-GAL y no un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los residuos aminoacídicos de una proteína que interactúan con cualquier chaperona farmacológica dada pueden estar o no dentro del "sitio activo" de la proteína. La unión específica puede evaluarse a través de ensayos de unión rutinarios o a través de estudios estructurales, por

ejemplo, cocristalización, RMN y similares. El sitio activo para α-GAL es el sitio de unión de sustrato.

"Actividad de α-GAL deficiente" se refiere a actividad de α-GAL en células de un paciente que está por debajo del intervalo normal en comparación (usando los mismos métodos) con la actividad en individuos normales que no tienen o no son sospechosos de tener enfermedad de Fabry o cualquier otra enfermedad (especialmente una enfermedad sanguínea).

Como se usan en este documento, las expresiones "potenciar la actividad de α-GAL" o "aumentar la actividad de α-GAL" se refieren a aumentar la cantidad de α-GAL que adopta una conformación estable en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para α-GAL, con respecto a la cantidad en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, por ejemplo, en un momento anterior) no en contacto con la chaperona farmacológica específica para α-GAL. Esta expresión también se refiere a aumentar el tráfico de α-GAL al lisosoma en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para α-GAL, con respecto al tráfico de α-GAL no en contacto con la chaperona farmacológica específica para la proteína. Estas expresiones se refieren tanto a α-GAL natural como mutante. En una realización, el aumento en la cantidad de α-GAL en la célula se mide midiendo la hidrólisis de un sustrato artificial en lisados de células que se han tratado con la SPC. Un aumento en la hidrólisis es indicativo de actividad de α-GAL aumentada.

La expresión "actividad de α-GAL" se refiere a la función fisiológica normal de una α-GAL natural en una célula. Por ejemplo, la actividad de α-GAL incluye hidrólisis de GL-3.

Un "respondedor" es un individuo (diagnosticado con o sospechoso de tener enfermedad de Fabry) cuyas células presentan actividad de α-GAL suficientemente aumentada, y/o mejoría de los síntomas o mejora en los marcadores equivalentes, en respuesta al contacto con una SPC. Ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores equivalentes para enfermedad de Fabry incluyen aumentos en los niveles o actividad de α-GAL en células (por ejemplo, fibroblastos) y tejido; reducciones en la acumulación de GL-3; concentraciones plasmáticas disminuidas de homocisteína y molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1); acumulación disminuida de GL-3 dentro de células miocárdicas y fibrocitos valvulares, reducción en la hipertrofia cardiaca (especialmente del ventrículo izquierdo), mejora de la insuficiencia valvular, y arritmias; mejora de la proteinuria; concentraciones urinarias disminuidas de lípidos tales como CTH, lactosilceramida, ceramida y concentraciones urinarias aumentadas de glucosilceramida y esfingomielina (Fuller *et al.*, Clinical Chemistry. 2005; 51: 688-694); la ausencia de cuerpos de inclusión laminados (cuerpos cebra) en células epiteliales glomerulares; mejoras en la función renal; mitigación de la hipohidrosis; la ausencia de angioqueratomas; y mejoras de anomalías de audición tales como pérdida progresiva de audición sensorineural de alta frecuencia, sordera repentina o acúfenos. Las mejoras en los síntomas neurológicos incluyen la prevención del accidente isquémico transitorio (AIT) o apoplejía; y la mejora del dolor neuropático que se manifiesta como acroparestesia (ardor u hormigueo en las extremidades).

La dosis que consigue una o más de las respuestas mencionadas anteriormente es una "dosis terapéuticamente eficaz". La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente reacciones indeseadas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en este documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense u otra farmacopea en general reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o medio con que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. El agua o las soluciones salinas acuosas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferiblemente como vehículos, especialmente para soluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin, 18.ª edición, u otras ediciones.

Como se usa en este documento, el término "aislado" significa que el material mencionado se retira del entorno en que se encuentra normalmente. Por tanto, un material biológico aislado puede estar exento de componentes celulares, es decir, componentes de las células en que el material se encuentra o produce. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, una banda de ARNm en un gel, un ADNc o un fragmento de restricción. Un ácido nucleico aislado se escinde preferiblemente del cromosoma en que puede encontrarse, y más preferiblemente ya no está unido a regiones no reguladoras, no codificantes, o a otros genes, ubicados anteriores o posteriores del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. El ácido nucleico aislado puede carecer de uno o más intrones. Los ácidos nucleicos aislados incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Por tanto, un ácido nucleico recombinante puede ser un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede estar asociada con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con que se asocia en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se retira del sitio anatómico en que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede estar aislado, pero no necesita estarlo.

El término "aproximadamente" en general significará un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Grados ejemplares típicos de error son dentro de un 20 por ciento (%), preferiblemente dentro de un 10 %, y más preferiblemente dentro de un 5 % de un valor o intervalo de valores dado.

Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, el término "aproximadamente" puede significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 10 o 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas proporcionadas en este documento son aproximadas salvo que se indique lo contrario, lo que significa que el término "aproximadamente" se puede deducir cuando no se señala expresamente.

Método

Para determinar fácilmente si el tratamiento con SPC será un tratamiento viable para pacientes con enfermedad de Fabry, incluyendo mujeres portadoras, se desarrolló un ensayo de rescate simple, no invasivo de DGJ de la actividad de α-GAL en WBC, o subconjuntos de WBC, de pacientes con enfermedad de Fabry.

I. Ensayo *in vitro*

El método de diagnóstico descrito en este documento puede implicar purificar linfocitos T y establecer cultivos de linfocitos T a partir de muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Fabry (o pacientes sospechosos de tener enfermedad de Fabry). Los cultivos de linfocitos T entonces se tratan con o sin una SPC, por ejemplo, DGJ, durante un periodo de tiempo suficiente para demostrar potenciación (es decir, aumento) de la actividad de α-GAL. Los linfocitos T entonces se lisan, y el lisado se usa en un ensayo para determinar la actividad enzimática. Un aumento suficiente en la actividad de α-GAL en los lisados de células tratadas con la SPC sobre la actividad en los lisados de células no tratadas indica que el paciente probablemente responderá al tratamiento con SPC (es decir, el paciente será un "respondedor").

Esta realización puede realizarse como sigue.

Separación de glóbulos blancos

Los WBC se preparan usando técnicas convencionales, por ejemplo, recogida, centrifugación, separación y lavado. Más específicamente, pueden prepararse de acuerdo con las siguientes etapas:

1. Se extrae una muestra de sangre de un paciente con enfermedad de Fabry. Pueden extraerse de aproximadamente 8 a 10 ml en un recipiente apropiado tal como un tubo CPT de Becton-Dickenson (que contiene un anticoagulante y un medio de separación).

2. la muestra de sangre se centrifuga para separar los glóbulos rojos de los glóbulos blancos y el plasma. Típicamente, esta etapa puede realizarse a temperatura ambiente (18-25 °C) a aproximadamente 1800 x g con una centrífuga de sobremesa durante aproximadamente 20-30 minutos, o hasta que los glóbulos rojos se separan del plasma y los glóbulos blancos (WBC). Sin embargo, también pueden usarse otras técnicas de separación conocidas de glóbulos blancos,por ejemplo, Ficoll-Hypaque, Percoll u otros gradientes de densidad similares. Como alternativa, los linfocitos T pueden enriquecerse de los WBC usando separación mediada por anticuerpos o magnética usando selección negativa para retirar otros tipos de células para obtener linfocitos T no unidos. Puede usarse cualquier técnica conocida para enriquecer linfocitos T, aunque se prefieren los métodos más apropiados, menos caros.

3. La mitad de la capa plasmática se descarta (sin alterar la capa de leucocitos) y el líquido restante que contiene glóbulos blancos se transfiere a un tubo de centrífuga.

4. Los WBC entonces se sedimentan y la lavan dos o más veces resuspendiendo las células sedimentadas en un tampón isotónico apropiado, por ejemplo, PBS, seguido de centrifugación durante aproximadamente 15-20 minutos a aproximadamente 320 x g.

5. El sedimento entonces se resuspende con un pequeño volumen de tampón isotónico apropiado, por ejemplo, PBS. La mitad del sedimento se transfiere a un criovial etiquetado para congelación. La otra mitad se usa para establecer cultivos de linfocitos T como se describe a continuación. La muestra que es para congelar se centrifuga y después se resuspende en un pequeño volumen de tampón isotónico apropiado, por ejemplo, RPMI 1640 más DMSO, antes de la congelación.

Cultivos de linfocitos T

Pueden establecerse cultivos de linfocitos T estimulando los linfocitos T presentes en la preparación de WBC, por ejemplo, de acuerdo con el siguiente procedimiento.

1. Las células lavadas de antes se resuspenden en un medio de cultivo celular apropiado, tal como RPMI complementado con citocinas estimuladoras de linfocitos T y/o mitógenos. Las citocinas estimuladoras sugeridas incluyen IL-2, IL-12, IL-15, fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (con A) y mitógeno de hierba carmín. Los WBC pueden resuspenderse en un volumen apropiado de medio RPMI 1640 complementado con FBS, IL-2 y una

concentración estimuladora de PHA. Entonces pueden transferirse a un recipiente de cultivo apropiado e incubarse durante un tiempo suficiente para expandirlos, por ejemplo, aproximadamente 2-3 días.

2. Después de expandir los linfocitos T, pueden congelarse, por ejemplo, a aproximadamente 3×10^6 células/vial usando medio RPMI 1640 complementado para crioconservación, por ejemplo, que contiene FCS y DMSO. Esto es suficiente para descongelar 5 ml de cultivo a 5×10^5 células viables/ml.

Se aprecia que un experto en la materia será capaz de averiguar cantidades apropiadas de citocinas estimuladoras de linfocitos T o mitógenos, aunque típicamente dichos agentes se añaden a cantidades entre aproximadamente 1 ng/ml y aproximadamente 25 ng/ml (o aproximadamente 100 U/ml) para citocinas. Para mitógenos, las concentraciones varían de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 10 µg/ml para mitógenos con la mayoría siendo eficaz en el intervalo bajo de µg/ml.

Actividad enzimática/ensayo de potenciación

Típicamente, los linfocitos T aislados anteriores (por ejemplo, aproximadamente $2{,}5 \times 10^6$) se cultivan en medio de cultivo (precedido por descongelación si están congelados), en un recipiente de cultivo apropiado en ausencia o presencia de la SPC, por ejemplo, DGJ, durante un tiempo suficiente para evaluar el cambio en la actividad de α-GAL, por ejemplo, 2 o 3 días. Las dosis de DGJ que se espera que potencien α-GAL están en un intervalo de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 150 µM, preferiblemente de aproximadamente 1 µM a 100 µM, y más preferiblemente de aproximadamente 5 µM a 50 µM. Puede añadirse DGJ a aproximadamente 20 µM. Las células pueden recogerse por centrifugación y lavarse dos veces con PBS. Los sedimentos pueden almacenarse congelados a -80 °C hasta que se ensayen para la actividad enzimática.

Las células entonces se lisan mediante la adición de tampón de lisis (o agua desionizada) y alteración física (pipeteo, agitación en vórtice y/o agitación, y/o sonicación) a temperatura ambiente o en hielo, seguido de combinación de los lisados en hielo, después división del lisado combinado en pequeñas alícuotas y congelación.

Los lisados pueden descongelarse inmediatamente antes del ensayo y deben suspenderse mediante el uso de una mezcladora con vórtice y sonicarse antes de la adición a los pocillos apropiados, por ejemplo, en una microplaca. Entonces se añade N-acetilgalactosamina (GalNAc) a cada pocillo (para inhibir la α-galactosidasa B), seguido de una corta incubación. Entonces se añade 4-metilumbeliferil-α-D-galactopiranósido (4-MU Gal) u otro sustrato de DGJ marcado apropiado, y la placa se mezcla suavemente durante un breve periodo de tiempo, se cubre y se incuba a 37 °C durante un tiempo suficiente para la hidrólisis del sustrato, habitualmente aproximadamente 1 hora. Para detener la reacción, se añade tampón de NaOH-glicina, pH 10,7, a cada pocillo y la placa se lee en un lector de placas fluorescentes (por ejemplo, Wallac 1420 Victor3™ o instrumento similar). Las longitudes de onda de excitación y emisión se establecen de forma personalizada a 355 nm y 460 nm, respectivamente. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 nmol de 4-metilumbeliferona por hora. Para cada muestra de paciente deben ensayarse al menos tres muestras normales simultáneamente.

Un experto en la materia podrá averiguar fácilmente diversas modificaciones de este ensayo. Ejemplos de sustratos artificiales que pueden usarse para detectar la actividad de α-GAL incluyen, aunque sin limitación, p-nitrofenil-α-D-galactopiranósido y 4-MU GAL. Obviamente, solamente los sustratos que pueden escindirse por α-GAL humana son adecuados para su uso. Se aprecia que, aunque se prefiere el uso de un sustrato fluorogénico, se contemplan otros métodos de determinación de la actividad de α-GAL para su uso en el método, incluyendo el uso de sustratos cromogénicos o técnicas de inmunocuantificación.

Diagnóstico y pronóstico. El ensayo de linfocitos T puede modificarse fácilmente para su uso como ensayo de diagnóstico para diagnosticar la enfermedad de Fabry simplemente eliminando la etapa de cultivo de linfocitos T en presencia de DGJ antes de realizar el ensayo de potenciación. La actividad de α-GAL en linfocitos T establecida de un individuo sospechoso de tener enfermedad de Fabry en su lugar puede cuantificarse usando linfocitos T de un individuo normal como control. Además, tanto los ensayos de actividad de α-GAL como de potenciación por SPC pueden realizarse casi simultáneamente usando los mismos linfocitos T derivados de una muestra de paciente. Como los linfocitos T pueden expresar más α-GAL (α-GAL en linfocitos T normales en comparación con WBC es mucho mayor), será más fácil confirmar con más exactitud si un paciente tiene actividad de α-GAL por debajo del intervalo normal porque el margen de error será más pequeño. Por consiguiente, el uso del ensayo de linfocitos T podría evitar posiblemente los diagnósticos incorrectos.

Además, también puede usarse el ensayo modificado para supervisar periódicamente el progreso de los pacientes en que se inició el tratamiento con SPC para confirmar que la actividad de α-GAL permanece aumentada con respecto a antes del inicio del tratamiento.

II. Ensayo *in vivo*

Los WBC pueden evaluarse para la potenciación de α-GAL por una SPC *in vivo.* En este caso, la actividad de α-GAL en WBC derivados de pacientes puede evaluarse antes de la administración de SPC, para obtener un valor basal.

Entonces a los pacientes se les administra DGJ diariamente (por ejemplo, 150 mg/día) durante un periodo de tiempo suficiente, por ejemplo, de aproximadamente 10 días a aproximadamente 2 semanas, seguido de la extracción de sangre y determinación de cambios en la actividad de α-GAL desde el valor basal. No se requiere el cultivo de las células antes o después de la administración.

La dosis y pauta de dosificación de la administración de DGJ durante el periodo de evaluación *in vivo* puede variar dependiendo del paciente, ya que hay mucha heterogeneidad entre las mutaciones, y dependiendo de la actividad de α-GAL residual del paciente. Como ejemplos no limitantes, se espera que las siguientes dosis y pautas sean suficientes para aumentar α-GAL en la mayoría de individuos "rescatables": 25 mg b.i.d; 50 mg una vez al día; 50 mg b.i.d.; 50 mg una vez en días alternos, 75 mg una vez al día; 75 mg b.i.d.; 100 mg una vez al día; 100 mg b.i.d.; 150 mg una vez al día; 150 mg b.i.d., 150 mg una vez en días alternos; 250 mg una vez al día; 250 mg b.i.d. y 250 mg una vez en días alternos.

De acuerdo con la presente invención, al paciente se le pueden administrar 150 mg de 1-desoxigalactonojirimicina o sal de la misma una vez en días alternos, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La administración de DGJ de acuerdo con la presente invención puede ser en una formulación adecuada para cualquier vía de administración, pero se administra preferiblemente por vía oral en una forma farmacéutica oral tal como un comprimido, cápsula o solución. Como un ejemplo, al paciente se le administran por vía oral cápsulas que contienen cada una 25 mg, 50 mg, 75 mg o 100 mg o combinaciones de las mismas. Para el ensayo, en el caso de administración oral, se prefiere que al paciente se le administre DGJ sin alimento (por ejemplo, sin alimento 2 horas antes y durante 2 horas después de la dosificación) ya que la biodisponibilidad puede ser menor si se toma con alimento, arriesgando de ese modo resultados imprecisos.

Los pacientes que han estado en otros tratamientos, tales como ERT, deben dejar el tratamiento durante al menos aproximadamente 28 días antes del ensayo *in vivo* para garantizar los resultados más precisos.

Separación de glóbulos blancos

Los WBC se aíslan y separan como se describe anteriormente para el ensayo *in vitro* de linfocitos T. Sin embargo, no tiene que añadirse medio RPMI o DMSO a los sedimentos antes de la congelación (como según la etapa 5 anterior).

Actividad enzimática/ensayo de potenciación

Los sedimentos se descongelan en hielo y las células entonces se lisan mediante la adición de tampón de lisis y alteración física (tal como mediante el uso de una mezcladora con vórtice y agitación, y/o sonicación a temperatura ambiente) durante un tiempo suficiente, seguido de combinación de los lisados en un tubo de polipropileno en hielo, después división del lisado combinado en alícuotas para la congelación.

Los lisados de WBC entonces se descongelan en hielo y se mezclan (de nuevo, por sonicación y/o agitación con vórtice). Las muestras de cada lisado, así como los patrones y controles negativos, se añaden entonces a los pocillos apropiados en, por ejemplo, una microplaca de 24 o 96 pocillos. Se añaden cantidades iguales de GalNAc a cada pocillo en, por ejemplo, tampón citrato/fosfato, pH 4,6, seguido de la adición de un sustrato marcado, tal como 4-MU Gal (también en tampón citrato/fosfato, pH 4,6) a todos los pocillos, e incubación durante un corto tiempo a temperatura ambiente. La placa entonces se mezcla brevemente y se incuba a 37 °C durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la hidrólisis del sustrato, por ejemplo, aproximadamente 1 hora. Después del periodo de tiempo suficiente, la reacción se detiene mediante la adición de tampón de parada y la placa se lee en un lector de placas fluorescentes (por ejemplo, Wallac 1420 Victor3™) para determinar la actividad enzimática por pocillo.

Un experto en la materia podrá averiguar fácilmente diversas modificaciones de este ensayo. Ejemplos de sustratos artificiales que pueden usarse para detectar la actividad de α-GAL incluyen, aunque sin limitación, p-nitrofenil-α-D-galactopiranósido y 4-MU Gal. Obviamente, solamente los sustratos que pueden escindirse por α-GAL humana son adecuados para su uso. Se aprecia que, aunque se prefiere el uso de un sustrato fluorogénico, se contemplan otros métodos de determinación de la actividad de α-GAL para su uso en el método, incluyendo el uso de sustratos cromogénicos o técnicas de inmunocuantificación.

Criterios de determinación de elegibilidad

Los criterios para determinar la elegibilidad para tratamiento con SPC dependen de la actividad enzimática residual del paciente al inicio, es decir, la actividad determinada en los linfocitos T no tratados en el ensayo *in vitro*, o la actividad en los WBC antes de la administración de SPC en el ensayo *in vivo*. Cuando menor sea la actividad residual, mayor será la potenciación necesaria para que un paciente se considere un probable respondedor al tratamiento.

Los criterios para determinar la elegibilidad para el ensayo *in vitro* pueden ser como sigue:

• Si la actividad de α-Gal A residual en los linfocitos es de menos de un 1 % de lo normal, entonces la actividad de α-GAL después de la incubación con DGJ debe ser al menos un 2 % de lo normal;

• Si la actividad de α-GAL residual en los linfocitos es entre un 1 % de los normal y <3 % de los normal, entonces la actividad de α-GAL después de la incubación con DGJ debe ser al menos 2x del nivel basal;

• Si la actividad de α-GAL residual en los linfocitos es entre un 3 % de los normal y <10 % de lo normal, entonces la actividad de α-GAL después de la incubación con DGJ debe ser al menos un 3 % de lo normal mayor que el nivel basal; y

• Si la actividad de α-GAL residual en los linfocitos es un 10 % de lo normal o más, entonces la actividad de α-GAL después de la incubación con DGJ debe ser al menos 1,3x el nivel basal.

Como alternativa, los pacientes con enfermedad de Fabry podrían clasificarse como elegibles para tratamiento con SPC si su actividad de α-GAL en linfocitos T en presencia de una SPC tal como DGJ es al menos aproximadamente 35-40 nmol/h/mg de proteína, que es aproximadamente un 58 % de lo normal. El promedio específico fue demasiado variable para presentarlo como media global. Por consiguiente, se compararon muestras de linfocitos T de los pacientes en la actividad con al menos tres controles normales recogidos en 48 h desde la fecha de recogida para la muestra del paciente y se cultivaron en condiciones idénticas (véase el ejemplo 1). Como comparación, la actividad de α-GAL en linfocitos T de pacientes con enfermedad de Fabry con A97V, R301Q y R111H al inicio fue 8 nmol/h/mg de proteína, 4 nmol/h/mg y 1,8 nmol/h/mg. Los linfocitos T expresan niveles mayores de α-GAL en comparación con otros WBC, de modo que se espera que la actividad de α-GAL en un cultivo enriquecido para linfocitos T sea significativamente mayor que lo que se considera normal en WBC totales (de 21 nmol/h/mg de proteína a aproximadamente 50 nmol/h/mg de proteína; Desnick *et al.*, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. 8.ª edición 2001, Scriver *et al.*, ed., pág. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York). Para una comparación, tres pacientes con enfermedad de Fabry que tienen las mutaciones R220X, R356W y G132R tenían actividad de α-GAL en WBC de 0,22, 0,18 y 0,26 nmol/h/mg de proteína, respectivamente.

Para el ensayo *in vivo*, pueden usarse los siguientes criterios para determinar los criterios de elegibilidad:

• Si α-GAL basal es de menos de un 1 % de los normal, entonces la actividad de α-GAL del día 15 después del tratamiento con DGJ debe ser al menos un 2 % de los normal;

• Si α-GAL basal es entre un 1 % de lo normal y <5 % de lo normal, entonces la actividad de α-GAL debe ser al menos 2× el nivel basal después del periodo de tratamiento;

• Si α-GAL basal es entre un 5 % de los normal y <10 % de lo normal, entonces la actividad de α-GAL debe ser al menos un 5 % de lo normal mayor que el nivel basal después del periodo de tratamiento; y

• Si α-GAL basal es un 10 % de lo normal o más, entonces la actividad de α-GAL debe ser al menos 1,5× el nivel basal después del periodo de tratamiento.

Como alternativa, un aumento en la actividad de al menos aproximadamente un 20 % en las células cultivadas con SPC sobre la actividad en las células no cultivadas con SPC, en el ensayo *in vitro* o *in vivo*, puede ser indicativa de que el paciente tendrá una respuesta clínicamente relevante (terapéuticamente eficaz) al tratamiento con SPC.

Este descubrimiento proporciona un método para mejorar el diagnóstico de y facilitar las decisiones de tratamiento clínico para enfermedad de Fabry en particular, y enfermedades de almacenamiento lisosómico en general. Además, este método puede ampliarse a una amplia gama de enfermedades genéticamente definidas en tipos celulares apropiados. Esta clase de enfermedad incluye los otros trastornos de almacenamiento lisosómico, fibrosis quística (CFTR) (células respiratorias o epiteliales de glándulas sudoríparas), hipercolesterolemia familiar (receptor de LDL; LPL-adipocitos o células endoteliales vasculares), cáncer (p53; células tumorales PTEN) y amiloidosis (transtiretina) entre otros.

Kits

También se describe un kit de ensayo de diagnóstico comercial para tomar decisiones de tratamiento terapéutico. El kit proporciona todos los materiales analizados anteriormente y más particularmente en los ejemplos a continuación, para preparar y ejecutar cada ensayo en un envase conveniente, con la excepción obvia de la sangre del paciente, opcionalmente incluyendo instrucciones y una guía analítica.

Como un ejemplo no limitante, un kit para evaluar la actividad de α-GAL puede contener, como mínimo:

a. al menos un agente estimulador de linfocitos T;

b. una chaperona farmacológica específica;

c. un sustrato cromogénico o fluorogénico para el ensayo enzimático (incluyendo un patrón apropiado); y

d. GalNAc.

El kit también puede contener instrucciones para realizar de forma óptima el ensayo de potenciación proteínica. El kit puede contener los tubos, tampones (por ejemplo, tampón de lisis) y microplacas adecuados.

La SPC puede suministrarse en forma seca, y reconstituirse antes de la adición.

También se describe un kit para el diagnóstico de enfermedad de Fabry. En este caso, la SPC no se incluye en el kit y las instrucciones están adaptadas específicamente para el diagnóstico.

Los pacientes que dan positivo en el ensayo para la potenciación enzimática con una SPC entonces pueden tratarse con ese agente, mientras que los pacientes que no presentan potenciación enzimática con un agente específico pueden evitar el tratamiento ahorrando dinero y evitando el daño emocional de no responder a una modalidad de tratamiento.

Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, presentados a continuación. El uso de dichos ejemplos es solamente ilustrativo y de ninguna manera limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado.

Ejemplo 1: Método *in vitro* para evaluar los efectos de una SPC sobre la actividad de a-GAL

El presente ejemplo proporciona el ensayo de diagnóstico *in vitro* para determinar la sensibilidad de un paciente con enfermedad de Fabry a una chaperona farmacológica específica.

A. Preparación de sedimentos de WBC humanos para el crecimiento de linfocitos T

1. Materiales:

- Tubo CPT: Becton-Dickenson (BD Vacutainer® CPT™ tubo de preparación celular con citrato de sodio, cat. 9 362761).
- IL-2 humana (recombinante), PreProTECH, cat. n.º 200-02
- Fitohemaglutinina (forma M) (PHA), líquida, Invitrogen, cat. n.º 10576-015
- Medio RPMI-1640, Mediatech Inc., cat. n.º 10-040-CV
- Suero bovino fetal, Mediatech Inc., cat. n.º 35-010-CV
- Ácido cítrico, monohidrato, ACS, Mallinckrodt, cat. n.º 0627
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), ACS, Mallinckrodt cat. n.º 7917
- Hidróxido de sodio, solución volumétrica 10N, Mallinckrodt cat. n.º H385
- Ácido fosfórico, ACS, Mallinckrodt cat. n.º PX0995-3
- 4-MU α-D-galactopiranósido (4-MU-Gal), Sigma cat. n.º M-7633
- N-Acetil-D-galactosamina (GalNAc), Sigma cat. 4 A-2795
- 4-Metilumbeliferona (4-MU), Sigma cat. n.º M-1381
- Glicina, calidad de histocultivo, Fisher cat. n.º BP381
- Agua doblemente desionizada
- Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, PBS (sin Ca, sin Mg), Mediatech Inc. cat. 4 21-031-CV
- Kit de ensayo de proteína BCA Micro, Pierce cat. n.º 23235

• Placas de microvaloración de 96 pocillos, Costar de poliestireno negro de 96 pocillos de fondo redondo, cat. n.º 3 792

• Microplacas tratadas de histocultivo de 24 pocillos Costar, Corning Life Sciences, cat. n.º 3526

• Tubo Falcon de polipropileno de 15 ml, Becton Dickinson, cat. 4 352097

• Crioviales estériles

• Estufa de incubación humidificada con un 5 % de CO_2, 37 °C

• Baño de agua a 37 °C

• Lector de placas fluorescentes

2. Separación de WBC:

• Se extrajo sangre del paciente en un tubo CPT de 8 ml, que se ha almacenado a 18-25 °C.

• Inmediatamente después de recoger la sangre, se mezcló invirtiendo el tubo 8-10 veces.

• El tubo se centrifugó a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos a 1800 × g usando una centrífuga de sobremesa equipada con cubos oscilantes. Se tomaron precauciones universales para manipular las muestras de sangre, incluyendo el uso de un cubo de tipo bote cerrado para la centrifugación.

• Después de la centrifugación, varias capas de la composición de sangre se volvieron distinguibles, que representaban la separación de los glóbulos rojos del plasma y los glóbulos blancos. Si esto no sucede, se templa en las manos durante 5 minutos y se centrifuga de nuevo.

3. Lavado de WBC

• La mitad de la capa de plasma se aspiró por vacío y se descartó sin alterar la capa leucocitaria. Todo el fluido restante, incluyendo la capa celular, se transfirió con una pipeta Pasteur a un tubo de centrífuga Falcon de tapón a rosca cónico de 15 ml.

• Se añadió PBS para llevar el volumen hasta 14 ml y el tubo se mezcló por inversión.

• El tubo se centrifugó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos a 1300 rpm (aproximadamente 320 × g).

• Inmediatamente después de la centrifugación, la mayor cantidad posible de sobrenadante se aspiró por vacío y se descartó sin alterar el sedimento celular.

4. Lavado opcional

• El sedimento celular se resuspendió en el líquido restante golpeando contra el fondo del tubo.

• Se añadieron 10 ml de PBS a las células resuspendidas, y se centrifugaron a temperatura ambiente durante 20 minutos a 1300 rpm.

• Inmediatamente después de la centrifugación, la mayor cantidad posible de sobrenadante se aspiró por vacío y se descartó sin alterar el sedimento celular.

5. Opcional: Congelación de sedimento de WBC

• El sedimento celular se mezcló en el líquido restante golpeando con un dedo contra el fondo del tubo.

• Se añadieron de 0,5 a 1 ml de PBS a las células resuspendidas y una mitad del sedimento se transfirió (usando una punta estéril en una micropipeta) a un criovial de 1,8 ml etiquetado.

• El criovial se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 5000 rpm (aproximadamente 2250 g) en una microcentrífuga.

• Todo el líquido sobrenadante se descartó usando una pipeta Pasteur sin alterar el sedimento celular.

• Después se añadieron de 0,5 a 1 ml de RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % y DMSO al 5 % al tubo y se mezclaron con una pipeta y se congelaron durante una noche a - 80 °C antes de transferirlo a un congelador de almacenamiento celular de nitrógeno líquido.

B. Establecimiento de cultivos de linfocitos T a partir de muestras de sangre

1. Las células lavadas se resuspendieron en 3,0 ml de medio RPMI 1640 con un 10 % de suero de ternera Cosmic (CCS, Hyclone Laboratories, Logan, UT), aproximadamente 25 ng/ml de IL-2 (PreProTECH, Rocky Hill, NJ) y la concentración recomendada por el fabricante de PHA (Life Technology, Gaithersburg, MD). Las células entonces se transfirieron a un matraz de cultivo de 25 cm^3 vertical y se incubaron durante 3-4 días a 37 °C, 5 % de CO_2.

2. El cultivo celular se diluyó hasta 5 ml con medio de cultivo (RPMI-1640, 10 % de FBS, 25 ng/ml de IL-2). La concentración celular entonces se ajustó hasta aproximadamente 5×10^5 células/ml en el matraz.

3. El crecimiento de las células se supervisó diariamente. Las células se mantuvieron entre 5×10^5 y $1,5 \times 10^6$ células en un matraz vertical. La profundidad del medio en el matraz no excedió de 1 cm (aproximadamente 7 ml en un T25 y 20 ml en un T75). Los cultivos pueden mantenerse durante aproximadamente 21 días con un tiempo de duplicación de aproximadamente 24 h. La senescencia del cultivo fue evidente por una reducción dramática en la tasa de crecimiento. El tiempo de cultivo posiblemente puede prolongarse por reestimulación con PHA.

4. Opcional - congelación de linfocitos T: Los linfocitos T puede congelarse a 3×10^6 células/vial usando medio RPMI1640 que contiene un 20 % de FCS y un 7,5 % de DMSO. En el día 5, 6 o 7 se crioconservan tantos viales como sea posible a 3×10^6 células/vial. Esto es suficiente para descongelar 5 ml de cultivo a 5×10^5 células viables/ml.

Cuando se establecen cultivos de linfocitos T, debe apreciarse lo siguiente.

• Deben recogerse muestras frescas de sangre en tubos heparinizados (o tubos que contienen un anticoagulante apropiado) y usarse el mismo día. Deben usarse tubos ACD si las muestras no pueden procesarse en 24 horas. (Clin Chem 1988 enero; 34(1): 110-3; Clin Diagn Lab Immunol. 1998 noviembre; 5(6):804-7.).

• Habitualmente son suficientes 8-10 ml de sangre para establecer 20 millones de células en el día 5.

• Los linfocitos T son las dianas específicas del virus VIH. Se tiene extremo cuidado si se desconoce el estado de VIH del paciente.

• Cada nuevo lote de IL-2 debe ensayarse para determinar la concentración óptima. El lote de PreProTECH usado para estos experimentos se encontró óptimo en 25 ng/ml con solamente una ligera reducción en el crecimiento celular a concentraciones de hasta 50 ng/ml.

• Cada lote de mitógenos, por ejemplo, fitohemaglutinina A (PHA), se ensaya por el proveedor (Invitrogen) y debe usarse a la dilución recomendada.

• Todos los cultivos se mantienen en una atmósfera saturada de agua a 37 °C, 5 % de CO_2.

• También puede recogerse leucocitos monomorfonucleares y linfocitos usando medio de separación de linfocitos (Ficoll-Hypaque) o tubos Lymphoprep siguiendo el procedimiento convencional del fabricante.

Cuando se analiza por clasificación celular activada fluorescente, la pauta de estimulación con IL-2 y PHA provoca un 99 % de células CD3-positivas (que se tiñe en todos los subconjuntos de linfocitos T), con números iguales de células CD4-positivas y CD4-negativas (datos no mostrados).

C. Tratamiento de chaperona

La densidad de los linfocitos T se ajustó hasta 1×10^6 por 3 ml de medio de cultivo (RPMI-1640, 10 % de FBS, 25 ng/ml de IL-2). Después se pipetearon 3 ml (~1×10^6 células) en cada uno de los 6 pocillos de una placa de cultivo de 6 pocillos etiquetada y se incubaron durante una noche a 37 °C, 5 % de CO_2. Después se añadieron 3 ml de medio adicional a 3 pocillos para dar un volumen final de 6 ml/pocillo. A los tres pocillos restantes, se añadieron 3 ml de medio que contenía DGJ (Cambridge Major Laboratories, Inc., Germantown, WI) a una concentración de aproximadamente 40 µM (2x; la concentración final es 20 µM), durante 4-5 días. Las células se recogieron por centrifugación (400 × g durante aproximadamente 10 minutos) y se lavaron 1x en 10 ml de PBS. Los sedimentos resultantes se resuspendieron en 1 ml de PBS y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml y se centrifugaron en una microcentrífuga refrigerada a 3000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y los sedimentos se almacenaron congelados a -80 °C hasta que se ensayaron para la actividad enzimática.

Obsérvese que antes de realizar el ensayo de potenciación, la concentración óptima de DGJ se determinó usando un intervalo de 2 nM-200 µM. Se determinó que 20 µM era óptimo.

D. Preparación de fibroblastos

Para una comparación, se prepararon cultivos de fibroblastos como se describe previamente (por ejemplo, documento U.S. 6.274.597). En resumen, los cultivos de fibroblastos se obtuvieron de biopsias de piel de pacientes y se cultivaron en DMEM con un 10 % de FBS hasta que se establecieron (3-4 semanas).

E. Ensayo de actividad

Antes del ensayo, los linfocitos T se descongelaron en hielo y se sonicaron durante 2 minutos, y todos los demás reactivos de ensayo se descongelaron a temperatura ambiente. Se realizó ensayo fluorométrico de la actividad de α-GAL esencialmente como se describe previamente (Kusiak *et al.*, J Biol Chem. 1978; 253(1), 184-190). Las células se lisaron en 0,2 ml de agua desionizada combinada con pipeteo vigoroso y agitación con vórtice. El sobrenadante obtenido después de centrifugación a 13 000 rpm durante 2 min a 4 °C se puso en un tubo nuevo y se usó como fuente de α-GAL. La actividad de α-GAL se determinó incubando alícuotas de 50 µl del sobrenadante (que contenía cantidades comparables de proteína determinadas usando 20 µl en un ensayo de cuantificación convencional de proteínas) en una microplaca de 24 pocillos a 37 °C con 4-metilumbeliferil-α-D-galactopiranósido (4-MU Gal) 3,75 mM (Research Products International, Mount Prospect, IL) en el tampón de ácido cítrico/fosfato (tampón citrato 27 mM/fosfato 46 mM pH 4,6) sin taurocolato y con BSA (3 mg/ml). El porcentaje de α-GAL se determinó comparando la actividad total con la actividad observada en presencia de N-acetil galactosamina (GalNAc) 117 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), un inhibidor específico de N-acetilgalactosaminidasa. Se usó un lector de detección de fluorescencia Wallac 1420 Victors™ (Perkin Elmer, CA) para medir la 4-MU liberada a longitudes de onda de excitación y emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente. También se emplearon pocillos apropiados para patrones fluorescentes, y negativos (sin sustrato o sin lisado). Para cada muestra de paciente se ensayaron al menos tres muestras normales simultáneamente.

Las incubaciones fuero típicamente de 30 minutos de duración, pero pueden emplearse periodos más largos o más cortos con resultados similares.

La actividad enzimática (nmol/h/mg de proteína) se calculó de acuerdo con lo siguiente:

$$\frac{\text{Fluorescencia de muestra}}{\text{Fluresencia de patrón}} * \frac{60\ \text{min}}{\text{tiempo de incubación(min)}} * \frac{1000\ \mu\text{l}}{\text{volumen ensayado (µl)}} * \frac{1}{\text{valor de proteína}} (\text{mg/ml})$$

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 nmol de 4-metilumbeliferona por hora. El "ruido" basal en el resultado de fluorescencia se obtuvo evaluando el promedio del blanco seis veces. Si la actividad después del tratamiento con SPC estaba al menos 2 desviaciones típicas por encima de la medida inicial, se consideró sensible y no ruido.

Para el ensayo comparativo de potenciación de fibroblastos, se cultivaron fibroblastos (-1,5 × 10^6) en 12 ml de medio de cultivo en un matraz de histocultivo T75 en ausencia o presencia de DGJ a 20 µM durante 3 días. Al final del periodo de incubación, las células se retiraron del matraz por tratamiento con solución de tripsina-EDTA, se recogieron por centrifugación y se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato. Los sedimentos celulares se congelaron a -80 °C hasta que se ensayaron para la actividad de α-GAL. Todas las etapas para procesar el sedimento celular para el ensayo, incluyendo el tampón de extracción, el tiempo de sonicación y los volúmenes usados son las mismas que las usadas para los linfocitos T ensayados anteriormente.

F. Transferencias de Western

El nivel de proteína α-GAL se midió por transferencia de Western. La proteína se determinó usando un kit de ensayo de proteína BCA Micro (Pierce, Rockford, IL) con seroalbúmina bovina (BSA) como patrón. Se midió la absorbancia a 562 nm usando el lector de absorbancia Molecular Devices VersaMax en un formato de 96 pocillos. Para electroforesis en gel antes de la transferencia de Western, se separaron las proteínas usando Tris-glicina Novex natural o SDS-PAGE en geles con gradiente de un 8,16 % (Invitrogen). Las transferencias de Western se revelaron usando anticuerpo policlonal de conejo contra α-GAL y se realizaron como se describe previamente (Park *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100: 3450-54).

Resultados

Este método descrito anteriormente usando linfocitos T es rápido y eficaz en comparación con ensayos de α-GAL basados en fibroblastos realizados sustancialmente de forma similar al ensayo de linfocitos T (excepto que se sembraron aproximadamente 1,5 × 10^6 fibroblastos en cada pocillo en lugar de 2,5 × 10^6 linfocitos T).

Usando este método, se incubaron los linfocitos T de pacientes con enfermedad de Fabry sin y con 20 µM de DGJ durante 1, 2 y 4 días, respectivamente y la actividad de α-GAL se midió en los homogeneizados celulares y se compararon con valores de control normales. Cuando se repiso el medio después de 2 días y las células se incubaron

durante 2 días adicionales, la actividad de α-GAL de A97V era un 13 % del control normal (figura 1, círculos vacíos). Sin embargo, cuando se añadió DGJ 20 µM al medio de los linfocitos T, la actividad de α-GAL aumentó hasta aproximadamente un 40 % de lo normal después de solamente 1 día de incubación y continuó hasta un 80 % de lo normal después de 4 días de incubación (figura 1, círculos rellenos). La adición de DGJ y medio fresco después de 2 días e incubación durante 2 días adicionales no provocó ningún cambio en el perfil a partir de los observado con una sola adición de DGJ. El aumento observado en la actividad después de 3 días hasta un nivel claramente distinguible de la actividad de α-GAL sin DGJ dio lugar a la adopción de un tiempo convencional de medición después de 3 días de incubación con 20 µM de DGJ en posteriores experimentos. El uso de un ciclo de tiempo de tres días evita la necesidad de proporcionar medio fresco y/o dividir las células después de 3 días en cultivo.

Para determinar el efecto de la dosificación de DGJ en linfocitos T a partir de los controles normales, se midió la actividad de α-GAL en células de pacientes usando un intervalo de DGJ de 2 nM a 200 µM (figura 2A) y se comparó con valores de control normales sin tratar ensayados en el mismo día. La actividad de α-GAL aumentó entre 2 nM y 20 µM de DGJ. A 200 µM, DGJ inhibió la actividad normal de α-GAL hasta aproximadamente un 40 % del promedio de controles normales no tratados. La potenciación óptima de la actividad de α-GAL mutada dentro de este mismo intervalo de concentración de DGJ se determinó para la mutación A97V y se comparó con controles normales (figura 2B). Se realizaron tres experimentos separados para los efectos de la dosificación sobre A97V. DGJ en concentraciones de 2 nM a 20 µM aumentó la actividad de α-GAL de A97V de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, a concentraciones de DGJ de 200 µM, hubo una disminución en la actividad de α-GAL en comparación con su nivel más alto cuando las células se cultivaron en DGJ 20 µM. En los tres experimentos, la potenciación óptima de la actividad de la mutación A97V se observó a 20 µM de DGJ con actividad ligeramente menor a 2 y 200 µM. Cuando se ensayaron las mutaciones R112H y R301Q en el mismo intervalo de concentración, surgió un patrón similar con el nivel más alto de actividad potenciada observada a 20 µM de DGJ (figuras 2C). Los resultados mostraron que diversas mutaciones tenían perfiles de respuesta a la dosificación similares, pero diferentes niveles de potenciaciones. Entre los tres genotipos mutantes de α-GAL ensayados para los efectos de la dosificación, DGJ 20 µM provocó un aumento en α-GAL hasta al menos un 50 % del control normal.

Se ha observado el efecto de rescate de α-GAL mutante de pacientes con enfermedad de Fabry con al menos 11 genotipos distintos usando una chaperona farmacológica usando este ensayo de α-GAL basado en linfocitos T. Los resultados, presentados en la tabla 1, a continuación, mostraron que DGJ potenciaba la actividad de al menos cinco formas mutantes distintas de α-GAL en linfocitos T (T) y fibroblastos (F). Sin embargo, la chaperona farmacológica no potenció la actividad de cuatro formas mutantes distintas de α-GAL. Se potenció la actividad de α-GAL de un paciente con enfermedad de Fabry clásica por DGJ al nivel intermedio. La importancia de este ensayo recae en el hecho de que puede usarse para cribar pacientes que pudieran beneficiarse de la administración de chaperona farmacológica, evitando, por tanto, el gasto y la frustración de un tratamiento innecesario y biopsias de tejido.

Tabla 1

Número de muestra	Paciente/ normal	Sexo	Mutación	Número de réplicas (n=)	Actividad (% de lo normal) (- DGJ)	(+ DGJ)	Relación de potenciación	Grupo
1	PT	M	T41I	3	48	147	3	E
2	PT	M	T41I	4	61	175	2,9	E
3	PT	M	M51K	2	6	29	4,6	E
4	PT	M	A97V	3	14	75	5,5	E
5	PT	M	R112C	1	10	36	3,8	E
6	PT	M	R112C	3	8	49	6,3	E
7	PT	M	R112H	2	3	51	15,9	E
8	PT	M	R112H	2	8	73	9,4	E
9	PT	M	R112H	3	3	60	20	E
10	PT	M	A143T	4	31	69	2,2	E
11	PT	M	A143T	5	49	62	1,3	E
12	PT	M	S201F	1	9	82	9,6	E
13	PT	M	P205T	1	37	108	2,9	E
14	PT	M	N215S	2	15	79	5,2	E
15	PT	M	P259R	1	9	297	32,6	E
16	PT	M	P259R	3	3	138	47,4	E
17	PT	M	F286C	3	1	28	32,3	E
18	PT	M	L300P	5	2	72	36,1	E
19	PT	M	R301Q	1	7	91	12,3	E
20	PT	M	R301Q	3	22	204	9,1	E
21	PT	M	R301Q	4	7	80	12,1	E
22	PT	M	G328A	4	2	54	24,6	E
23	PT	M	R49C	9	3	11	4,3	I
24	PT	M	Y207S	3	4	15	3,5	I
25	PT	M	S276G	1	0	9		I
26	PT	M	S276G	3	1	12	9,8	I
27	PT	M	C94S	2	2	2	NE	NE
28	PT	M	G128E	1	2	4	NE	NE
29	PT	M	G128E	5	2	2	NE	NE
30	PT	M	G132R	3	1	2	NE	NE
31	PT	M	A143P	2	2	1	NE	NE
32	PT	M	A143P	2	1	1	NE	NE
33	PT	M	R220X	3	0	1	NE	NE
34	PT	M	R227Q	3	4	3	NE	NE
35	PT	M	W236R	3	1	2	NE	NE
36	PT	M	G261D	1	0	1	NE	NE
37	PT	M	G271C	1	2	3	NE	NE
38	PT	M	G271C	3	1	2	NE	NE
39	PT	M	N272K	1	0	0	NE	NE
40	PT	M	W287C	1	1	1	NE	NE
41	PT	M	W287C	1	1	2	NE	NE
42	PT	M	R356W	1	1	1	NE	NE
43	PT	M	R356W	4	0	0	NE	NE
44	PT	M	dE358	3	2	4	NE	NE
45	PT	M	L415P	1	0	3	NE	NE
46	PT	M	desconocido	1	1	2	NE	NE
47	PT	M	desconocido	2	0	1	NE	NE
48	PT	M	1042insG	3	1	1	NE	NE
49	PT	M	256delT	1	0	0	NE	NE

50	PT	M	30delG	6	2	2	NE	NE
51	PT	M	82insG	2	1	0	NE	NE
52	PT	M	del28bp21	1	0	1	NE	NE
53	PT	M	del28bp21	1	0	0	NE	NE
54	PT	M	ivs4-1g/a	2	0	0	NE	NE
55	PT	M	Q119X	1	2	1	NE	NE
56	PT	M	R220X	3	0	1	NE	NE
57	PT	M	R301X	4	0	7	NE	NE
Todos NL	NL	M o F		162	101	128	1,3	
Todos NL Masculino	NL	M		115	101	124	1,2	
Todos NL Femenino	NL	F		47	84	117	1,4	
58	NL	F		8	120	161	1,3	
59	NL	F		3	88	100	1,1	
60	NL	F		1	95	120	1,3	
61	NL	F		9	85	104	1,2	
62	NL	F		8	103	160	1,5	
63	NL	F		3	107	165	1,5	
64	NL	F		15	108	145	1,4	
65	NL	M		8	100	97	1	
66	NL	M		4	80	141	1,8	
67	NL	M		1	172	198	1,1	
68	NL	M		1	271	315	1,2	
69	NL	M		1	110	140	1,3	
70	NL	M		1	101	145	1,4	
71	NL	M		19	106	138	1,3	
72	NL	M		11	90	131	1,4	
73	NL	M		4	75	99	1,3	
74	NL	M		10	105	126	1,2	
75	NL	M		3	97	100	1	
76	NL	M		2	93	108	1,2	
77	NL	M		3	85	116	1,4	
78	NL	M		3	89	118	1,3	
79	NL	M		1	127	107	0,8	
80	NL	M		42	100	117	1,2	
81	NL	M		1	102	111	1,1	

Abreviaturas usadas: PT: paciente; NL: individuo normal; E: potenciable; I: potenciable (intermedio); NE: no potenciable;

Se determinó que la potenciación óptima de la actividad de α-GAL mutada en el ensayo *in vitro* se conseguía usando aproximadamente 20 µM de DGJ. Entre los tres genotipos mutantes de α-GAL ensayados para los efectos de la dosificación, DGJ 20 µM provocó un aumento en α-GAL hasta al menos un 50 % del control normal para cada uno (figura 3).

En la tabla 1, el grupo potenciable incluía pacientes cuya actividad de α-GAL era al menos un 50 % de los controles normales cuando se cultivaba en presencia de DGJ (por ejemplo, R112H se potenciaba hasta un 60 % de la actividad de control normal). Se incluían en el grupo potenciable las mutaciones A97V, R301Q, R112H y L300P. Por ejemplo, la actividad de la mutación A97V aumentó desde un 14 hasta un 75 % de lo normal en presencia de DGJ, un aumento de 6 veces. Asimismo, R301Q aumento desde un 7 hasta un 80 % de lo normal con 12 veces, y R112H aumentó

desde un 3 hasta un 60 %, un cambio de casi 20 veces. Además, la actividad en la mutación L300P se aumentó desde un 2 % hasta un 72 % de lo normal, un aumento de 37 veces, que fue el más alto entre las mutaciones potenciables examinadas. L300P fue inusual en que algo de la actividad sin DGJ estuvo por debajo del umbral mínimo para la detección. Estos resultados demuestran niveles y relaciones de potenciación dependientes de la mutación.

Las transferencias de Western mostraron que la intensidad de la banda se aumentaba considerablemente por tratamiento con DGJ en células de control normales y aquellas con la mutación A97V y con la R301Q, mientras no se observó aumento para R356W, G132R y A143P (figura 3). Parece que la proteína se ha desplazado a un peso molecular aparente más bajo, que indica maduración de la enzima por paso desde el retículo endoplásmico, a través del aparato de Golgi hasta el lisosoma. Las transferencias de Western muestran que la potenciación de la actividad de α-GAL por DGJ se correlaciona con una cantidad aumentada de proteína α-GAL. Aún no se ha observado un caso donde niveles aumentados de proteína medidos por transferencias de Western no produjeran actividad enzimática mayor.

Análisis

El uso de linfocitos T en un sistema de ensayo para la potenciación de enzimas por SPC ofrece ventajas significativas en la velocidad del ensayo y la conveniencia sobre otros sistemas de cultivo. Una etapa crucial en la determinación de los pacientes que pueden beneficiarse de tratamiento con SPC fue el desarrollo de un método rápido y fiable para cribar células derivadas de pacientes para la potenciación de la actividad de α-GAL por DGJ. Los resultados demuestran un método para generar rápidamente un cultivo celular de vida corta que permite el ensayo de la potenciación y también proporciona un sistema útil para estudios futuros sobre el mecanismo de acción o para el cribado de moléculas chaperonas adicionales. Los leucocitos tradicionalmente usados para el diagnóstico del estado afectado y portador no sobreviven lo suficiente para permitir ensayos repetidos si fuera necesario.

Aunque se han ensayado linfoblastos B transformados con virus de Epstein-Barr (Fan *et al.*, Nat Med. 1999; 5(1), 112-115) y cultivos de fibroblastos primarios (Fan, *supra;* Mayes *et al.*, Clin Chim Acta. 1981; 112(2), 247-251), estos no son convenientes para uso a gran escala para cribar pacientes para estudios clínicos. Los cultivos de fibroblastos primarios requieren una biopsia de perforación de la piel invasiva y generalmente se tarda al menos de tres a cuatro semanas en crecer suficientes células para el ensayo. Los linfoblastos de linfocitos B requieren un proceso transfección con virus de Epstein Barr y selección, lo que lleva mucho tiempo y trabajo, además de tener efectos desconocidos sobre la actividad enzimática.

En este documento se describe un método para establecer cultivos de linfocitos T a partir de sangre fresca de individuos de control normales y pacientes con enfermedad de Fabry. Estos cultivos pueden cultivarse para su uso en un ensayo de potenciación para α-GAL en 7 a 10 días. Estos datos también muestran que la eficacia de la potenciación de DGJ fue evidente después de aproximadamente 3 días en el medio de cultivo de linfocitos T. Los datos generados son una medida reproducible del grado de actividad enzimática potenciada por una SPC para un genotipo específico.

Este método puede usarse para otros ensayos de potenciación basada en SPC de otras enfermedades genéticas, incluyendo glucoesfingolipidosis, mucopolisacaridosis y enfermedad de almacenamiento de glucógeno (Pompe) y puede ampliarse como protocolo de investigación y clínico en una amplia gama de enfermedades definidas genéticamente, tales como fibrosis quística (CFTR) y cáncer (p53, PTEN) y otras.

Ejemplo 2: Método *in vivo* para evaluar los efectos de una SPC sobre la actividad de α-GAL

Este ejemplo describe los resultados de un estudio en fase II sin enmascaramiento de DGJ en pacientes con enfermedad de Fabry (n = 11) con 10 diferentes mutaciones de α-GAL y apoya el uso del ensayo *in vivo*. Los pacientes se seleccionaron para el estudio en fase II en función del aumento en la actividad de α-GAL en el ensayo de linfocitos T descrito anteriormente. Los genotipos fueron como sigue: T41L (2 pacientes); A143T; A97V; M51K; S276G; L300P; G328A, P205T, N215S; y L415P.

A algunos pacientes (8) se les administró DGJ de acuerdo con el siguiente programa de dosificación: 25 mg b.i.d. dos semanas; 100 mg b.i.d. semanas 2-4; 250 mg b.i.d. semanas 4-6; y 25 mg b.i.d. semanas 6-12. Tres pacientes recibieron 150 mg de DGJ en días alternos durante todo el estudio. Se extrajo sangre en un tubo CPT Vacutainer de 8 ml al final de cada periodo de dosificación y se trató como se describe a continuación.

A. Preparación de sedimentos de WBC humanos para ensayo

Se prepararon WBC sustancialmente como se describe en el ejemplo 1, con la excepción de que no se añade PBS/DMSO al sedimento antes de la congelación.

Los datos preliminares se resumen en la siguiente tabla.

B. Preparación de lisados de WBC humanos para ensayo

• A los microtubos que contenían el sedimento de WBC, se añadieron 0,6 ml de tampón de lisis (citrato 26 mM/fosfato 46 mM, pH 5,5)

• Los tubos se agitaron con vórtice hasta que las células se resuspendieron

• Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, pero se agitó la suspensión con vórtice cada dos minutos

• Los tubos se sonicaron durante 2 minutos, después se agitaron con vórtice durante aproximadamente 10 segundos

• Los lisados se incubaron en hielo hasta que se enfriaron, y después se combinaron en un recipiente de polipropileno preenfriado (en hielo)

• El recipiente se agitó en vórtice y los lisados combinados se dividieron en alícuotas de 0,100 ml en tubos de microcentrífuga de polipropileno con tapón a rosca de 0,5 ml etiquetados. Los lisados combinados se mezclaron mientras se dividían en alícuotas agitando con vórtice entre cada 10-20 alícuotas.

• Las alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

C. Ensayo de WBC humanos

• Cada tubo que contenía lisado se descongeló en hielo, se sonicó durante 2 minutos, después se agitó con vórtice durante 1 minuto.

• Se añadieron 50 µl de cada muestra de patrón, de control o clínica en los pocillos apropiados de una microplaca de poliestireno negra (se usan 50 µl de BSA al 0,5 % en el tampón de lisis de WBC para un patrón)

• Se añadieron 50 µl de GalNAc 117 mM a todos los pocillos, y la placa se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente;

• Se añadieron 50 µl de sustrato 4-MU Gal 5 mM a todos los pocillos y los pocillos se mezclaron en un agitador de placas durante 30 segundos

• La placa se cubrió y se incubó durante aproximadamente 1 hora a 37 °C

• Se añadieron 100 µl de tampón de NaOH/glicina 0,2 M, pH 10,7 a cada pocillo para detener la reacción

• La placa se leyó usando un lector de placas fluorescentes como se describe en el ejemplo 1

Resultados

Los datos disponibles de los primeros once pacientes tratados con DGJ durante al menos 12 semanas sugieren que el tratamiento con DGJ da lugar a un aumento en la actividad de la enzima deficiente en enfermedad de Fabry en 10 de los 11 pacientes (figura 4). El paciente con el genotipo L415P no mostró un aumento después de DGJ (a las 6 semanas) (figura 5). Con el propósito de calcular el porcentaje de lo normal en la tabla, el nivel de α-GAL que es normal se obtuvo usando el promedio de los niveles de α-GAL en glóbulos blancos de 15 voluntarios sanos del estudio en fase I de múltiples dosis. Los 11 pacientes representaban 10 mutaciones genéticas diferentes y tenían niveles basales de α-GAL que variaban de cero a un 30 % de lo normal.

Los datos muestran un promedio de aumento de 2 veces en la actividad de α-GAL, y hasta 10 veces y 15 veces en algunos pacientes, medido en glóbulos blancos. La actividad permaneció elevada de 6-24 semanas e incluso cuando la dosis se redujo de nuevo a 25 mg b.i.d (datos no mostrados).

Análisis

En función de estos resultados, parece posible cribar pacientes candidatos para su elegibilidad para chaperona usando un ensayo *in vivo* o un ensayo *in vitro* usando linfocitos T como se describe en el ejemplo 1, ya que 10 de 11 pacientes que mostraron un aumento significativo en la actividad de α-GAL en el ensayo de linfocitos T mostraron un aumento después de un tratamiento de 2 semanas con DGJ. Realizan un cribado *in vivo* puede permitir una evaluación más precisa de la respuesta *in vivo* a DGJ y otros tratamientos con chaperona, ya que el ensayo *in vitro* puede no ser completamente predictivo de una respuesta *in vivo* debido a interacciones sistémicas, y puede ser especialmente útil para determinar la dosificación apropiada. Este drástico aumento en la actividad apareció después de 2 semanas a una dosis baja de solamente 50 mg/día (25 mg b.i.d.) (aunque se contemplan diferentes pautas de dosificación por la presente invención).

Estos métodos pueden usarse para ensayos de potenciación basados en chaperona para otras enfermedades

genéticas, incluyendo glucoesfingolipidosis, mucopolisacaridosis y otros trastornos de almacenamiento lisosómico además de otras enfermedades genéticas, tales como fibrosis quística donde la maduración de la proteína se produce en el RE.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento.

Se citan patentes, solicitudes de patente, publicaciones, descripciones de producto, números de acceso a GenBank y protocolos durante toda esta solicitud.

REIVINDICACIONES

1. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente humano que lo necesita, en donde el paciente tiene una mutación de α-galactosidasa A seleccionada del grupo que consiste en G328A, T41I, M51K, A97V, R112H, A143T, P205T, Y207S, N215S, P259R, L300P, S201F y F295C.

2. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al paciente se le administran 150 mg de la 1-desoxigalactonojirimicina o sal de la misma una vez en días alternos.

3. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la 1-desoxigalactonojirimicina o sal de la misma potencia la actividad de α-galactosidasa A.

4. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el paciente es hombre.

5. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el paciente es mujer.

6. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la 1-desoxigalactonojirimicina o sal de la misma se administra por vía oral.

7. 1-Desoxigalactonojirimicina o una sal de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la sal de 1-desoxigalactonojirimicina es clorhidrato de migalastat.

Figura 1

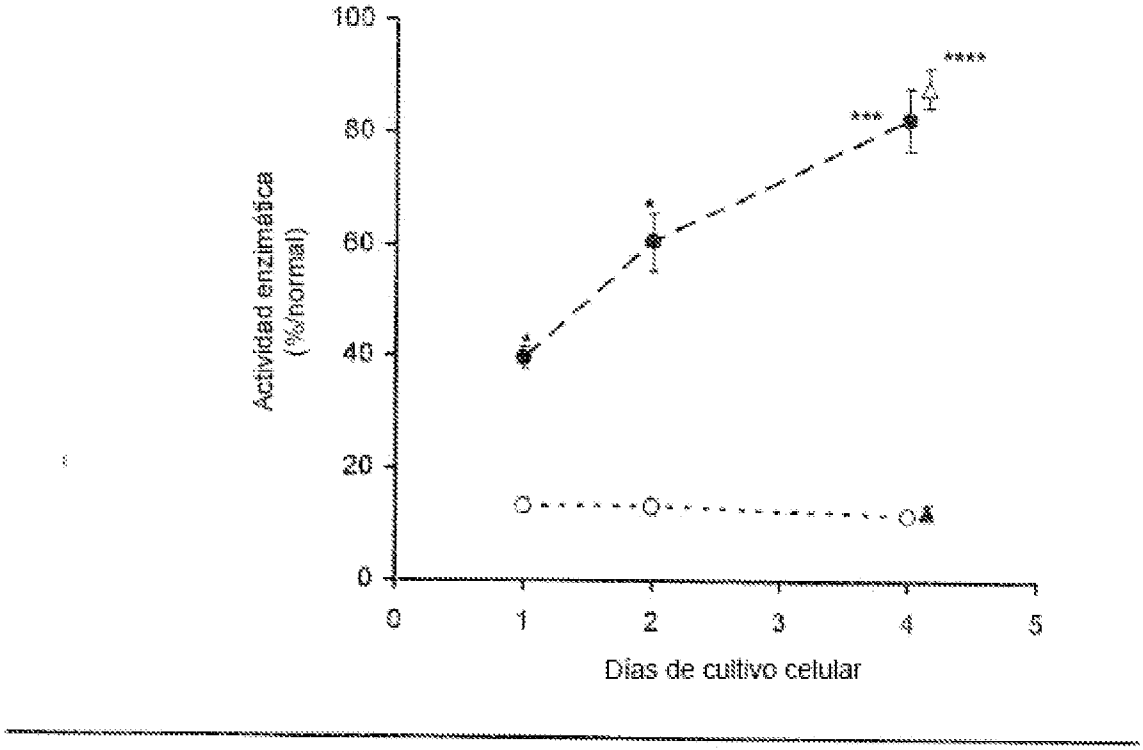

100
80
60
40
20
0
Actividad enzimática
(%/normal)
0
1
2
3
4
5
Días de cultivo celular
*
*
***
****

Figura 2A

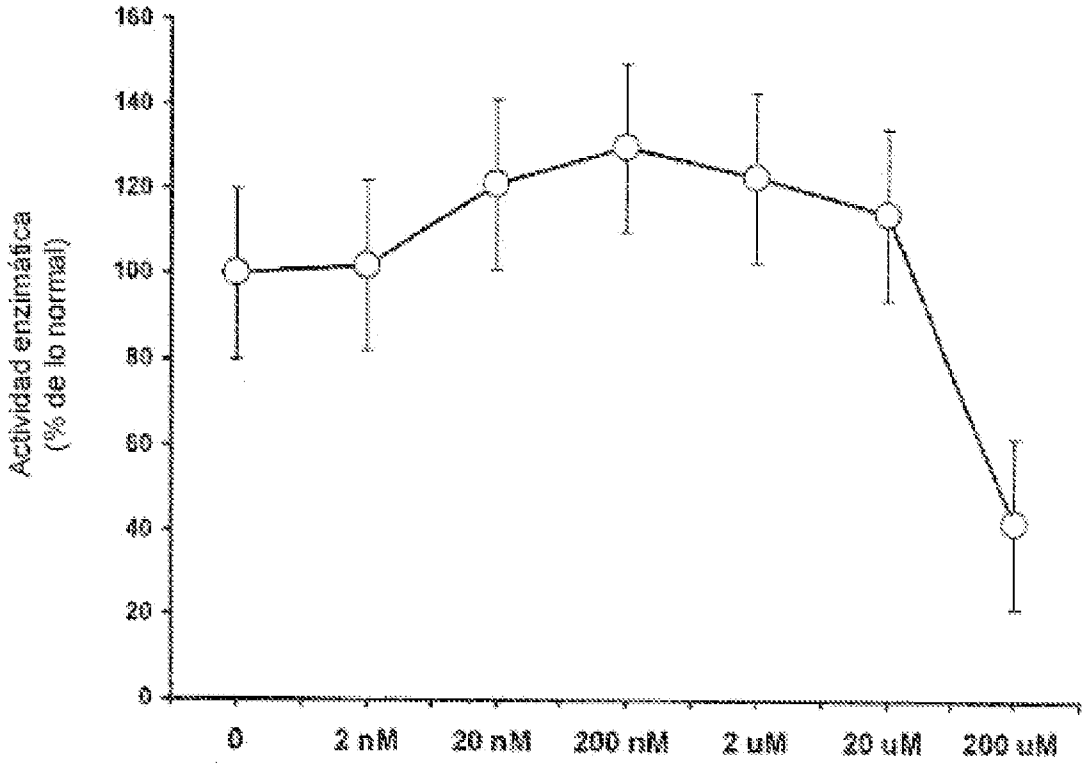

Actividad enzimática
(% de lo normal)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
2 nM
20 nM
200 nM
2 uM
20 uM
200 uM

Figura 2B

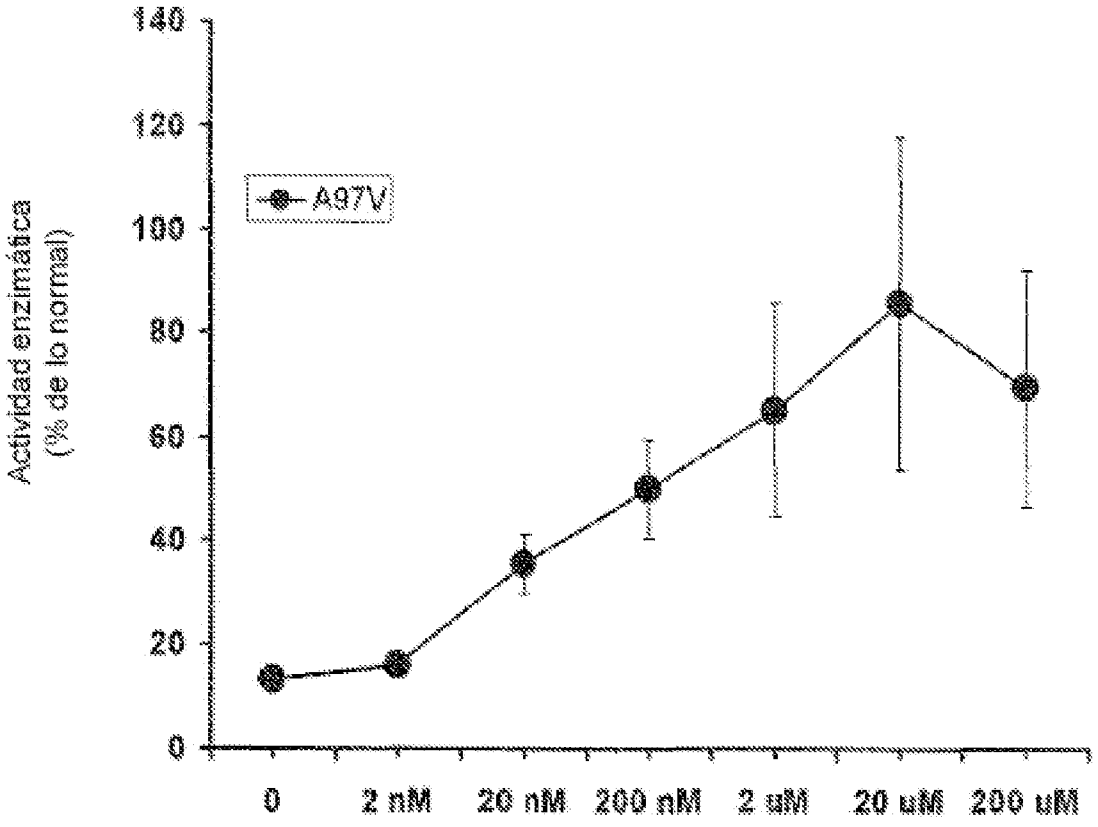

Actividad enzimática
(% de lo normal)
140
120
100
80
60
40
20
0
A97V
0
2 nM
20 nM
200 nM
2 uM
20 uM
200 uM

Figura 2C

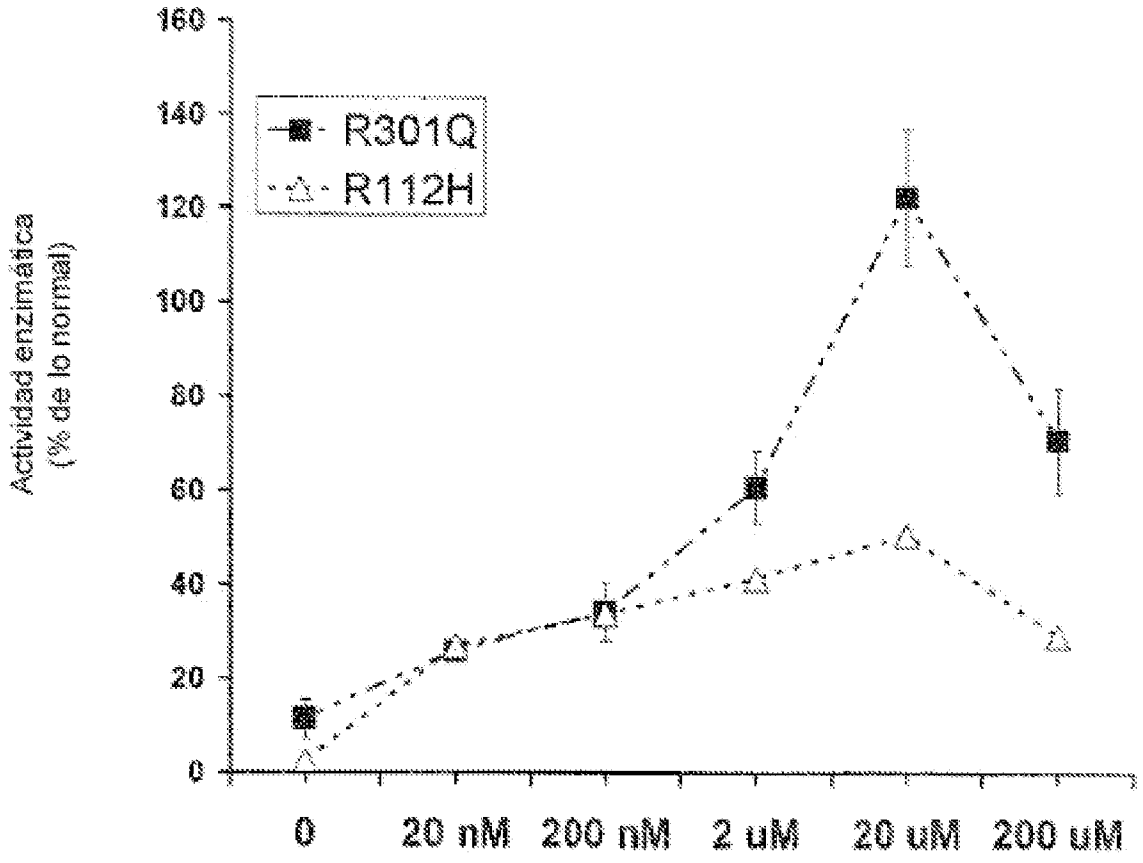

Actividad enzimática
(% de lo normal)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
R301Q
R112H
0
20 nM
200 nM
2 uM
20 uM
200 uM

Figura 3

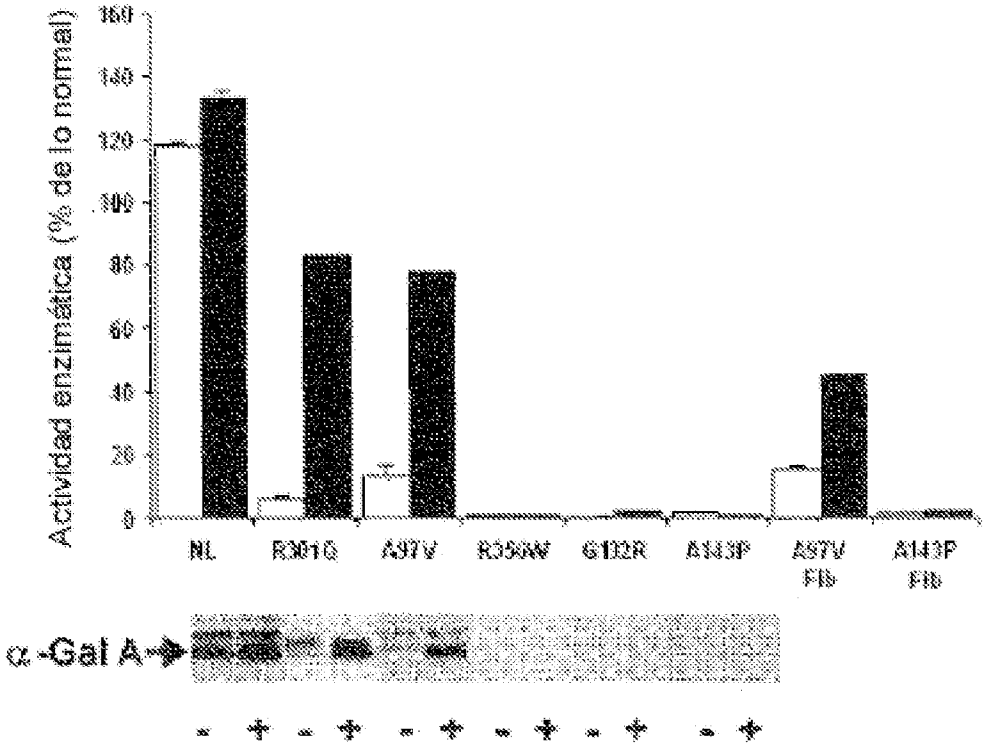
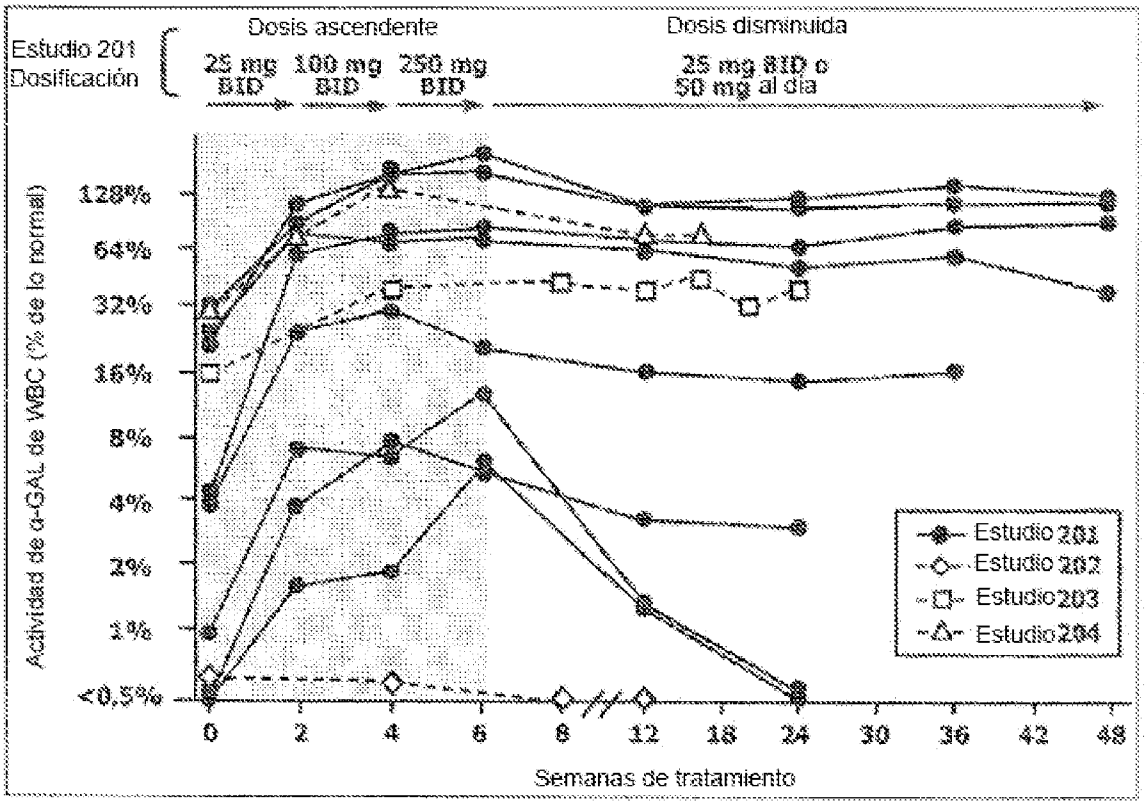

Actividad enzimática (% de lo normal)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
NL
R301Q
A97V
R356W
G192R
A143P
A97V Fb
A143P Fb
α-Gal A
- + - + - + - + - + - +

Figura 4


Estudio 201
Dosificación
Dosis ascendente
25 mg BID
100 mg BID
250 mg BID
Dosis disminuida
25 mg BID o 50 mg al día
Actividad de α-GAL de WBC (% de lo normal)
128%
64%
32%
16%
8%
4%
2%
1%
<0,5%
0
2
4
6
8
12
18
24
30
36
42
48
Semanas de tratamiento
Estudio 201
Estudio 202
Estudio 203
Estudio 204

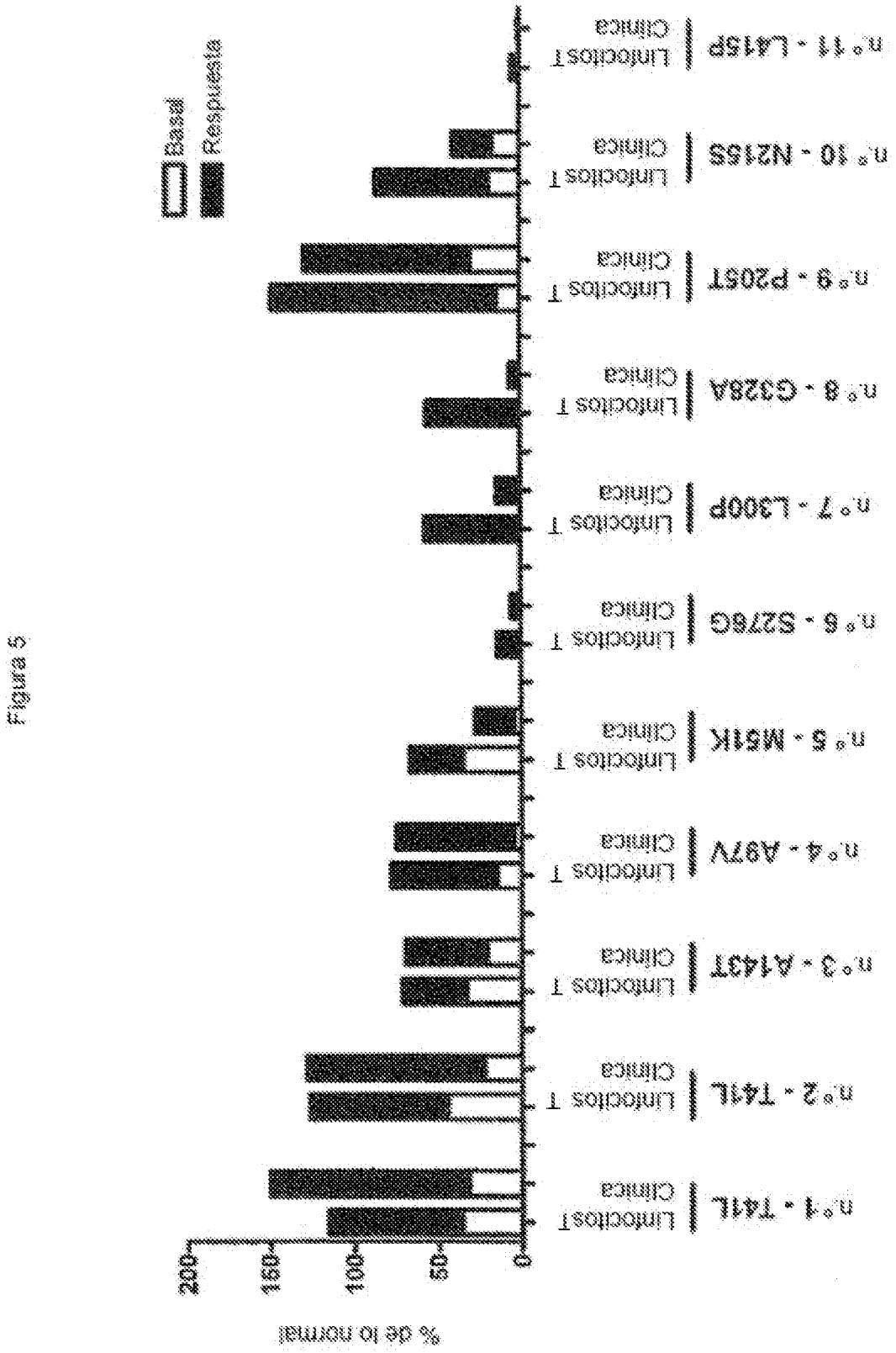

Basal
Respuesta
% de lo normal
200
150
100
50
0
nº 1 - T41L
nº 2 - T41L
nº 3 - A143T
nº 4 - A97V
nº 5 - M51K
nº 6 - S276G
nº 7 - L300P
nº 8 - G328A
nº 9 - P205T
nº 10 - N215S
nº 11 - L415P
Linfocitos T
Clínica

Figura 5