

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 515**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.1999 E 09011761 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2143420**

54 Título: **Formulación que comprende un mutante(s) de α -Galactosidasa A lisosomal para el tratamiento de enfermedad de Fabry**

30 Prioridad:

01.06.1998 US 87804

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

15.10.2014

73 Titular/es:

**THE MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE OF
NEW YORK UNIVERSITY (100.0%)
ONE GUSTAVE L. LEVY PLACE, BOX 1675
NEW YORK, NY 10029, US**

72 Inventor/es:

**FAN, JIAN-QIANG y
ISHI, SATOSHI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 507 515 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación que comprende mutante(s) de α -Galactosidasa A lisosomal para el tratamiento de enfermedad de Fabry.

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a un método para incrementar la actividad de α -Galactosidasa A lisosomal (α -Gal A) en células de mamífero y para tratamiento de enfermedades de almacenamiento de glucoesfingolípidos, en particular enfermedad de Fabry, por administración de formulaciones farmacéuticas que comprenden 1-desoxigalactonojirimicina.

Antecedentes de la invención

- 10 La enfermedad de Fabry (1) es una enfermedad de almacenamiento de glucoesfingolípidos lisosomales causada por una deficiencia heredada ligada al X de α -galactosidasa A lisosomal (α -Gal A), una enzima responsable de la hidrólisis de resto α -galactosilo terminal de glucoesfingolípidos. Una deficiencia en la actividad enzimática da como resultado una deposición progresiva de glucoesfingolípidos neutros, predominantemente globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida, CTH (por sus siglas en inglés)), en células endoteliales vasculares causando fallo renal
15 junto con infarto agudo de miocardio prematuro y apoplejías en pacientes con esta afección (2). Este trastorno se clasifica por manifestaciones clínicas en dos grupos: una forma clásica con vasculopatía generalizada y una forma variante atípica, con manifestaciones clínicas limitadas a corazón. Recientemente, la variante atípica de la enfermedad se encontró en el 10% de los pacientes varones adultos con hipertrofia ventricular izquierda inexplicada, aumentando la estimación de la frecuencia del trastorno (3). Como otras enfermedades de almacenamiento
20 lisosomal de glucoesfingolípidos, se sugieren tratamiento de sustitución de enzimas, terapia génica, trasplante de médula ósea y privación de sustrato como potenciales estrategias para el tratamiento de esta enfermedad (4). Sin embargo, por el momento el único tratamiento para este trastorno es tratamiento sintomático. Por lo tanto, se necesita urgentemente el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica para esta enfermedad.

- 25 Los estudios (5) sobre actividad de α -Gal A residual de enzimas mutantes revelaron que algunas de las enzimas mutantes tienen propiedades cinéticas similares a α -Gal A normal pero con inestabilidad significativa. Esto se considera como el caso para la mayoría de los pacientes de variante atípica que presentan en general mayor actividad de α -Gal A residual que los pacientes de Fabry clásicos. Por ejemplo (6), una α -Gal A mutante purificada con un genotipo de Q279E, encontrada en un paciente con variante atípica de enfermedad de Fabry, tenía los mismos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ que la enzima normal, pero perdía la mayor parte de la actividad enzimática incubando la
30 enzima a pH 7,0 a 37°C durante 30 min mientras la enzima normal era estable en la misma condición. Tanto la enzima mutante como la normal eran estables a pH 5,0 a 37°C. Además, la mayoría de la proteína enzimática mutante en las células formaba agregado en el retículo endoplasmático (RE) y se degradaba rápidamente (7), sugiriendo que la deficiencia de la actividad enzimática en este mutante podía ser causada principalmente por la salida sin éxito del RE que conduce a una degradación excesiva de la proteína enzimática. La presente invención se
35 centra en la ayuda de escape suave de la enzima del RE para evitar la degradación de la enzima mutante.

La patente internacional WO 94/26714 describe que los N-alkil (C 3-6)-derivados de 1-desoxigalactonojirimicina (1-DGJ) pueden inhibir la biosíntesis de glucolípidos y por lo tanto pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos de almacenamiento de glucolípidos.

- 40 La patente internacional WO 9811206 se refiere al tratamiento de trastornos de almacenamiento de glucolípidos por introducción en un individuo de células que pueden expresar y segregar alfa Gal A humana y se pueden considerar por lo tanto como un tratamiento de sustitución enzimático de una enzima defectuosa.

Sumario de la invención

- 45 La estrategia de la invención se basa en el siguiente modelo. La proteína enzimática mutante tiende a plegarse en una conformación incorrecta en el RE donde el pH es alrededor de 7. Como resultado, la enzima se retrasa desde la ruta de transporte normal del RE a través del aparato de Golgi y endosoma al lisosoma, pero en su lugar se somete a degradación. Por otra parte, la proteína enzimática con una conformación apropiada es transportada al lisosoma suavemente y permanece en una forma activa debido a que la enzima es más estable a un pH menor que 5. Por lo tanto, un compuesto que puede inducir una conformación apropiada en enzima mutante puede servir como
50 potenciador para la enzima. Los presentes autores han encontrado inesperadamente que los inhibidores competitivos fuertes para α -Gal A a bajas concentraciones potencian la actividad de las enzimas mutantes en las células, incluyendo células COS-1 transfectadas con gen mutante de α -Gal A, fibroblastos de un ratón transgénico que sobreexpresa α -Gal A mutante y linfoblastos de pacientes de Fabry.

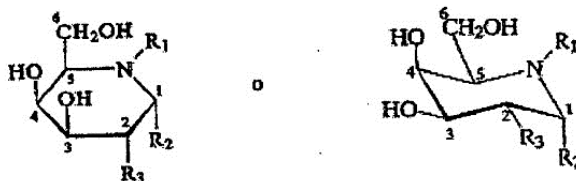
Se observa que aunque se cree que lo anterior es el mecanismo de operación de la presente invención, el éxito de la invención no depende de que éste sea el mecanismo correcto.

- 55 De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención proporcionar una formulación farmacéutica para uso en un método para prevenir la degradación de α -Gal A mutante en células de mamífero, en particular en células

humanas.

Es un objeto más de la invención proporcionar una formulación farmacéutica para uso en un método para mejorar la actividad de α -Gal A en células de mamífero, en particular en células humanas. Los métodos de la presente invención potencian la actividad de α -Gal A tanto normal como mutante, en particular de α -Gal A mutante que está presente en algunas formas de enfermedad de Fabry.

La formulación farmacéutica de la presente invención comprende un compuesto que se espera que sea eficaz en un método de tratamiento y es un derivado de galactosa, es decir 1-desoxigalactonojirimicina. Por derivado de galactosa se quiere decir que el grupo hidroxilo en la posición C-3 es ecuatorial y el grupo hidroxilo en la posición C-4 es axial, como se representa, por ejemplo, por las siguientes estructuras:

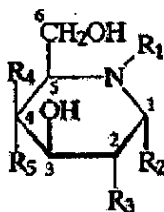


10

en las que R₁ representa H; R₂ es H y R₃, OH.

Es aún un objeto más de la invención proporcionar una formulación farmacéutica que comprende 1-desoxigalactonojirimicina para uso en un método de tratamiento para pacientes con enfermedad de Fabry. La administración de una formulación farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula:

15



en la que:

R₁ representa H;

R₂ es H y R₃ OH,;

20 R₄ es OH y R₅ H;

es decir el compuesto 1-desoxigalactonojirimicina, aliviará los síntomas de la enfermedad de Fabry aumentando la actividad de α -Gal A mutante en pacientes que padecen la enfermedad de Fabry.

Los expertos en la materia comprenderán que se puede determinar una cantidad eficaz de los compuestos usados en las formulaciones farmacéuticas de la invención por experimentación de rutina, pero se espera que sea una cantidad que de cómo resultado niveles en suero entre 0,01 y 100 μ M, preferiblemente entre 0,01 y 10 μ M, lo más preferiblemente entre 0,05 y 1 μ M. Se espera que la dosis eficaz de los compuestos sea entre 0,5 y 1.000 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente entre 0,5 y 100, lo más preferiblemente entre 1 y 50 mg/kg de peso corporal al día. Los compuestos se pueden administrar solos u opcionalmente junto con portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables, en dosis preformuladas. La administración de una cantidad eficaz del compuesto dará como resultado un aumento en la actividad de la α -Gal A de las células de un paciente suficiente para mejorar los síntomas del paciente. Se espera que un nivel de actividad enzimática de 30% del normal podría mejorar significativamente los síntomas en pacientes de Fabry, debido a que el bajo intervalo de actividad enzimática encontrado en personas aparentemente normales es aproximadamente 30% del valor promedio (2).

Las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente memoria serán útiles según la invención en métodos para potenciar la actividad intracelular de α -Gal A y tratar la enfermedad de Fabry.

Breve descripción de los dibujos.

La Fig. 1A-1C. Inhibición *in vitro* (1A) y potenciación intracelular (1B y 1C) de α -Gal A por compuestos alcaloides.

Los compuestos alcaloides usados fueron: (1) 2,5-Didesoxi-2,5-imino-D-manitol, (2) α -Homonojirimicina, (3) 3,4-Diepi- α -homonojirimicina, (4) 5-O- α -D-Galactopiranosil- α -homonojirimicina, (5) 1-desoxigalactonojirimicina, (6) 4-epi-Fagomina, (7) 1-Desoxi-nojirimicina, (Gal) Galactosa. La actividad de la α -Gal A intracelular en células COS-1 transfectadas por ADNc de una α -Gal A mutante (R301Q) se ensayó como se describe en "Methods". (A) El ensayo de inhibición se realizó bajo los Métodos. Los IC₅₀ de los compuestos fueron 1,3 mM (1), 2,6 mM (2), 2,9 μ M (3), 0,62 mM (4), 4,7 nM (5), 0,25 mM (6), 0,8 mM (7) y 24 mM (Gal, galactosa), respectivamente.

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

Fig. 3. Transcursos de tiempo de potenciación de α -Gal A por DGJ en fibroblastos (A) TgM y linfoblastos (B). Los cultivos celulares se realizaron en la sección Métodos. La concentración de DGJ añadida fue 20 μ M. El genotipo de los linfoblastos humanos fue R301Q. *, célula mutante cultivada sin DGJ; o, célula mutante cultivada con DGJ; \blacktriangle , linfoblasto normal cultivado sin DGJ; \triangle , linfoblasto normal cultivado con DGJ.

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

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

Fig. 6. Estabilización de α -Gal A potenciada por DGJ en linfoblastos. \triangle , linfoblastos R301Q cultivados sin DGJ; \blacktriangle , linfoblastos R301Q cultivados con DGJ.

Fig. 7. Análisis TLC de metabolismo de [¹⁴C]-CTH en fibroblastos TgN cultivados con DGJ. Los fibroblastos TgN se cultivaron a 37°C en medio F-10 de Ham – FCS al 10% que contenía DGJ a 0 (línea 1), 2 (línea 2) y 20 μ M (línea 3) durante 4 días. Después de lavar con el medio sin DGJ, se añadió [¹⁴C]-CTH (200.000 cpm) en 2,5 ml de medio Opti-MEM (Gibco, Gaithersburg, MD U.S.A.) a la células y se incubó durante 5 h. Se lavaron las células con 2 ml de BSA al 1% y 2 ml de PBS tres veces cada uno. Se extrajeron los glucolípidos neutros por CHCl₃: MeOH (2:1) y se purificó mediante tratamiento alcalino suave, extracción con MeOH:n-hexano (1:1) y extracción de Folch (19).

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

Fig. 8B. Método de Western de α -Gal A mutante (R301Q) expresado en fibroblastos TgM. El sobrenadante de homogenado de células que contenía 10 μ g de proteína se aplicó a SDS-PAGE y se realizó ensayo de Western con un anticuerpo anti- α -Gal A producido en conejo.

Fig. 9. Centrifugación en gradiente de densidad de Percoll con fibroblastos TgM (A), fibroblastos TgM cultivados con DGJ 20 μ M (B) y fibroblastos TgN (C). La centrifugación en gradiente de densidad de Percoll se realizó con marcadores de densidad (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.) como se describió previamente por Oshima et al. (8). Se ensayó β -hexosaminidasa, una enzima marcador de lisosomas, con 4-metilumbeliferil- β -N-actil-D-glucosamina como sustrato. Línea continua, actividad de la α -Gal A; línea discontinua, actividad de la β -hexosaminidasa.

Fig. 10. Potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas por DGJ. El ADNc transfectado a células COS-1 fue de α -Gal A con las mutaciones en L166V, A156V, G373S y M296I. La concentración de DGJ añadida fue 20 μ M.

Fig. 11. Potenciación de actividad de la α -Gal A por administración de DGJ a ratones TgM. Las disoluciones de DGJ (0,05 mM o 0,5 mM) se pusieron como fuentes de bebida para ratones TgM (cuatro ratones como un grupo). Después de 1 semana de administración, se homogeneizaron los órganos para la determinación de la actividad enzimática. Los datos fueron la sustracción de actividad de la α -Gal A de ratones endógena obtenida de ratones no Tg que se alimentaron con DGJ de la actividad de ratones TgM. Las actividades enzimáticas presentadas fueron los valores medios y las desviaciones estándar fueron menores que 10%.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

Las abreviaturas usadas en la presente memoria se exponen a continuación por conveniencia: α -Gal A, α -galactosidasa A lisosomal humana; ratón TgN, un ratón transgénico que sobreexpresa α -galactosidasa A lisosomal humana normal; ratón TgM, un ratón transgénico que sobreexpresa una α -galactosidasa A lisosomal humana mutante con una sola sustitución de aminoácidos de Arg en la posición 301 por Gin (R301Q); fibroblasto TgN, fibroblasto generado a partir de un ratón TgN; fibroblasto TgM, fibroblasto generado a partir de un ratón TgM; DGJ,

5 1-desoxigalactonojirimicina; DE-HNJ, 3,4-di-epi- α -homonojirimicina; pNP- α -Gal, p-nitrofenil- α -D-galactósido; 4-mU- α -Gal, 4-metilumbeliferil- α -D-galactósido; FCS, suero fetal de ternera; PBS, disolución salina tamponada con fosfato; BSA, albúmina de suero bovino; TLC, cromatografía de capa fina; CTH, globotriaosilceramida o trihexósido de ceramida; CDH, dihexósido de ceramida; CMH, monohexósido de ceramida, (todos por sus siglas en inglés); RE, retículo endoplasmático.

Materiales y Métodos

10 Materiales. Los compuestos alcaloides fueron derivados purificados a partir de plantas o modificados de manera química parcialmente de los productos vegetales (9). Se generaron ratones TgN y TgM como se indicó previamente (10, 11). Se establecieron fibroblastos TgN o TgM de ratón TgN o TgM como rutina. Los linfoblastos humanos fueron estirpes de linfoblastos transformadas por virus de Epstein-Barr de un adulto normal o pacientes con la enfermedad de Fabry (6). Los ADNc de α -Gal A normal y mutante para expresión transitoria en células COS-1 se clonaron como se indica (12). Se expresó α -Gal A para estudio de inhibición *in vitro* de alcaloides y se purificó del medio de cultivo de células Sf-9 infectadas por un gen (13) de α -Gal A normal codificado por baculovirus recombinante. Se preparó [¹⁴C]-CTH por una combinación de reacciones químicas y de N-desacilasa de ceramida de esfingolípido (14).

15 Métodos

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

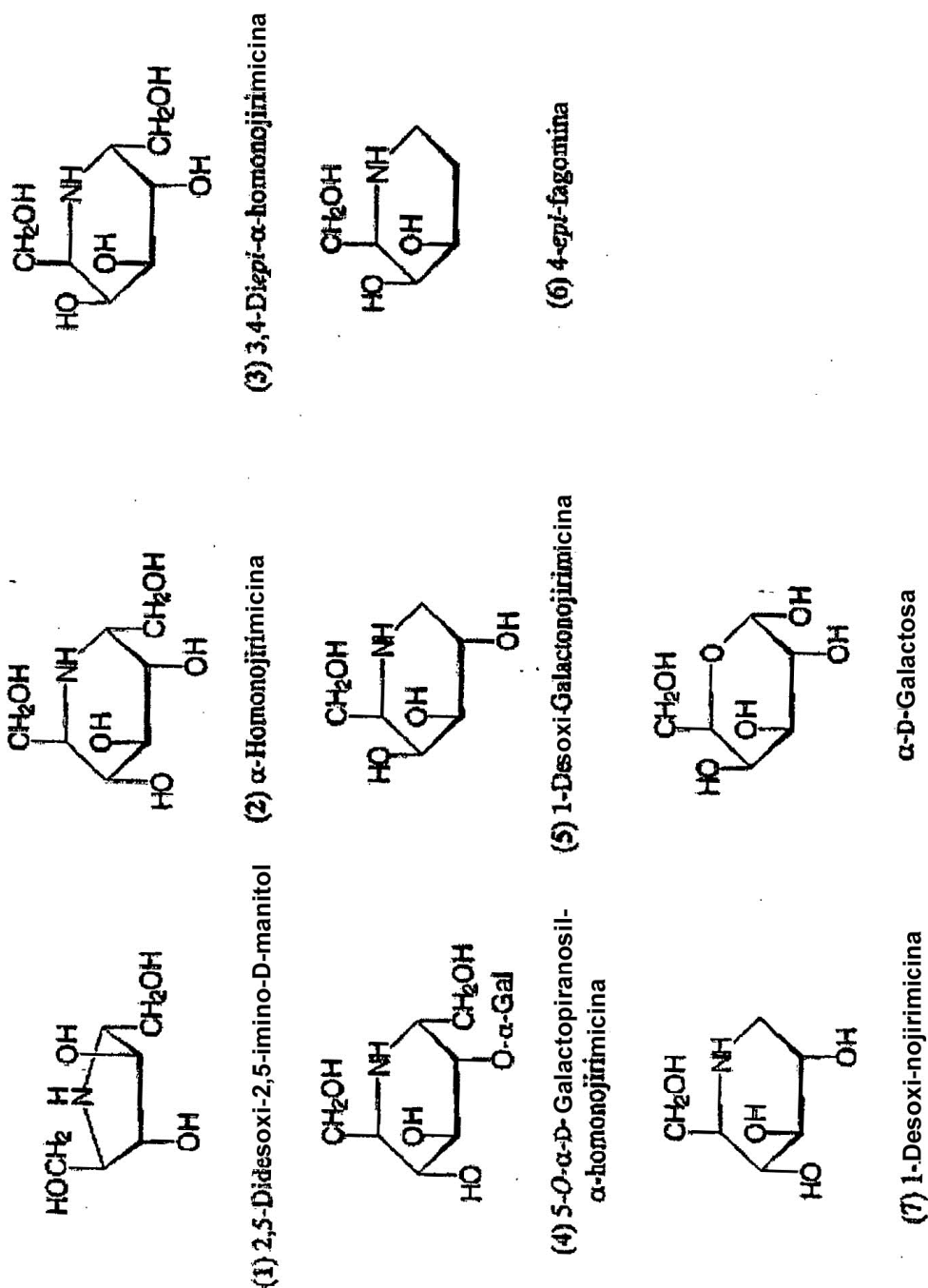
25 Expresión transitoria de α -Gal A en células COS-1. Se transfectaron células COS-1 (5 x 10⁵) con 1 μ g de ADN del plásmido y 8 μ l de Lipofectamina (Gibco, Gaithersburg, MD U.S.A.) en 1,2 ml de medio Opti-MEM (Gibco) por placa de 60 mm. Después de incubación a 37°C durante 6 h, se añadieron 1,2 ml del mismo medio que contenía FCS al 20% y se incubó el cultivo durante la noche. Después de reemplazar el medio con 2,4 ml de medio F-10 de Ham completo, se añadió alcaloide en una concentración apropiada y se incubó además durante 1 día, antes de tomarlo para el ensayo para actividad enzimática intracelular.

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

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

Ejemplo 1

40 Una serie de alcaloides vegetales (Esquema 1, ref. 9) se usó para estudios tanto de inhibición *in vitro* como de potenciación intracelular de la actividad de la α -Gal A. Los resultados de los experimentos de inhibición se muestran en la Fig. 1 A.



Esquema 1

Entre los compuestos ensayados, la 1-desoxi-galactonojirimicina (DGJ, 5) conocida como un poderoso inhibidor competitivo para α-Gal A, mostró la mayor actividad inhibidora con IC₅₀ a 4,7 nM. La α-3,4-di-epi-homonojirimicina (3) fue un eficaz inhibidor con IC₅₀ a 2,9 μM. Otros compuestos mostraron actividad inhibidora moderada con IC₅₀ oscilando de 0,25 mM (6) a 2,6 mM (2). Sorprendentemente, estos compuestos también activan eficazmente la actividad de la α-Gal A en células COS-1 transfectadas con un gen α-Gal A mutante (R301Q), identificado de una forma variante atípica de la enfermedad de Fabry con una actividad de la α-Gal A residual a 4% de la normal. Cultivando las células COS-1 transfectadas con estos compuestos en las concentraciones *cat* 3 – 10 veces de IC₅₀ de los inhibidores, se aumentó la actividad de la α-Gal A 1,5 – 4 veces (Fig. 1C). La eficacia de la potenciación intracelular igualó a la actividad inhibidora *in vitro* al tiempo que se añadieron los compuestos al medio de cultivo a concentración 10 μM (Fig. 1B).

Ejemplo 2

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

aumentó 6 veces por cultivo conjunto con DGJ 20 μM y alcanzó 52% de la normal. El DGJ también mostró un efecto similar en linfoblastos en que se activó la actividad enzimática residual por 8 y 7 veces en R301Q y Q279E, es decir, 48% y 45% del normal. La actividad enzimática en fibroblastos normales Tg (TgN) y linfoblastos normales también mostró un aumento por cultivo con DGJ.

5 Ejemplo 3

Los fibroblastos TgM y linfoblastos humanos de normal y de paciente con una mutación en R301Q se cultivaron en presencia de DGJ a 20 μM . En los cultivos sin DGJ, la actividad de la α -Gal A en fibroblastos TgM o linfoblastos mutantes no cambió (Fig. 3). Sin embargo, incluyendo DGJ, la actividad enzimática mostró aumento significativo en estos cultivos celulares. La actividad enzimática en linfoblastos mutantes alcanzó 64% de las encontradas en linfoblastos normales cultivados sin DGJ el quinto día. La actividad enzimática en linfoblastos normales también aumentó 30% después de cultivo con DGJ.

Ejemplo 4

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

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

20 DE-HNJ mostró el mismo efecto sobre la potenciación de α -Gal A en células COS-1 transfectadas con un ADNc mutante de la enzima (R301Q) en las concentraciones mayores (1-1.000 μM) comparado con DGJ (Fig. 5). Es evidente que DE-HNJ a 1 mM en medio de cultivo no inhibió actividad enzimática intracelular de células COS-1.

Ejemplo 5

25 La Figura 6 muestra un experimento para medir la estabilización de α -Gal A potenciada con DGJ en linfoblastos. La células se cultivaron a 37°C en 10 ml de medio RPMI-1640 enriquecido con FCS al 10% que contenía DGJ a 20 μM durante 4 días y se transfectaron 5×10^5 células a 13 ml de RPMI1640 con FCS al 10% sin DGJ. Se tomaron dos ml del medio cada día para el ensayo enzimático. El excedente inicial de la actividad de la α -Gal A total entre pre-cultivo con y sin DGJ se mantuvo durante 5 días después de sustitución del medio sin DGJ (Fig. 6), sugiriendo que la enzima potenciada era estable en las células durante al menos 5 días.

Ejemplo 6

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

35 La determinación de glucolípido se realizó por cromatografía de capa fina usando $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:25:4) como un disolvente de desarrollo y se visualizó por un sistema de formación de imágenes Fuji-BAS (Fig. 7). La cantidad de di-hexósido de ceramida (CDH), un producto metabólico de CTH mediante α -Gal A, fue comparable entre las células cultivadas con DGJ 20 μM y sin DGJ (4,5% frente a 4,3% de los glucolípidos neutros totales), que indica que la enzima intracelular no es inhibida por DGJ en la concentración usada.

Ejemplo 7

Para determinar si DGJ afecta a la biosíntesis de la α -Gal A, se midió el nivel de ARNm de α -Gal A en linfoblastos mutantes (R301Q) cultivados con DGJ por un método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) competitiva (15). La Fig. 8A muestra claramente que el ARNm de la α -Gal A no cambió por cultivo de linfoblastos con 50 μM de DGJ.

40 Por otra parte, el análisis por el método de Western indicó un incremento significativo de la proteína enzimática en fibroblastos TgM y el aumento correspondió a la concentración de DGJ (Fig. 8B). Más proteína enzimática con menor peso molecular (ca. 46 kD) en las células cultivadas con DGJ sugirió el nivel superior de enzima madurada (16). Estos resultados indican que el efecto de DGJ sobre la potenciación de la enzima es un caso post-transcripcional.

45 Ejemplo 8

50 Para confirmar que la enzima incrementada es transportada al lisosoma, se realizó un fraccionamiento subcelular con fibroblastos de ratones Tg (Fig. 8). La actividad enzimática total en fibroblastos TgM fue menor y se eluyó con un marcador de densidad de 1,042 g/ml que contenía fracciones de aparato de Golgi (20) (Fig. 9A). Por cultivo con DGJ 20 μM , la actividad enzimática en fibroblastos TgM mostró actividad enzimática total superior y la mayoría de la enzima eluyó con la misma fracción de una enzima marcadora de lisosomas, β -hexosaminidasa (Fig. 9B). El patrón de elución de actividad de la α -Gal A en TgM también cambió a los encontrados en fibroblastos TgN (Fig. 9C).

Ejemplo 9

Los genotipos de R301Q y Q279E se encontraron a partir de pacientes con tipo atípico de enfermedad de Fabry. La eficacia de DGJ sobre la potenciación de actividad de la α -Gal A se examinó con otros genotipos y fenotipos de enfermedad de Fabry. En este experimento, se usaron tres ADNc de α -Gal A mutantes, L166V, A156V y G373S encontrados en pacientes con tipo clásico de la enfermedad de Fabry y una mutación de M296I encontrada de pacientes con forma atípica de la enfermedad. La Fig. 10 muestra que la inclusión de DGJ aumentó la actividad enzimática en los cuatro genotipos ensayados, especialmente para L166V (incremento de 7 veces) y A156V (incremento de 5 veces). Los datos indicaron que esta propuesta es útil no sólo para la forma atípica, sino también la forma clásica de la enfermedad.

Ejemplo 10

Se administró DGJ a ratones Tg alimentando disoluciones de DGJ 0,05 ó 0,5 mM como fuente de bebida durante una semana, que corresponde a la dosis de DGJ a 3 ó 30 mg aproximado por kilogramo de peso corporal al día. La actividad enzimática se elevó 4,8 y 18 veces en corazón, 2,0 y 3,4 veces en riñón, 3,1 y 9,5 veces en bazo y 1,7 y 2,4 veces en hígado, respectivamente (Fig. 11). El aumento de la actividad enzimática en órganos respondía al aumento de la dosis de DGJ. Puesto que el gen mutante (R301Q) se encontró en pacientes de Fabry de tipo de variante atípica que presentan síntomas clínicos limitados a corazón, el hecho de que la administración oral de DGJ incrementa de manera específica la actividad de la α -Gal A en el corazón de ratón TgM es significativo en particular.

Discusión

Se sabe que el RE posee un sistema de control de la calidad eficaz para asegurar que el transporte al complejo de Golgi está limitado a proteínas plegadas y ensambladas de manera apropiada y el principal procedimiento del control de calidad está impuesto por una serie de chaperonas (17). Una explicación de los resultados presentados en la presente solicitud es como sigue: En algunos fenotipos de la enfermedad de Fabry, la mutación causa plegamiento imperfecto, pero flexible, de la enzima, mientras el centro catalítico permanece intacto. Los inhibidores normalmente presentan alta afinidad al centro catalítico enzimático y la presencia del inhibidor fija el centro catalítico enzimático y reduce la flexibilidad de plegamiento, conduciendo quizá a la conformación "apropiada" de la enzima. Como resultado, la enzima podía pasar por el "sistema de control de calidad" y ser transportada a complejo de Golgi para alcanzar la maduración. Una vez que la enzima es transportada a lisosoma donde el pH es ácido, la enzima tiende a ser estable con la misma conformación, debido a que la enzima es estable en la condición ácida (6). En dichos casos, el inhibidor actúa como chaperona para forzar a la enzima para asegurar la conformación apropiada. Se propone usar "chaperona química" como un término para dicha química de bajo peso molecular con dichas funciones.

Es crucial para el funcionamiento de la enzima que se pueda tomar la disociación suave del compuesto del centro catalítico de la enzima en el lisosoma. Puesto que los compuestos usados en este estudio son inhibidores competitivos, la disociación de los inhibidores depende de dos factores: i) la concentración de inhibidor y ii) pH. Dale et al. (18) han mostrado que la unión de 1-desoxinojirimicina a α -glucosidasa depende del pH en el caso del inhibidor ligado a la enzima 80 veces más estrechamente a pH 6,5 comparado con pH 4,5, sugiriendo que los derivados de nojirimicina funcionan como una forma no protonada. Esto puede explicar los resultados en el funcionamiento de α -Gal A en células mostradas en la Fig. 7, debido a que el inhibidor puede ligarse a la enzima en condición neutra y liberarse de la enzima en la condición ácida donde DGJ tiende a protonarse.

Los resultados descritos en la presente memoria muestran que DGJ puede potenciar de manera eficaz actividades de α -Gal A mutante en linfoblastos de pacientes con variante atípica de la enfermedad de Fabry con genotipos de R301Q y Q279E. La eficacia de DGJ en otros fenotipos de mutación de Fabry incluyendo formas clásicas y atípicas también se ha examinado. DGJ potenció de manera eficaz la actividad enzimática en los tres genotipos de cepas celulares procedentes de pacientes a los que se diagnosticó enfermedad de Fabry atípica y algunas de las cepas celulares con formas de Fabry clásicas con alta actividad enzimática residual. Según la presente invención, una estrategia de administración de un inhibidor de la α -Gal A debería demostrar que es un tratamiento eficaz para pacientes de Fabry cuya mutación tiene lugar en el sitio distinto del centro catalítico y también debería ser útil para otras enfermedades de almacenamiento de glucoesfingolípidos.

Las referencias citadas en la presente memoria se enumeran a continuación por conveniencia:

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

18. M. P. Dale, H. E. Ensley, K. Kern, K. A. R. Sastry and L. D. Byers, *Biochemistry* 24, 3530 (1985).
19. Folch et al. *J. Biol. Chem.* 226:497 (1957).
20. Fleisher, S. and M. Kervina, *Methods in Enzymology* 31, 6 (1974).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende 1-desoxigalactonojirimicina y un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. Una composición farmacéutica que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina y un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende 1-desoxigalactonojirimicina y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.
4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2, que consiste en 1-desoxigalactonojirimicina y portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 10 5. Una composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en terapia.
6. Una composición farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en el tratamiento de enfermedad de Fabry.
7. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry según la reivindicación 6, en la que la enfermedad de Fabry es enfermedad de Fabry atípica.
- 15 8. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry según la reivindicación 6, en la que la enfermedad de Fabry es Fabry clásica con alta actividad enzimática residual.
9. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry según la reivindicación 6, en la que el paciente presenta una mutación en un sitio distinto del centro catalítico de α -galactosidasa A lisosomal.
- 20 10. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry según una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en la que la dosis de 1-desoxigalactonojirimicina está entre 0,5 y 100 mg/kg de peso corporal al día.
11. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry según la reivindicación 10, en la que la dosis de 1-desoxigalactonojirimicina está entre 1 y 50 mg/kg de peso corporal al día.

Fig. 1A

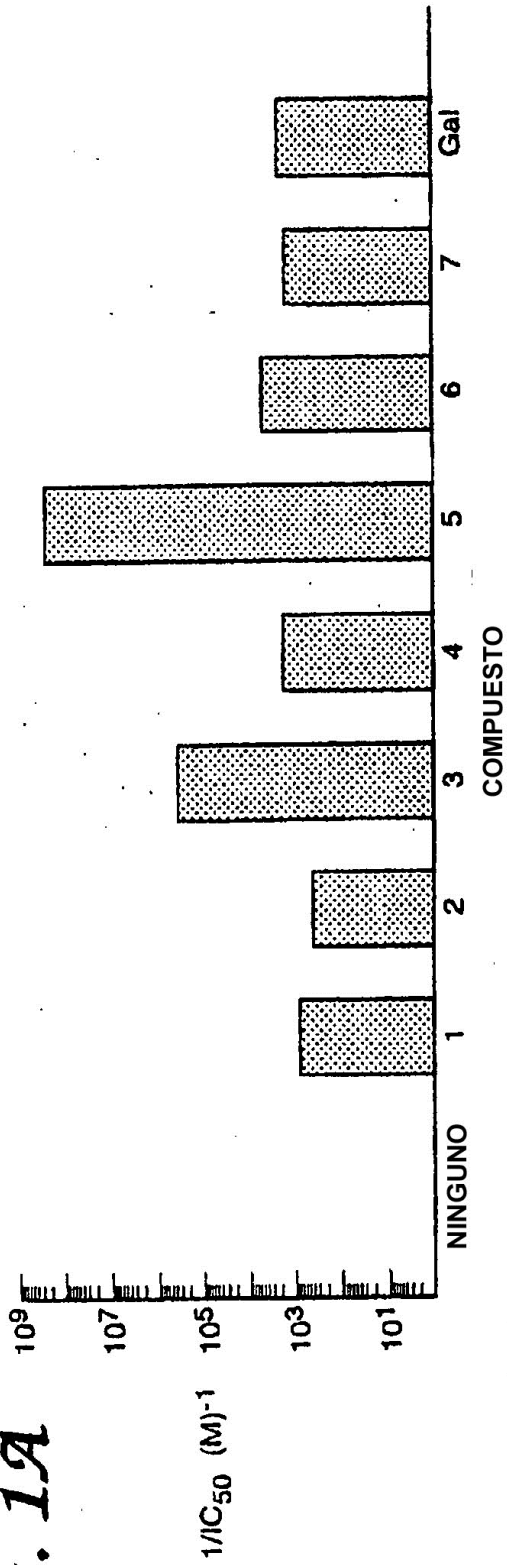


Fig. 1B

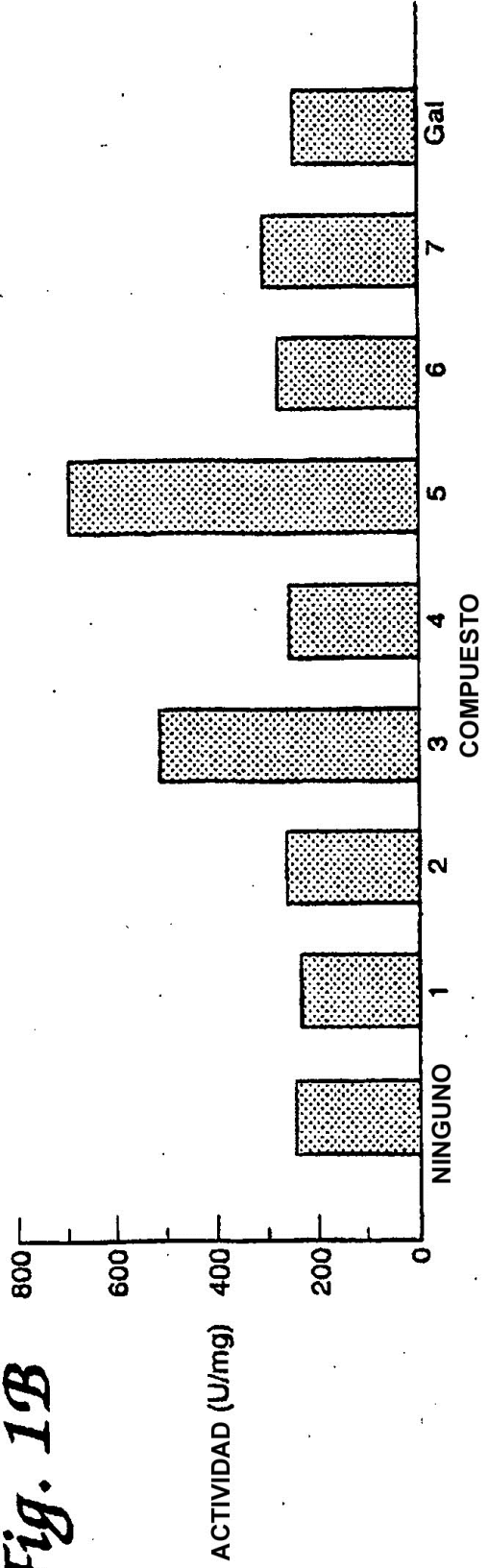


Fig. 1C

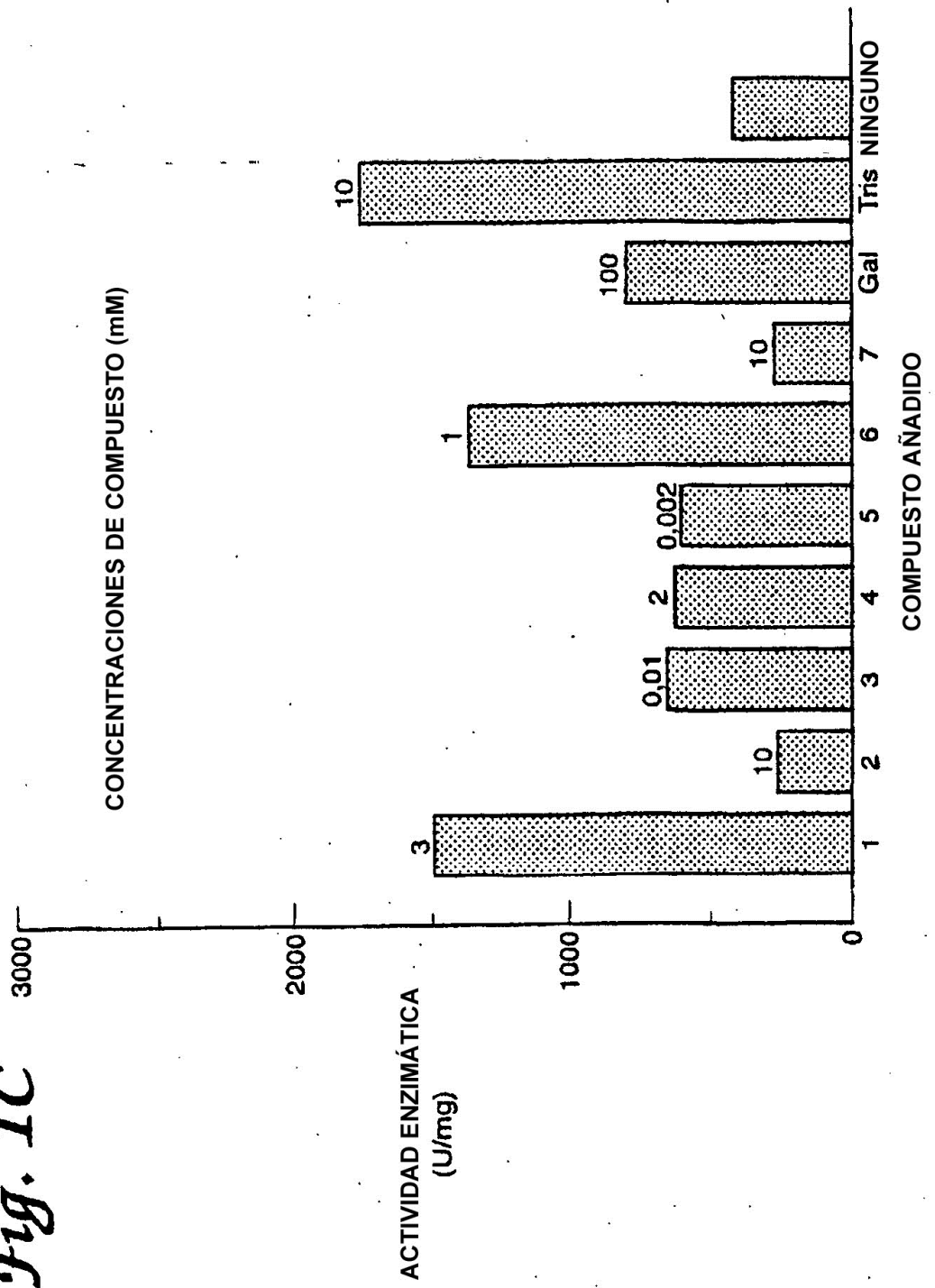


Fig. 2A

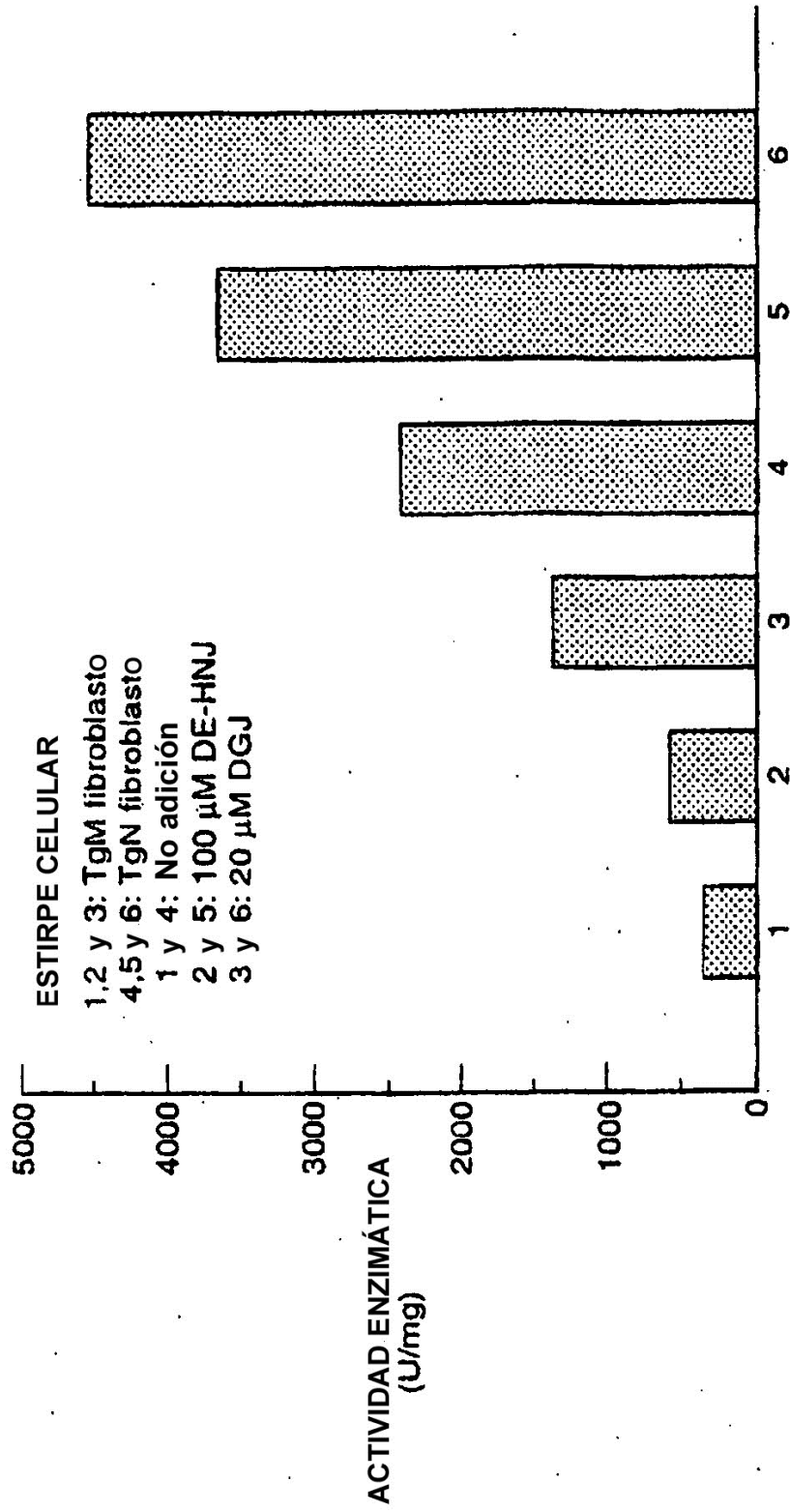


Fig. 2B

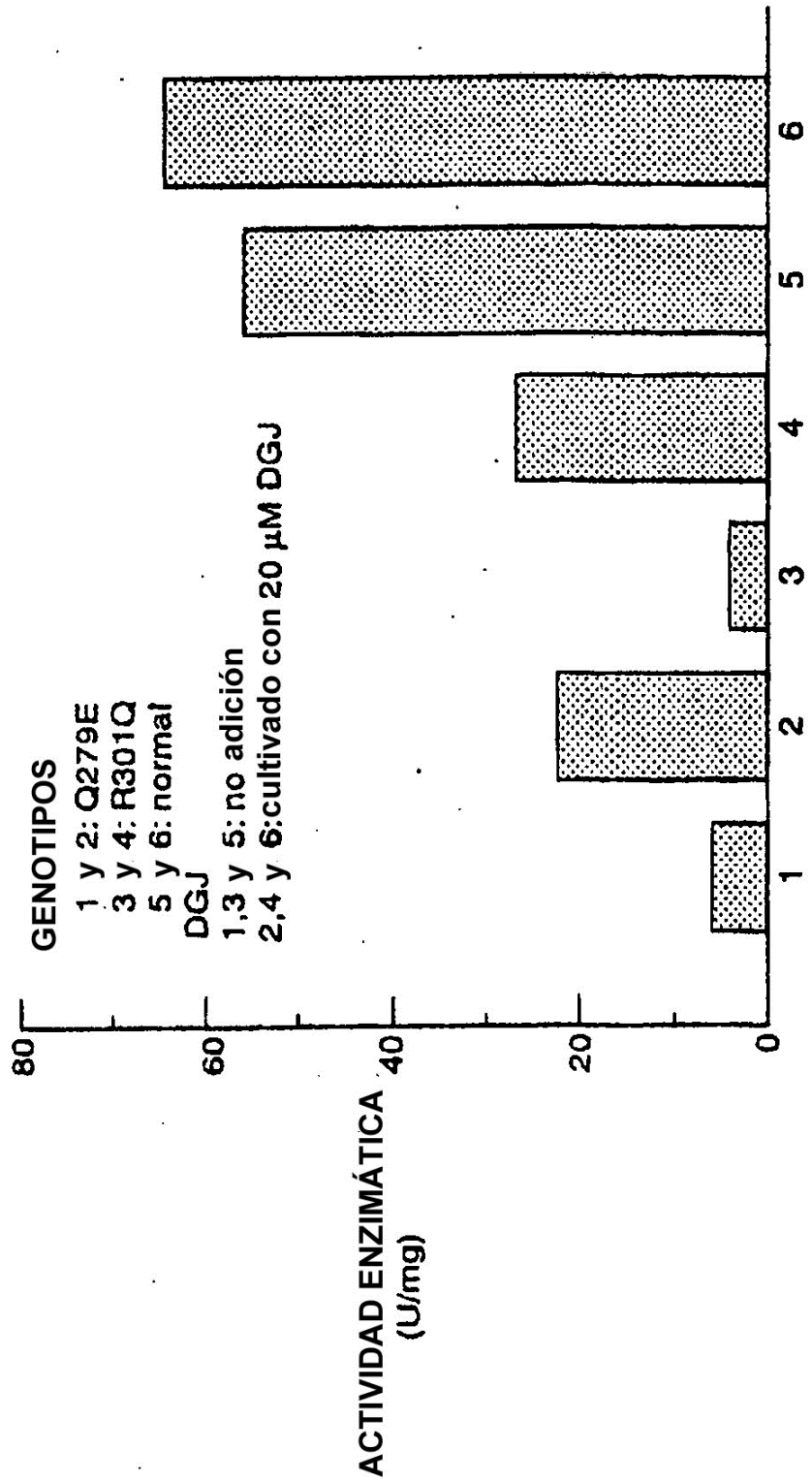


Fig. 3B

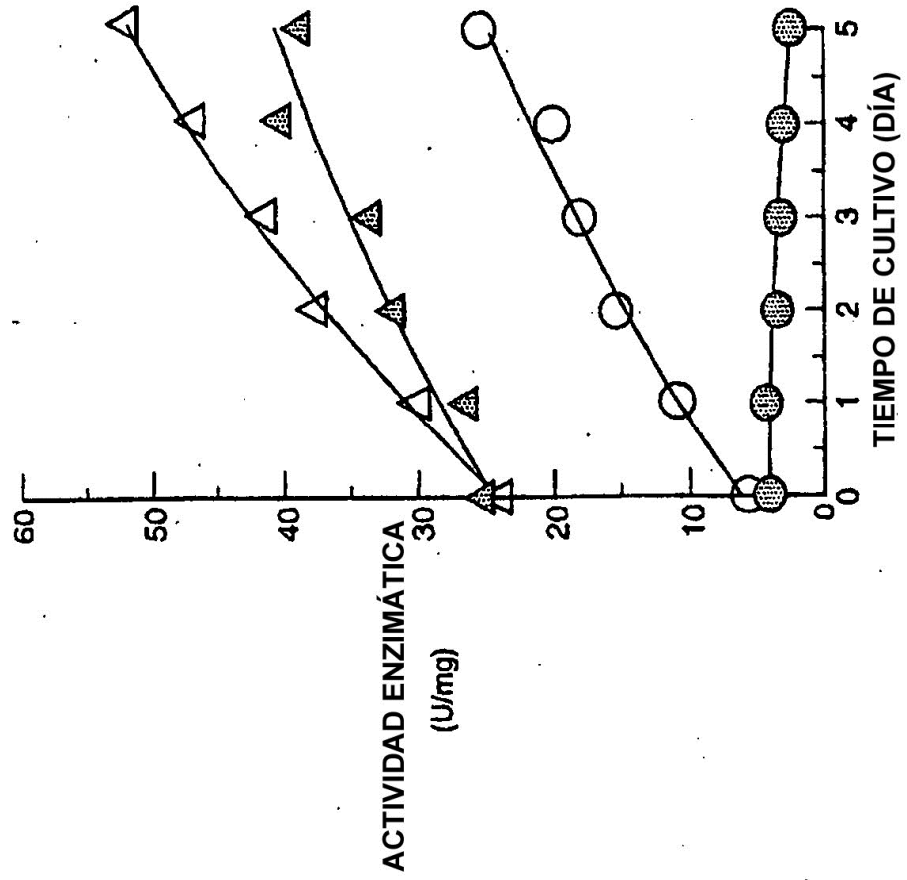


Fig. 3A

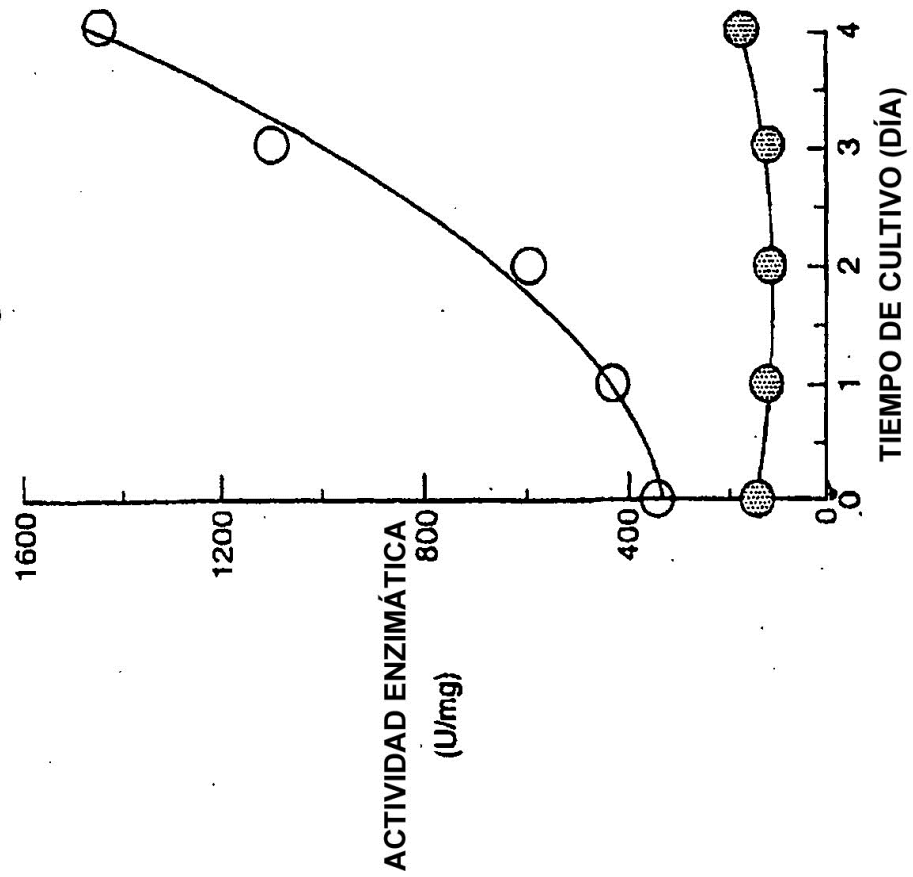


Fig. 4C

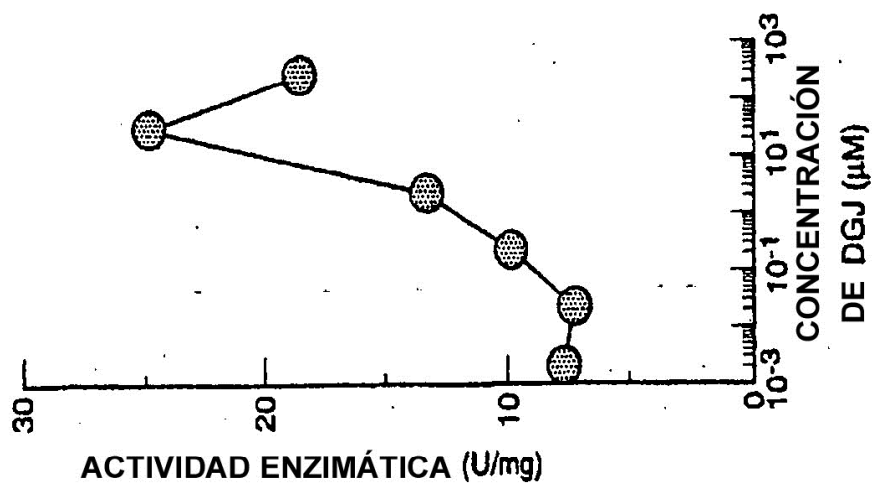


Fig. 4B

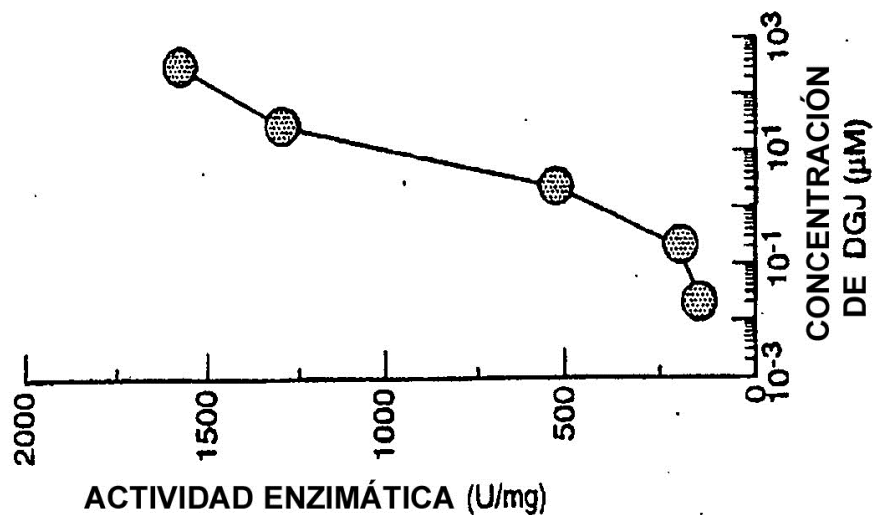


Fig. 4A

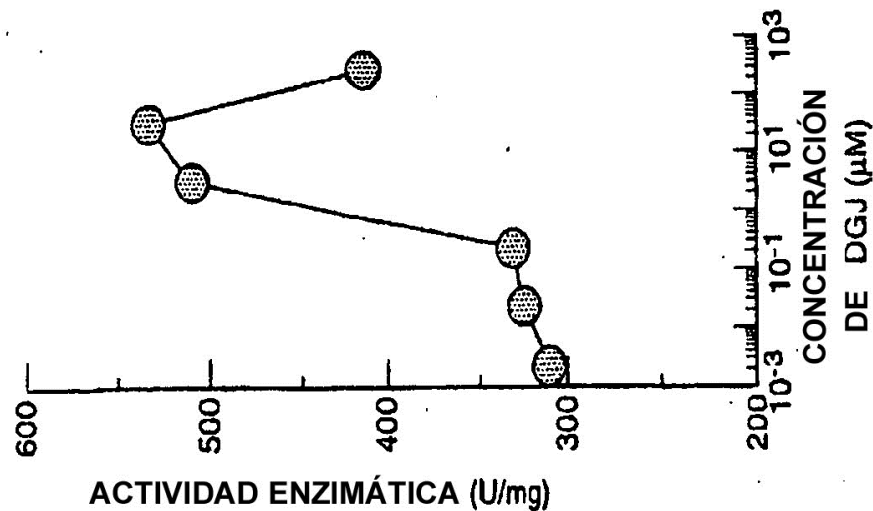


Fig. 5

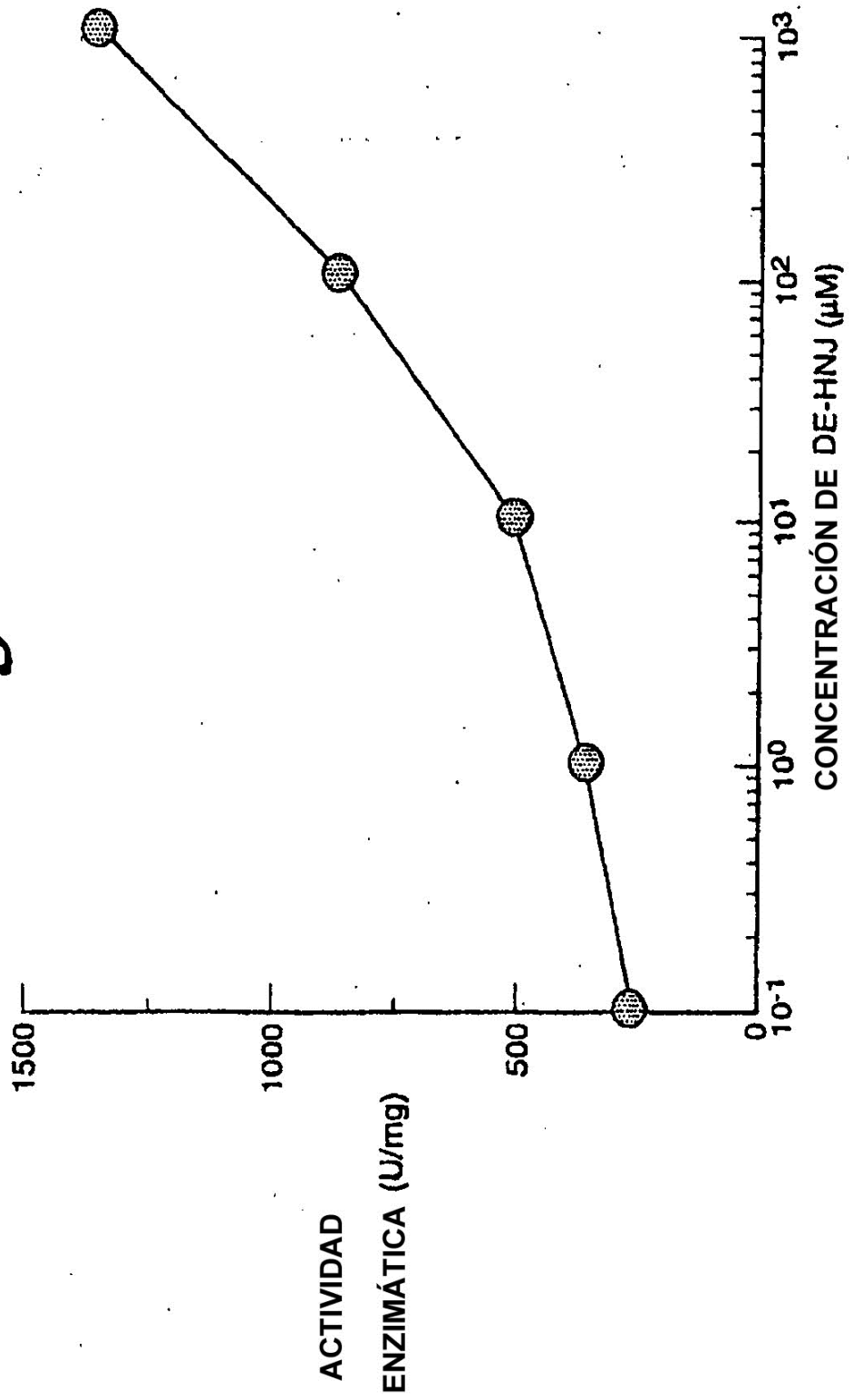


Fig. 6

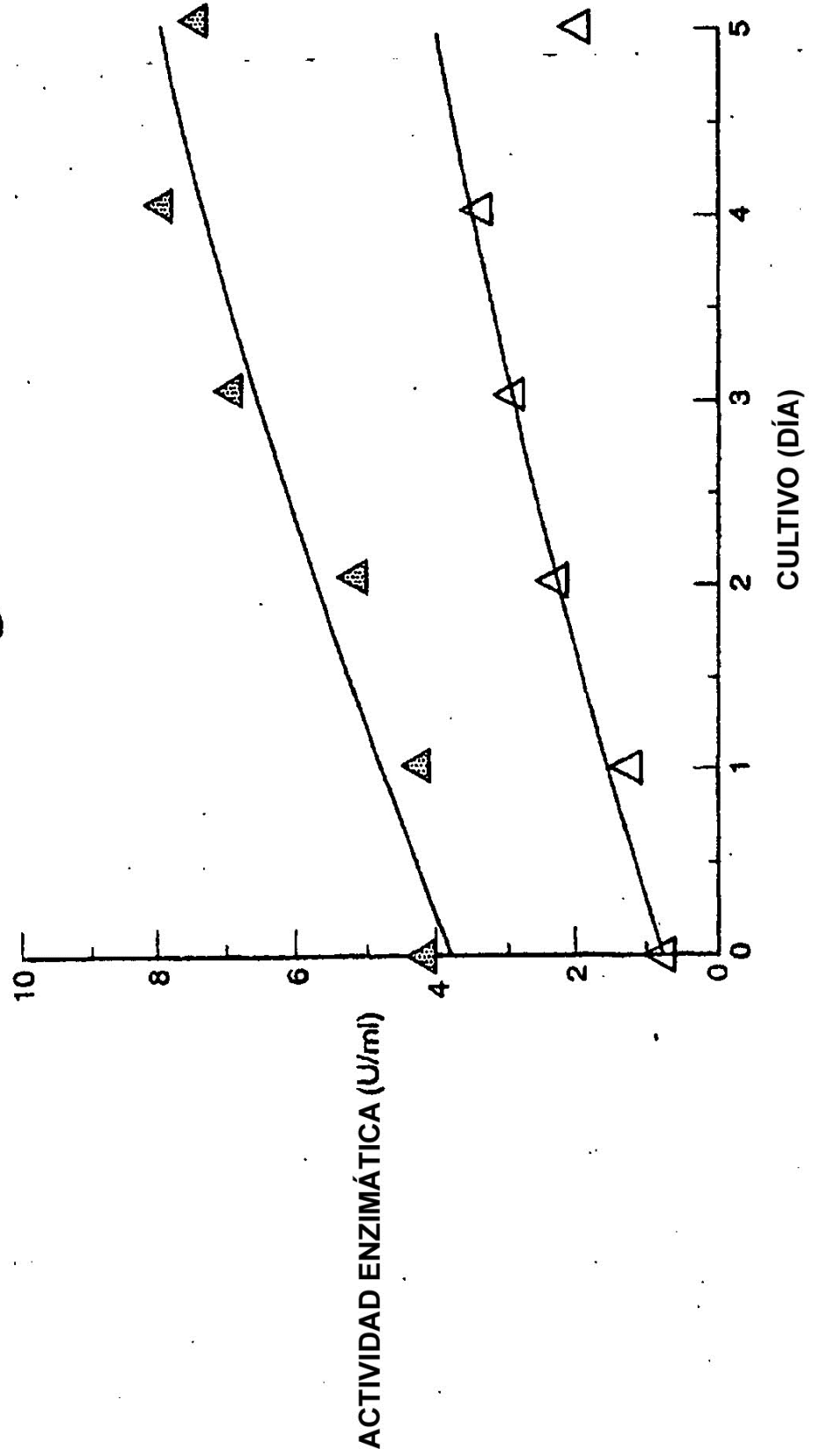


Fig. 7

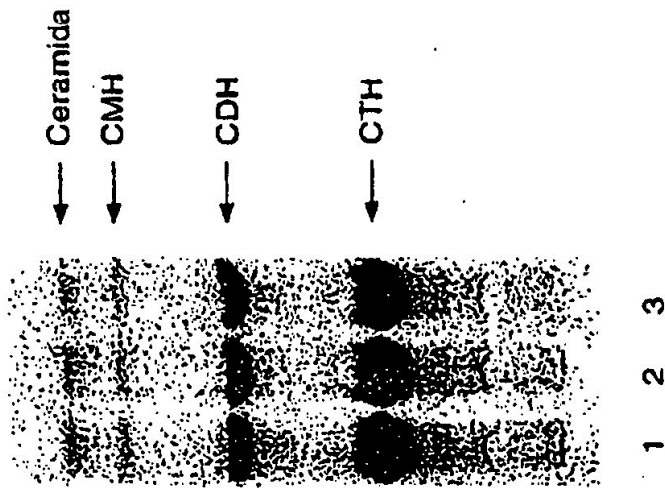


Fig. 8A

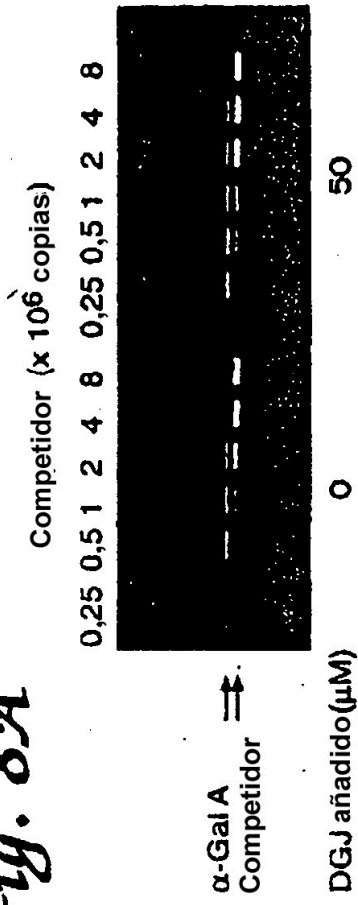


Fig. 8B

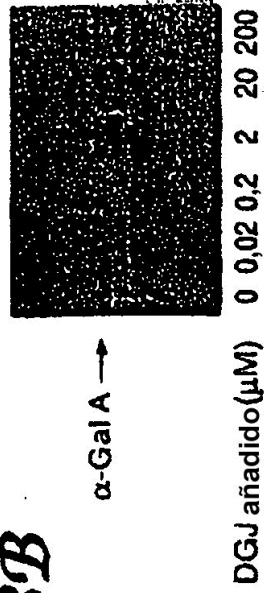


Fig. 9A

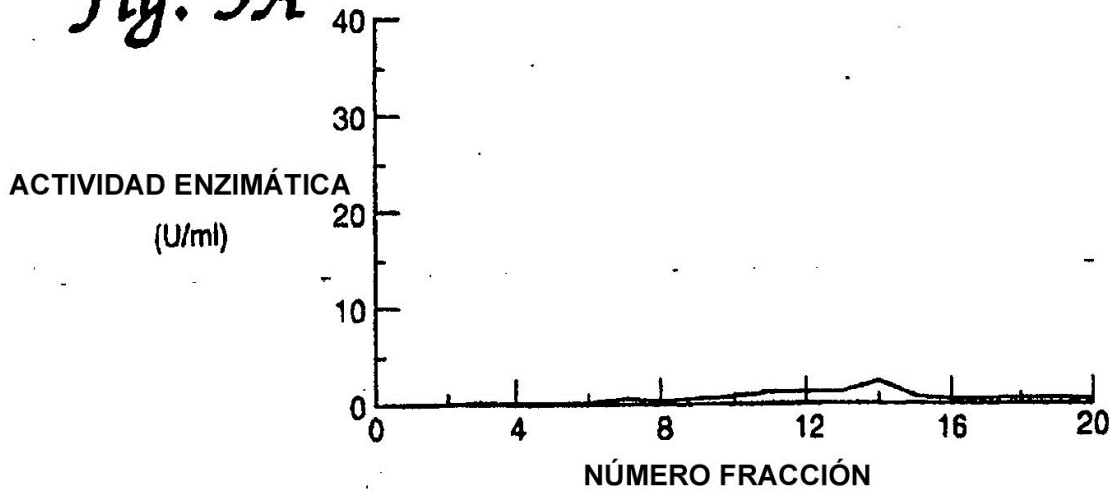


Fig. 9B

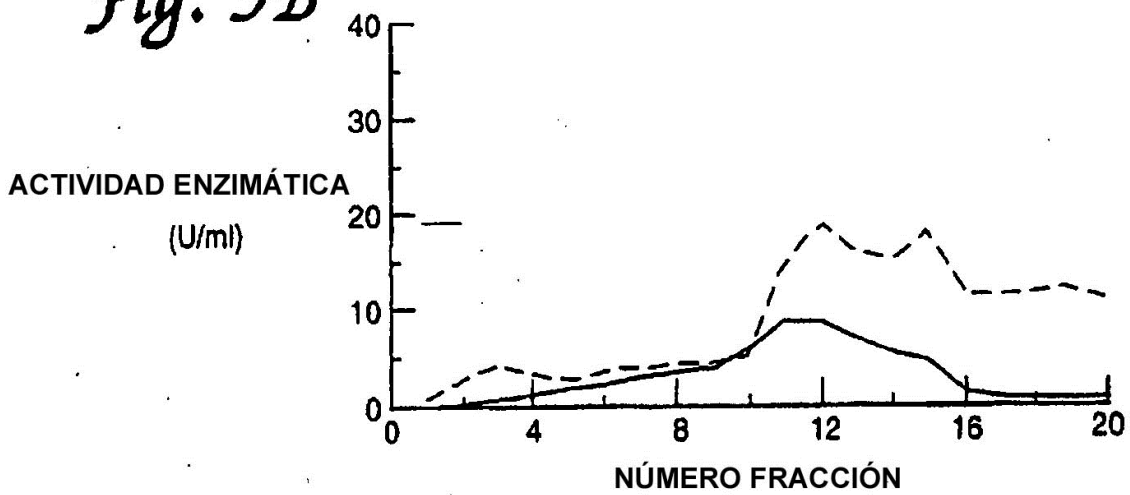


Fig. 9C

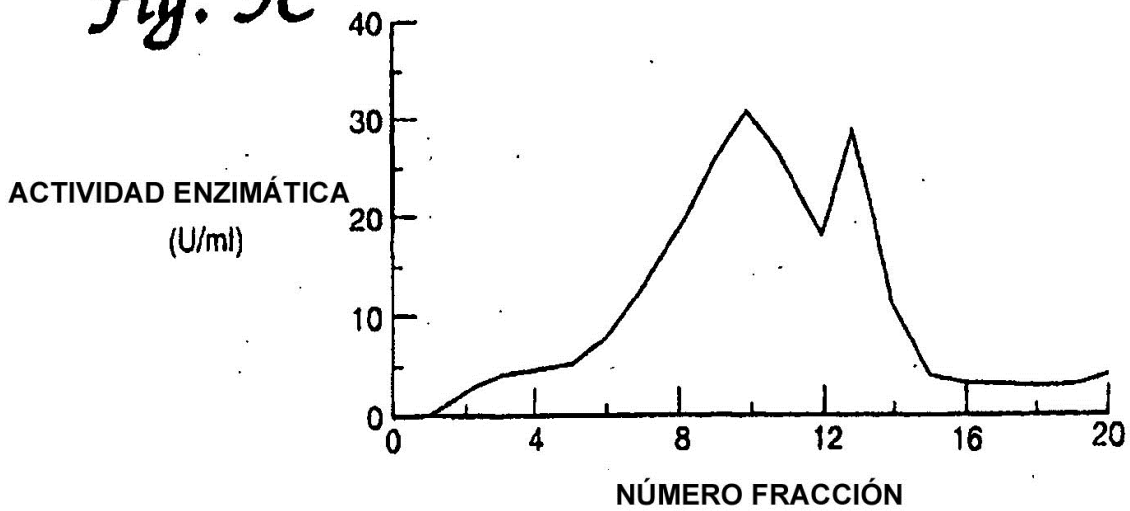


Fig. 10

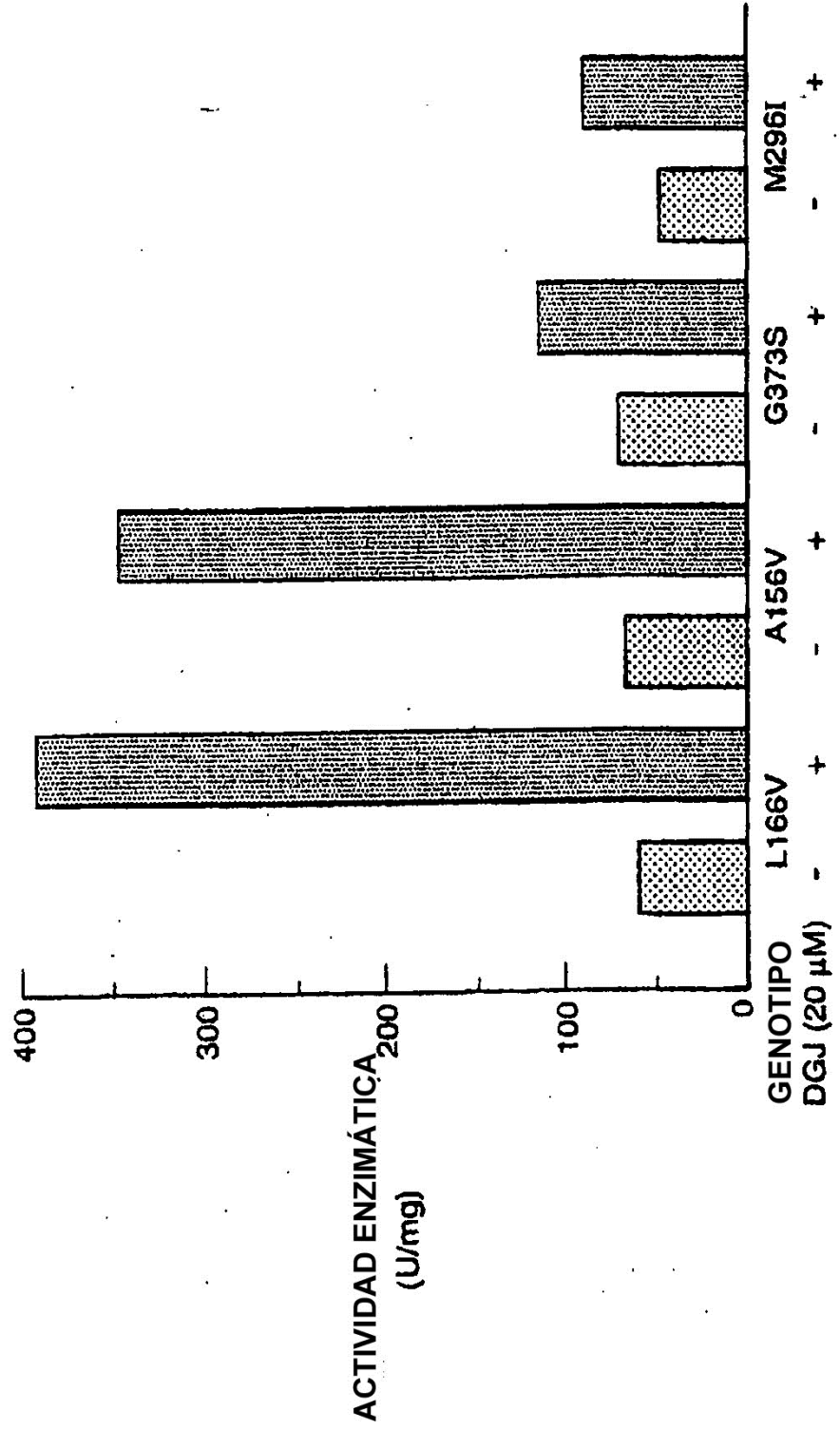


Fig. 11

