

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 834**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011** **E 11706137 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014** **EP 2538936**

54 Título: **Nitisinona para el tratamiento de albinismo oculocutáneo/ocular y para aumentar la pigmentación**

30 Prioridad:

26.02.2010 US 308771 P

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

01.04.2015

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)**

**Office of Technology Transfer, National Institutes
of Health, 6011 Executive Boulevard, Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, Maryland 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**BROOKS, BRIAN P. y
GAHL, WILLIAM A.**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 532 834 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

Nitisinona para el tratamiento de albinismo oculocutáneo/ocular y para aumentar la pigmentación.

Antecedentes de la invención

5 El albinismo (también denominado acromía, acromasia o acromatosis) es un trastorno congénito caracterizado por la ausencia completa o parcial de pigmento en la piel, el pelo y los ojos debido a la ausencia o el defecto de una enzima implicada en la producción de melanina. Se conoce que determinadas formas de albinismo se deben a mutaciones en el metabolismo de tirosina. El albinismo resulta de la herencia de alelos de genes recesivos y se sabe que afecta a todos los vertebrados, incluyendo seres humanos. También se conoce una forma ligada al cromosoma X de albinismo. Los pacientes con albinismo tienen discapacidad visual significativa.

10 En el albinismo oculocutáneo (OCA) (a pesar de que su nombre derivado del latín signifique albinismo “de ojos y piel”), hay una carencia de pigmento en los ojos, la piel y el pelo. (La mutación equivalente en animales no humanos también da como resultado una carencia de melanina en el pelaje, las escamas o las plumas). Las personas con albinismo oculocutáneo pueden tener desde nada de pigmento en absoluto hasta niveles casi normales de pigmentación. Hay al menos tres tipos generales de OCA, caracterizados como tipo 1, tipo 2 y tipo 3.

15 El albinismo oculocutáneo de tipo 1 (OCA1) está provocado por una mutación en el gen de tirosinasa, y puede aparecer en dos variaciones. La tirosinasa convierte tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA) y DOPAquinona. La primera mutación de tipo OCA1 encontrada se identificó como OCA1a, que da como resultado un organismo que no puede desarrollar pigmento en absoluto. El pelo es habitualmente blanco (a menudo translucido) y la piel muy pálida. La visión en un individuo afectado oscila habitualmente entre 20/200 y 20/400. Una segunda mutación de tipo OCA1
20 conocida se identifica como tipo OCA1b, que asimismo tiene varios subtipos. Ésta es una forma menos grave de albinismo y algunos individuos afectados con OCA1b realmente pueden broncearse y desarrollar pigmento en el pelo.

25 Los pacientes con albinismo experimentan grados variables de pérdida de la visión asociada con hipoplasia de la fovea, nistagmo, fotofobia y/o sensibilidad al deslumbramiento, errores de refracción y decusación anómala de axones de células ganglionares en el quiasma óptico. Las opciones de tratamiento actuales para los problemas de visión provocados por el albinismo están limitadas a la corrección de errores de refracción y ambliopía, dispositivos de ayuda para baja visión y (en algunos casos) cirugía muscular extraocular.

30 Otra forma de albinismo es el albinismo ocular. El albinismo ocular es una alteración genética que afecta principalmente a los ojos. En el albinismo ocular, sólo los ojos carecen de pigmento. Las personas que padecen albinismo ocular tienen generalmente un color de piel y de pelo normal, aunque su coloración normalmente es más clara que cualquiera de sus padres. Muchos incluso tienen un aspecto de los ojos normal. Esta alteración reduce la coloración (pigmentación) del iris, que es la parte coloreada del ojo, y la retina, que es el tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo. La pigmentación en el ojo es esencial para una visión normal.

35 El albinismo ocular está caracterizado por nitidez de la visión (agudeza visual) gravemente deteriorada y problemas con combinar la visión de ambos ojos para percibir la profundidad (visión estereoscópica). Aunque la pérdida de la visión es permanente, no empeora a lo largo del tiempo. Otras anomalías oculares asociadas con este estado incluyen movimientos oculares rápidos e involuntarios (nistagmo), ojos que no miran en la misma dirección (estrabismo) y aumento de la sensibilidad a la luz (fotofobia). Muchos individuos afectados también tienen anomalías que implican los nervios ópticos, que portan la información visual desde el ojo hasta el cerebro.

40 A diferencia de algunas otras formas de albinismo, el albinismo ocular no afecta significativamente al color de la piel y el pelo. Las personas con este estado pueden tener una tez un tanto más clara que otros miembros de su familia, pero estas diferencias son habitualmente menores.

45 El albinismo ocular de tipo 1 resulta de mutaciones en el gen de GPR143. Este gen se encarga de construir una proteína que desempeña un papel en la pigmentación de los ojos y la piel. El gen de GPR143 ayuda a controlar el crecimiento de melanosomas, que son estructuras celulares que producen y almacenan un pigmento denominado melanina. La melanina es la sustancia que da a la piel, al pelo y a los ojos su color. En la retina, este pigmento también desempeña un papel en la visión normal.

50 La mayoría de las mutaciones en el gen de GPR143 alteran el tamaño o la forma de la proteína GPR143. Muchos de estos cambios genéticos impiden que la proteína alcance los melanosomas para controlar su crecimiento. En otros casos, la proteína alcanza los melanosomas de manera normal, pero las mutaciones alteran la función de la proteína. Como resultado de estos cambios, los melanosomas en células cutáneas y la retina pueden crecer hasta hacerse anómalamente grandes. Los investigadores no están seguros de cómo se relacionan estos melanosomas gigantes con la pérdida de la visión y otras anomalías oculares en personas con albinismo ocular.

55 Actualmente, los tratamientos para el deterioro visual de albinismo oculocutáneo son bastante limitados, y puede dejarse a niños con OCA con visión que se acerca o alcanza la ceguera legal. Incluso un efecto modesto sobre la función visual (tal como reducción de sensibilidad al deslumbramiento y a la luz) se aprecia enormemente por los

pacientes.

Como tal, existe una necesidad de mejorar el tratamiento de pacientes, particularmente para mejorar la visión de pacientes, que padecen diversas formas de albinismo.

Breve resumen de la invención

5 La nitisinona (NTBC) es un fármaco aprobado por la FDA usado en el tratamiento de tirosinemia, tipo 1. El fármaco bloquea la ruta de degradación normal de tirosina, permitiendo así mayores niveles de tirosina en plasma en circulación. Según la presente invención, se encontró que la administración de NTBC a sujetos (por ejemplo, ratones o seres humanos) con determinadas formas de albinismo, dio como resultado niveles de tirosina en circulación aumentados, un aumento en la actividad tirosinasa y, posteriormente, aumento de la pigmentación.

10 Realizaciones de la invención son:

Una composición farmacéutica que comprende (a) 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona (NTBC) o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (b) un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable, para su uso en el tratamiento de visión deteriorada en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo o albinismo ocular.

15 Uso de (a) NTBC o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (b) un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de visión deteriorada en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo o albinismo ocular.

Realizaciones adicionales se exponen en las reivindicaciones dependientes.

20 La presente invención ilustra un método para aumentar concentraciones plasmáticas de tirosina en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 micromolar (μM) hasta aproximadamente 2 milimolar (mM). En una realización adicional, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado

25 concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 70 μM hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μM hasta un intervalo de aproximadamente 300 μM . En una realización preferida, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto

30 que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μM . En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un

35 sujeto es de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

La presente invención ilustra un método para aumentar concentraciones plasmáticas de tirosina en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo, en el que el albinismo se identifica como de tipo OCA1a, o de tipo OCA1b.

40 La presente invención ilustra un método para aumentar concentraciones plasmáticas de tirosina en un sujeto que padece albinismo ocular, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 μM hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que

45 aumentan desde aproximadamente 70 μM hasta aproximadamente 2 mM. En otra realización, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μM hasta un intervalo de aproximadamente 300 μM . Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μM . La cantidad

50 terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC puede administrarse a un sujeto en una concentración de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente

55 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

La presente invención ilustra un método para tratar la visión deteriorada en un sujeto que padece albinismo

oculocutáneo o albinismo ocular, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 μM hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 70 μM hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μM hasta un intervalo de aproximadamente 300 μM . Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μM . La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

La presente invención ilustra un método para aumentar la pigmentación en los ojos, el pelo y/o la piel de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz de manera que las concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto se aumentan hasta una cantidad suficiente para aumentar la pigmentación discernible visualmente en el sujeto.

Breve descripción de las diversas vistas del/de los dibujo(s)

La figura 1 es la estructura química de la NTBC.

La figura 2 muestra la ruta metabólica para la degradación de tirosina en mamíferos y en la que NTBC bloquea la enzima 4-hidroxifenil-piruvato dioxigenasa de manera temprana en la ruta.

La figura 3 muestra una comparación de micrografías electrónicas de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) de ratones C57BL/6J-Tyr^{c-h/c-h}, que son un modelo de albinismo oculocutáneo. Las micrografías muestran aumentos en melanosomas (círculos oscuros) en los ratones tratados con NTBC en comparación con controles.

La figura 4 es una comparación del número de melanosomas pigmentados en tejidos oculares de ratones C57BL/6-Tyr^{c-h/c-h} (del Himalaya) tratados con vehículo y con NTBC.

La figura 5 es una gráfica que muestra los niveles en estado estacionario de tirosinasa silvestre, estabilizados con respecto a GAPDH a diversos puntos de tiempo mediante tirosina 1 mM.

La figura 6 es una gráfica que muestra los niveles en estado estacionario de tirosinasa R77L, estabilizados con respecto a GAPDH a diversos puntos de tiempo mediante tirosina 1 mM.

La figura 7 es una gráfica que muestra los niveles en estado estacionario de tirosinasa H420R, estabilizados con respecto a GAPDH a diversos puntos de tiempo mediante tirosina 1 mM. La estabilidad de la proteína H420R, pero no de la proteína R77L, está estabilizada con respecto a GAPDH a puntos de tiempo posteriores (9 y 12 horas) mediante tirosina 1 mM. Prueba de significación bilateral: valor de $p < 0,0001$ (**), valor de $p < 0,05$ (*).

La figura 8 muestra que el aumento de tirosina del entorno promueve la producción de pigmento en células que expresan el alelo OCA-1B, pero no OCA-1A. (8A) Aunque células Melan-c transfectadas con tirosinasa WT, R77L o H420R expresan niveles comparables de proteína (recuadro), sólo la tirosinasa H420R responde a tirosina 1 mM aumentando la producción de pigmento. (8B, 8C) Melanocitos humanos cultivados a partir de pacientes control y OCA1-B, pero no OCA-1A, muestran aumento de pigmento al incubarse con tirosina 1 mM.

Descripción detallada de la invención

La presente invención ilustra un método para aumentar concentraciones plasmáticas de tirosina en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 μM hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 70 μM hasta aproximadamente 2 mM. En otra realización, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μM hasta un intervalo de aproximadamente 300 μM . Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μM . La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día.

Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

5 La presente invención ilustra un método para aumentar concentraciones plasmáticas de tirosina en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo, por ejemplo, en el que el albinismo se identifica como de tipo OCA1a, lo que significa que el sujeto afectado no tiene actividad tirosinasa medible, o de tipo OCA1b, lo que significa que el sujeto afectado tiene actividad tirosinasa disminuida en gran medida. Se contempla que puedan tratarse otras formas de albinismo oculocutáneo mediante los métodos de la presente invención.

10 La presente invención ilustra un método para aumentar concentraciones plasmáticas de tirosina en un sujeto que padece albinismo ocular, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 μ M hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 70 μ M hasta aproximadamente 2 mM. En otra realización, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μ M hasta un intervalo de aproximadamente 300 μ M. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μ M. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

La presente invención ilustra un método para tratar la visión deteriorada en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo o albinismo ocular, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 μ M hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 70 μ M hasta aproximadamente 2 mM. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μ M hasta un intervalo de aproximadamente 300 μ M. Una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μ M. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día. Preferiblemente, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. La cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

La presente invención ilustra un método de tratamiento de albinismo oculocutáneo o albinismo ocular, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz. Además, los métodos dados a conocer en el presente documento no se limitan a albinismo oculocutáneo o albinismo ocular, sino que pueden usarse para sujetos que tienen otras formas de albinismo, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, albinismo que resulta de mutaciones en el gen de la proteína tau asociada a microtubulina (MATP, OCA4), el gen de la proteína P (OCA2) (véase, Brilliant, M.H., Pigment Cell Res., 14:86-93 (2001)) y en el gen de la proteína relacionada con tirosina 1 (TYRP1, OCA3) (véase, Sarangarajan, R. *et al.*, Pigment Cell Res., 14:437-44 (2001)).

La presente invención ilustra un método para aumentar la pigmentación en los ojos, el pelo y/o la piel de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéuticamente aceptable que comprende NTBC en una cantidad terapéuticamente eficaz de manera que las concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto se aumentan hasta una cantidad suficiente para aumentar la pigmentación discernible visualmente en el sujeto. En una realización, el uso de NTBC para aumentar la pigmentación de la piel, los ojos o el pelo, es para fines cosméticos.

Según la presente invención, en una realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoi)-1,3-ciclohexanodiona (NTBC) o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que la composición incluye un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable, en una cantidad eficaz para su uso en un medicamento, preferiblemente para su uso

como medicamento para tratar la visión deteriorada en los ojos de un sujeto que padece albinismo oculocutáneo, o para su uso como medicamento para tratar la visión deteriorada en los ojos de un sujeto que padece albinismo ocular, o para su uso como medicamento para aumentar la pigmentación en los ojos, el pelo o la piel de un sujeto, cuando se administra al sujeto en una cantidad eficaz. En una realización, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 7 μM hasta aproximadamente 2 mM. En una realización adicional, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde aproximadamente 70 μM hasta aproximadamente 2 mM. En otra realización, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 50 μM hasta un intervalo de aproximadamente 300 μM . En una realización preferida, una cantidad eficaz de NTBC es la cantidad administrada a un sujeto que da como resultado concentraciones plasmáticas de tirosina en el sujeto que aumentan desde al menos aproximadamente 70 μM . En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día, en algunas realizaciones, en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día. Preferiblemente, en otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de al menos aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día. En otra realización, la cantidad terapéuticamente eficaz de NTBC administrada a un sujeto es de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.

También se contempla que la composición farmacéutica de la presente invención pueda usarse para tratar sujetos que tienen albinismo oculocutáneo de tipo OCA1a y/o albinismo oculocutáneo de tipo OCA1b y/o albinismo ocular de tipo 1.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona (NTBC) o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que la composición incluye un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable, en una cantidad eficaz para su uso en un medicamento, preferiblemente para su uso como medicamento para tratar la visión deteriorada en los ojos de un sujeto que padece albinismo oculocutáneo, o para su uso como medicamento para tratar la visión deteriorada en los ojos de un sujeto que padece albinismo ocular, o para su uso como medicamento para aumentar la pigmentación en los ojos, el pelo o la piel de un sujeto, cuando se administra al sujeto en una cantidad eficaz, cuando el sujeto padece albinismo debido a una mutación en el gen de la proteína P (OCA2) y/o el gen de la proteína relacionada con tirosinasa-1 (TYRP-1, OCA3) y/o el gen de la proteína tau asociada a microtubulina (MATP, OCA4).

La NTBC está comercializada como Orfardin®, que se designó como fármaco sin interés comercial en mayo de 1995 por la FDA, para el tratamiento de un trastorno hereditario raro de metabolismo intermedio, tirosinemia de tipo 1, en la que los pacientes no pueden descomponer apropiadamente el aminoácido tirosina (figura 1). La síntesis y el uso de NTBC, y sus compuestos relacionados, como herbicida, se describen en la patente estadounidense 5.006.158.

La NTBC bloquea la enzima ácido parahidroxifenilpirúvico dioxigenasa (p-HPPD), la segunda etapa en la ruta de degradación de tirosina, impide la acumulación de fumarilacetoacetato y su conversión en succinilacetona (figura 2).

Debido a que la NTBC aumenta la concentración de tirosina en la sangre, debe considerarse inmediatamente la gestión dietética con ingesta controlada de fenilalanina y tirosina tras el diagnóstico, para impedir que se formen cristales de tirosina en la córnea de sujetos sometidos a terapia con NTBC. Si la concentración en sangre de fenilalanina se vuelve demasiado baja (<20 μM), deben añadirse proteínas adicionales a la dieta.

En las realizaciones en las que la vía de administración es distinta de la oral, las composiciones terapéuticas de la presente invención se colocan generalmente en un envase que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. La vía de administración de NTBC, según la presente invención, es según métodos conocidos, por ejemplo, ingesta oral, inyección o infusión mediante vías intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, subcutánea, intralesional, mediante vías de aerosol o intranasal, o mediante sistemas de liberación sostenida tal como se indica a continuación. La NTBC puede administrarse de manera continua mediante infusión o mediante inyección en bolo.

El término “tratar” así como palabras con la misma raíz, tal como se usa en el presente documento, no implican un tratamiento al 100% o completo. Más bien, existen grados variables de tratamiento para los que un experto habitual en la técnica reconoce que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento de albinismo en un sujeto. Además, el tratamiento proporcionado por el método de la invención puede incluir tratamiento de uno o más estados o síntomas del albinismo que está tratándose.

Una cantidad eficaz de NTBC que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos y de tratamiento, la vía de administración, la edad, el estado y la masa corporal del paciente que está sometido a tratamiento o terapia, y terapias auxiliares o adyuvantes proporcionadas al paciente. Por consiguiente, será necesario y de rutina que el médico valore la dosificación y modifique la vía de administración,

según se requiera, para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación diaria típica puede oscilar entre al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día y hasta aproximadamente 100 mg/kg/día o más, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 10 mg/kg/día dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Normalmente, el médico administrará anticuerpo hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales.

Los intervalos de dosificación para la administración de NTBC son aquéllos lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado en los que se mejoran los síntomas visuales de albinismo, tales como nistagmo, fotosensibilidad o estrabismo. La dosificación no debe ser tan grande como para provocar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, reacciones anafilácticas, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, el estado, el sexo y el grado de enfermedad del paciente y puede determinarse por un experto en la técnica. La dosificación puede ajustarse por el médico individual en el caso de cualquier complicación. En una realización, los métodos de la presente invención proporcionan la administración de NTBC a niños que padecen albinismo, en el intervalo de edad de desde seis meses hasta 6 años. En otra realización, los métodos de la presente invención proporcionan la administración de NTBC a adultos que padecen albinismo.

La NTBC se prescribe generalmente a pacientes que padecen albinismo oculocutáneo o albinismo ocular a dosificaciones de aproximadamente 1,0 mg/kg/día; sin embargo, las dosis individuales pueden variar. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de desde al menos aproximadamente 0,1 mg/kg/día hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, o preferiblemente, desde aproximadamente 0,5 mg/kg/día hasta aproximadamente 5 mg/kg/día. La dosificación debe ajustarse para mantener concentraciones de tirosina en plasma de entre al menos aproximadamente 10 μ M y concentraciones en el intervalo milimolar. Por ejemplo, concentraciones de tirosina en plasma de entre al menos aproximadamente 50 μ M y aproximadamente 2 mM, o por ejemplo, concentraciones de tirosina en plasma de entre al menos aproximadamente 70 μ M y aproximadamente 1 mM, o por ejemplo, concentraciones de tirosina en plasma de entre aproximadamente 200 μ M y aproximadamente 500 μ M. Se contempla que la dosificación terapéuticamente eficaz es una que teóricamente bloquea más del 99% de la actividad de *p*-HPPD.

La NTBC puede administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea, al interior de cavidades o por vía transdérmica, sola o en combinación con otros fármacos. Preferiblemente, la NTBC se administra por vía oral en forma de cápsula o pastilla. Se entiende que las pastillas formuladas para la administración oral, incluyendo las pastillas usadas en la presente invención, pueden contener componentes para servir como cargas, aglutinantes y para fines de codificación de color. Estos componentes son de uso común en muchas formulaciones orales y pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, povidona, estearato de magnesio, ácido esteárico, dióxido de silicio coloidal, hidroxipropilmetilcelulosa, polietilenglicol y uno o más de los siguientes colorantes: FD&C azul n.º 1 Lake, FD&C azul n.º 2 Aluminum Lake, D&C verde n.º 5, D&C amarillo n.º 10, FD&C amarillo n.º 6 o FD&C rojo n.º 3. Por supuesto, éstos son sólo cargas y colorantes a modo de ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que pueden usarse otros componentes inactivos en la preparación de las formulaciones de la presente invención.

Las preparaciones para la administración parenteral incluyen, por ejemplo, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen, por ejemplo, disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, solución de Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen, por ejemplo, reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como aquéllos basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

Las formulaciones inyectables también son según la invención. Los expertos habituales en la técnica conocen ampliamente los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Trissel, 15ª ed., páginas 622-630 (2009)).

Preferiblemente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable. Con respecto a composiciones farmacéuticas, el portador puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado sólo por consideraciones fisicoquímicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el/los compuesto(s) activo(s), y por la vía de administración. Los expertos en la técnica conocen ampliamente los portadores farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el portador farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte frente al/a los agente(s) activo(s) y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

Pueden usarse conservantes y tampones. Para minimizar o eliminar la irritación en el lugar de inyección, tales composiciones pueden contener, por ejemplo, uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de, ilustrativamente, desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 17. La cantidad de

tensioactivo en tales formulaciones normalmente oscilará entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen, por ejemplo, ésteres de ácido graso de polietilenglicol-sorbitano, tales como monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones pueden presentarse en envases sellados de una sola dosis o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en condiciones de secado por congelación (liofilizadas) que requieran solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles.

En una realización, la NTBC se administra por vía oral en dos dosis divididas; sin embargo, debido a la larga semivida (50-60 horas), los individuos afectados que son mayores y más estables pueden mantener una terapia adecuada con una dosificación al día. Por ejemplo, pueden administrarse las dosificaciones una vez al día o una vez cada dos días.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, de ninguna manera debe interpretarse que limitan su alcance.

Cría de animales y examen clínico. Se obtuvieron ratones C57BL/6J (lote n.º 000664), ratones C57BL/6J *Tyr^{c-2J/c-2J}* (lote n.º 000058, n.º de ID de MGI 1855985) y C57BL/6J *Tyr^{c-h/c-h}* (lote n.º 000104, n.º de ID de MGI 1855979) de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Se albergaron los ratones según las normas de la Junta institucional de revisión animal con un ciclo de 14 horas de luz/10 horas de oscuridad. Estos estudios se ajustaron a los principios para la investigación con animales de laboratorio explicados resumidamente por el Acta de bienestar animal (NIH/HHS) y la declaración ARVO para el Uso de animales en investigación oftálmica y de la visión y se aprobaron por el Comité institucional de cuidado y uso de los animales del Instituto nacional del ojo. Se realizó el examen clínico y la obtención de imágenes del segmento anterior de ratones en ratones despiertos, sujetados con cuidado usando una lámpara de hendidura Haag-Streit BQ y software Imaging Module IM900® (Haag-Streit, Inc., Mason, OH). Se realizó el examen clínico del segmento posterior en ratones despiertos, sujetados con cuidado tras dilatación con una gota de tropicamida al 1% (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) usando un oftalmoscopio indirecto (Keeler, Windsor, Berkshire, RU) con un condensador de 90D (Volk, Mentor, OH). Se obtuvieron imágenes del fondo del ojo en ratones sedados con 100 mg/ml de ketamina, 200 mg/ml de xilazina diluidas en solución salina normal inyectadas por vía intraperitoneal. Se obtuvieron las imágenes usando una cámara SLR digital D.90 de Nikon con una lente 85 mm f/2,8D micro AF-S ED de Nikon montada sobre un soporte de aluminio fabricado a medida, usando un otoscopio de Hopkins de 5 cm de longitud rígido acoplado a una fuente de luz Xenon Nova (175 vatios) y cable de fibra óptica (Karl Storz, Tuttlingen, Alemania). Se sacrificaron los ratones con dióxido de carbono según las directrices institucionales.

Dosificación y monitorización de fármaco. Se designaron diez ratones C57BL/6J *Tyr^{c-2J/c-2J}* y diez C57BL/6J *Tyr^{c-h/c-h}*, de 3-4 meses de edad para el tratamiento con NTBC (Swedish Orphan Drug, Estocolmo, Suecia). Se designó un número igual de controles emparejados por edad de cada genotipo para recibir tratamiento con vehículo. Se disolvió NTBC en NaOH 2 M y se llevó a pH neutro antes de la administración a ratones. Se documentó mediante fotografías el color del pelaje, transluminación del iris y el aspecto del fondo del ojo antes del tratamiento. Debido a que se estimula la deposición de pigmento en el pelo con el nuevo crecimiento de pelo, se afeitó una sección del pelaje de cada ratón antes del comienzo del experimento. Se administró fármaco o vehículo cada dos días mediante sondas orales, a una dosificación de aproximadamente 4 mg/kg, en un volumen de aproximadamente 0,2-0,3 ml. Se eligió esta dosis de NTBC para administrar concentraciones de tirosina en plasma en el intervalo de aproximadamente 0,3-0,7 mM, o aproximadamente de dos a cuatro veces las dosis usadas normalmente en seres humanos con tirosinemia de tipo 1, y dentro de los límites de las dosis toleradas máximas en ratones. Se documentó mediante fotografías el color del pelaje, transluminación del iris y aspecto del fondo del ojo al final del mes 1 de dosificación con tratamiento o vehículo. Para experimentos de tratamiento prenatal, se determinó la preñez por un aumento del peso maternal de ≥ 2 g a lo largo de 7-9 días, tras observar un tapón mucoso vaginal. Se inició el tratamiento con 4 mg/kg de NTBC diariamente en el día 9 ó 10 de preñez mediante sonda oral, y se administró hasta el nacimiento de la camada. En ese punto, se inició el tratamiento oral cada dos días de la madre hasta el momento del destete.

Se sometió a ensayo la tirosina en plasma a partir de la sangre retroorbital extraída de ratones a 1 semana y 4 semanas en tratamiento. Debido a que el volumen de sangre que pudo obtenerse de extracciones no terminales era pequeño, se combinó el plasma de 2-3 ratones para realizar una medición individual. Se congelaron muestras de plasma inmediatamente tras la recogida sobre hielo seco. Se descongelaron suavemente las muestras listas para el ensayo, se diluyeron con un volumen igual de tampón de carga (citrate de litio 0,2 M, pH 2,2) y se filtraron usando Vivaspin 500 (punto de corte de peso molecular de 3000 Da, Sartorius Stedman Biotech, Göttingen, Alemania) se centrifugaron en un centrífuga de ángulo fijo a aproximadamente 14000 x g durante 60 minutos a una temperatura de aproximadamente 16-20°C. Se recogió el sobrenadante y se cuantificó la tirosina en un espectrofotómetro Biochrom 30 (Biochrom, Ltd., Cambridge, RU) usando las especificaciones del fabricante.

Microscopía electrónica de transmisión. Se disecaron los ojos de ratones tratados con fármaco y vehículo y se dividieron en segmentos anteriores y posteriores (n=2 ojos de 2 ratones separados en cada grupo). Se extrajeron el

iris y la parte posterior (coroides, EPR y retina) de los ojos y se fijaron en glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en tampón fosfato de sodio 0,1 M (PB), pH 7,4 durante aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente (TA). Tras un lavado con tampón de aclarado (RB, sacarosa al 4% y CaCl₂ 0,15 mM en PB), pH 7,4 a 4°C, se fijaron posteriormente los tejidos en OsO₄ al 1% en PB 0,1 M, pH 7,4 durante 1 hora. Tras el aclarado y la deshidratación, se incrustaron los tejidos en resina Durcupan durante 72 horas a 60°C. Se usaron semi-secciones de un micrómetro para la orientación de tejidos. También se recogieron ultrasecciones de aproximadamente 70-90 nm en rejillas de 200 de malla y se contratiñeron con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0,3%. Se visualizaron las secciones en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1010 a 60 KV (JEOL Korea, Ltd., Seúl, KR) y se adquirieron imágenes digitales a aumentos de aproximadamente 8000 X a aproximadamente 30.000 X mediante software AMT (Advanced Microscopy Techniques, Corp., Danvers, MA).

Modelado estructural. Se han modelado las estructuras atómicas de la tirosinasa de ratón usando los coordinados cristalinos de dos proteínas tirosinasa que se unen a dos átomos de cobre del Protein Data Bank RCSB (<http://www.pdb.org/pdb>) como moldes estructurales: 1) tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* que forma complejo con una proteína caddie [Protein Data Bank ID: 2ah1]; y 2) la catecol (O-difenol) oxidasa de la patata dulce *Ipomea batatas* que contiene un centro con dos átomos de cobre [Protein Data Bank ID: 1bt3] (E. Abola, *et al.*, en Crystallographic Databases-Information Content, Software Systems, Scientific Applications, G. Bergerhoff, R. Sievers, Eds. (Data Commission on the International Union of Crystallography, Cambridge, 1987), págs. 107-132). En resumen, se realizó la alineación estructural de estas proteínas usando el módulo MatchMaker incorporado en UCSF Chimera, versión 1.4.1 (E. F. Pettersen *et al.*, J Comput. Chem., 25:1605 (2004)). Se alinearon las secuencias primarias usando el método de Needleman y Wunsch (S. B. Needleman y C. D. Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 (1970)) integrado en el programa Look, versión 3.5.2 para la predicción de la estructura terciaria (C. Lee, J. Mol. Biol., 236:918 (1994)). La conformación de las variantes de sentido erróneo, R77L y H420R, se generó mediante el mismo programa que implica una optimización de conjunto autoconsistente (500 ciclos).

Expresión y actividad enzimática *in vitro*. El constructo de expresión de ratón *Tyr* fue una donación de Dr. C. Olivares de la Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia (España). Se preparó este constructo en el vector de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando sitios de restricción EcoRI/XbaI y basándose en el clon *Tyr* de ratón obtenido tal como se describió anteriormente en C. Olivares, *et al.*, Biochem. J., 354:131 (2001). Se crearon constructos de variantes mutantes del gen de tirosinasa, con cambios correspondientes a mutaciones de sentido erróneo de R77L y H420R en la secuencia de proteína de tirosinasa de ratón, usando metodologías convencionales (Mutagenex Inc., Piscataway, NJ). Se verificaron todos los cambios de mutación mediante la secuenciación de ADNc. Se separaron electroforéticamente lisados de proteínas para las variantes de sentido erróneo R77L y H420R de tirosinasa de ratón silvestre en condiciones reductoras, se sometieron a transferencia y entonces se estudiaron con sonda con antisuero α PEP7, dirigido contra la extensión citosólica C-terminal de *Tyr*. El antisuero α PEP7 fue una generosa donación de Dr. V. J. Hearing del Instituto nacional del cáncer, Instituto nacional de salud, Bethesda, MD.

Se hicieron crecer células de ovario de hámster chino (CHO) (donación generosa de Dr. J.T. Wroblewski del Departamento de farmacología, Centro médico de la Universidad de Georgetown, Washington DC) a una temperatura de aproximadamente 37°C en medio DMEM, en presencia de suero bovino fetal al 10%, penicilina al 1% y 4,5 g de prolina por cada 0,5 litros de medio. Se transfectaron células CHO o bien con tirosinasa de ratón o bien con variantes mutantes, usando el vector de expresión pcDNA3.1 y reactivo Lipofectamine LTX según las instrucciones del fabricante (Invitrogen, CA). En los experimentos con ciclohexamida (CHX), se trataron células con CHX (2 μ g/ml) o se trataron previamente con tirosina (1 mM) durante 24 horas antes de la adición de CHX en el ensayo de transcurso de tiempo (0, 1, 3, 6, 9 y 24 horas). Tras el periodo de tratamiento, se recogieron las células con tampón de lisis (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, Igepal-CA630 al 1%, inhibidor de la proteasa) y se microcentrifugaron durante 30 minutos a 13.200 x g, a una temperatura de aproximadamente 4°C, para obtener un lisado de proteínas. Se determinó el contenido de proteína total en lisados de proteínas espectrofotométricamente como razón 280/260. Se analizó la expresión de proteínas mediante inmunotransferencia de tipo Western y se usó GAPDH como control de carga interno. Para el análisis, se exploraron las inmunotransferencias de tipo Western, se determinaron las intensidades de las bandas de proteína y se calcularon las razones de las intensidades de banda para las variantes silvestre o mutante, con respecto a las de GAPDH. Se tuvo cuidado en elegir imágenes no saturadas para el análisis.

Cultivos de células Melan-c. Se cultivaron células Melan-c (melanocitos derivados de ratones homocigóticos para la mutación albino (D. C. Bennett *et al.*, Development, 105:379 (1989)) en RPMI 1640, pH 6,9 complementado con suero bovino fetal al 5% (FBS), estreptomycin-penicilina (100 μ g/ml cada una), acetato de tetradecanilo-forbol (TPA) 200 nM y β -mercaptoetanol 100 μ M, a 37°C en CO₂ al 10%. Se transfectaron células usando reactivo Fugene HD según las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics Inc., Indianápolis, IN) en presencia o ausencia de tirosina 1 mM. Tras 24 horas, se lavaron las células dos veces con tampón fosfato de solución salina, se recogieron en fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8, que contenía Igepal CA-630 al 1% e inhibidor de la proteasa (Roche) y se microcentrifugaron durante 30 minutos a 13.200 x g, a una temperatura de aproximadamente 4°C para obtener un lisado de proteínas.

Se determinó la actividad difenol oxidasa de tirosinasa espectrofotométricamente según Slominski *et al.*, J. Invest.

Dermatol., 96:172 (1991), con modificaciones menores. En resumen, las mezclas de reacción contenían L-dopa 7 mM en tampón fosfato de sodio 0,1 M (pH 6,8) y se incubó el lisado de proteínas (20 mg/ml) a 37°C y se monitorizó midiendo la absorbancia a 475 nm. Se realizaron todos los experimentos por triplicado.

5 Ensayo de cultivo de melanocitos humanos y melanina. Se establecieron melanocitos humanos a partir de biopsias con sacabocados de la piel. Se lavaron las muestras de piel con PBS, entonces se trataron con tripsina-EDTA al 0,25% (Gibco 25200) durante aproximadamente 2 horas seguido por agitación en vórtex vigorosa para separar la epidermis. Se seccionó la epidermis y se unió a zonas ranuradas sobre el fondo de una placa de poliestireno de 6 pocillos antes de recubrirse con medio de melanocitos. Se prepararon aproximadamente 1000 ml de medio de melanocitos a partir de 950 ml de F10 de Ham (Gibco 1550), 25 ml de FBS, 5 ug de bFGF (Sigma F0291), 10 µg de endotelina (Sigma, E7764, Sigma Chemicals, St. Louis, MO), 7,5 mg de IBMX (Sigma 17018), 30 µg de toxina del cólera (Sigma C8052), 3,3 µg de TPA (Sigma P8139), 10 ml de PenStrepGlutamine, 1 ml de Fungizone y se filtró el medio a 0,22 µm.

15 Se sembraron en placa melanocitos en placas de 6 pocillos y se hicieron crecer hasta la confluencia. Se ejecutaron los ensayos de melanina por triplicado complementando tres pocillos por placa con tirosina 1 mM (Sigma T8566), usando los 3 pocillos restantes como controles no tratados. El tiempo de tratamiento fue de aproximadamente una semana. Se recogieron los melanocitos de cada pocillo por separado mediante tripsinización y se lavaron dos veces con 1x PBS. Se resuspendieron los sedimentos en 400 µl de 1 x PBS y se sonicaron brevemente. Entonces se fraccionó el lisado hasta un volumen igual de NaOH 2 N (300 µl) y se incubó a 80°C durante 1 hora para solubilizar la melanina. Se midió la DO_{475} y se convirtió en contenido en melanina mediante una curva patrón usando melanina sintética (Sigma M0418). Se normalizaron los datos con respecto al contenido en proteína, se determinaron usando un kit de ensayo de ácido bicinconínico (BCA) (BioRad, Inc., Hercules, CA). Se analizaron las diferencias entre mediciones tratadas y sin tratar con una prueba de la t desapareada bilateral.

25 Participantes del estudio. Se determinaron los sujetos de investigación con OCA mediante un protocolo de investigación clínica aprobado por la IRB en el National Human Genome Institute, Instituto nacional de salud. La investigación en seres humanos cumplía con la Declaración de Helsinki. Se definieron OCA-1A y OCA-1B según criterios clínicos en base a la coloración del pelo, de los ojos y de la piel en el momento del primer examen clínico. Además de disminución de la pigmentación en el pelo y la piel, ambos pacientes tenían anomalías oftálmicas que concuerdan con albinismo, incluyendo transluminación del iris, nistagmo, agudeza visual disminuida y un fondo del ojo albinótico, sin reflejo foveal claro. La confirmación molecular incluía secuenciar los genes para los tipos 1 y 2 de OCA (*TYR* y *OCA2* respectivamente). El sujeto con OCA-1A tenía dos mutaciones causantes de enfermedad conocidas en *TYR* (c.230A>G, c.242C>T) y ninguna variante con probabilidad de causar enfermedad en *OCA2*. El sujeto con OCA1B tenía una variante causante de enfermedad conocida (c.229T>A) en *TYR*, y ninguna mutación con probabilidad de causar enfermedad en *OCA2* (hasta el 63% de pacientes con *OCA2B* no tienen una segunda mutación de *TYR* identificable).

35 EJEMPLO 1

Este ejemplo demuestra/somete a prueba el efecto de dosis clínicamente relevantes de NTBC en un modelo de ratón de albinismo oculocutáneo, tipo 1 a, (C57BL/6J-*Tyr*^{c-2J/c-2J}) usando variables de resultados oculares, sistémicas y bioquímicas predefinidas.

40 Los ratones C57BL6/J-*Tyr*^{c-2J/c-2J} son fenotípicamente albinos debido a una mutación G291T (Arg77Leu) en el gen *Tyr* que no es funcional a nivel proteico (Green, E.L., Mouse News Lett., 49:31 (1973)). Estos ratones tienen un color de pelaje blanco y ojos rosas, y carecen de pigmentación en el fondo del ojo significativa. Como tal, son un modelo razonable de albinismo oculocutáneo de tipo OCA1a. Aunque estos ratones son completamente albinos, la mutación en su gen de tirosinasa es una mutación de sentido erróneo. Esto deja abierta la posibilidad de que la tirosina elevada puede estabilizar la enzima y mejorar el flujo a través de las rutas de producción de pigmento. Para 45 minimizar el efecto de factores genéticos adicionales sobre el fenotipo, ambas líneas de ratones usadas en estos experimentos son del mismo origen C57BL6/J consanguíneo.

Al comienzo del estudio, se documentaron concentraciones plasmáticas de tirosina, color del pelaje (macroscópica y microscópicamente), pigmento del segmento anterior y pigmento del segmento posterior de nivel inicial para cada ratón antes de iniciar los experimentos. Se trataron al menos diez ratones C57BL6/J-*Tyr*^{c-2J/c-2J}, de 3-4 meses de edad, con aproximadamente 25 µg de NTBC en un volumen de aproximadamente 0,2-0,3 ml, cada dos días, mediante sonda oral durante un periodo de cuatro semanas. Se compararon estos ratones tratados con una cohorte apareada para la edad y el género de ratones C57BL6/J-*Tyr*^{c-2J/c-2J} a lo largo del mismo periodo de tiempo. Se demostró anteriormente la eficacia y la seguridad de NTBC a esa dosis en otros modelos murinos. Se conoce que un posible efecto secundario de tratamiento con NTBC es la irritación de la córnea, que se monitoriza diariamente. Al 55 comienzo del tratamiento, se depiló o afeitó una zona de pelo del lomo de cada ratón, lo que tiene el efecto de estimular el crecimiento de pelo nuevo y posiblemente nueva deposición de pigmento en el tallo del pelo. Al final del tiempo de cuatro semanas, se evaluaron las concentraciones de tirosina en plasma en los animales tanto tratados como control.

La evaluación del efecto del tratamiento y el final del periodo de tiempo experimental comenzó con

5 fotodocumentación del color del pelaje, pigmento del segmento anterior y pigmento del segmento posterior de cada ratón. Se sacrificaron los ratones usando un protocolo de eutanasia con CO₂ convencional. Se sometió un ojo de cada ratón a microscopía óptica, mientras que el otro se preparó para microscopía electrónica. Se recogieron tejidos de hígado y riñón y se procesaron para histología mediante microscopía óptica, para asegurar que no hay ninguna patología asociada con el tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre adicionales y se congelaron en el momento de la eutanasia, para posibles estudios en el futuro. Se examinaron tallos de pelo en zonas depiladas y no depiladas y se fotografiaron mediante microscopía óptica. Se cuantificó el número y el tamaño de los melanosomas en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y coroides del polo posterior de ratones tanto tratados como no tratados, de un modo enmascarado, tal como se describió anteriormente por el grupo (Brooks, B.P., *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 48(9):3905-13 (2007)).

10 Resultados. El protocolo de animal inicial comenzó con una dosis de 1 mg/kg de NTBC administrada a ratones $Tyr^{c-2J/c-2J}$, cada dos días, mediante sonda oral, una dosis similar a la administrada a seres humanos con tirosinemia, tipo 1. Se trataron diez $Tyr^{c-2J/c-2J}$ y se determinaron los niveles de tirosina en plasma tras un mes. A esta dosis, a lo largo de este intervalo, no se observaron cambios en el fenotipo y las concentraciones de tirosina en plasma no eran diferentes de manera estadísticamente significativa entre animales tratados y control.

15 Los estudios toxicológicos muestran que ratones albinos $Alpk:ApfCD-1$ macho (de 3-6 semanas de edad) toleran dosis de NTBC de hasta 160 mg/kg/día (Lock, E.A., *et al.*, Toxicology, 144:179-187 (2000)). Se alcanzaron concentraciones de tirosina en plasma máximas a o por debajo de 10 mg/kg de NTBC. La dosificación de NTBC en los dos modelos de ratón se aumentó hasta 4 mg/kg por vía oral, cada dos días. Las mediciones de tirosina en plasma de animales control y tratados se presentan en la tabla 1, a continuación. El tratamiento con NTBC dio como resultado un aumento de aproximadamente 6 veces de las concentraciones de tirosina en plasma en estado estacionario en ratones $Tyr^{c-2J/c-2J}$.

20 Se comparó el color de pelaje con controles representativos y ratones tratados, al final del ensayo. Aunque los niveles de tirosina en plasma se elevaron aproximadamente 6 veces, no hubo diferencia en el color del pelaje, pigmentación del fondo del ojo o transluminación del iris en ratones $Tyr^{c-2J/c-2J}$. Tampoco hubo cambios observables en la pigmentación ocular de ratones control frente a ratones tratados, a lo largo del periodo de tiempo estudiado (datos no mostrados).

TABLA 1: Concentraciones de tirosina en plasma en ratones $Tyr^{c-2J/c-2J}$ y $Tyr^{c-h/c-h}$ control y tratados con NTBC (4 mg/kg cada dos días) tras 30 días de tratamiento

Grupo	$Tyr^{c-2J/c-2J}$ (modelo de OCA1a)	Tyr^{c-h} (modelo de OCA1b)
Control	109 ± 30 μM (n=6)	74 ± 25 μM (n=6)
Tratamiento con NTBC	673 ± 73 μM (n=4, p= 1 x 10 ⁻⁷)	305 ± 35 μM (n=4, p= 2 x 10 ⁻⁶)

30 EJEMPLO 2

Este ejemplo demuestra el efecto de dosis clínicamente relevantes de NTBC en un modelo de ratón de albinismo oculocutáneo, tipo OCA1b, (C57BL/6J- $Tyr^{c-h/c-h}$, que porta un mutación en la tirosinasa sensible a la temperatura) usando variables de resultados oculares, sistémicas y bioquímicas predefinidas.

35 La línea de ratón del Himalaya es una línea de ratón C57BL/6 mutante que porta un alelo de tirosinasa sensible a la temperatura, Tyr^{c-h} (n.º de ID de registro de MGI 72456), que surgió espontáneamente en un ratón C57BL/6 en 1958, y desde entonces se ha cruzado de manera consanguínea en el origen C57BL/6. La actividad máxima de la tirosinasa producida a partir de este alelo se produce a temperaturas por debajo de la temperatura corporal normal (37°C), debido a que la proteína mutante (c.A1259G, p.H420R) es termolábil. En homocigotos, el primer pelaje es uno moreno claro uniforme. En la primera muda, el pelo del cuerpo se vuelve más claro y las orejas, la nariz, la cola y el escroto se vuelven oscuros como en gatos siameses. Los ojos están ligeramente pigmentados y aparecen rojos. Se albergaron ratones del Himalaya en condiciones convencionales, a temperatura ambiente. Debido a que el alelo del Himalaya conserva cierta actividad enzimática residual, se cree que estos ratones son un modelo adecuado para albinismo oculocutáneo de tipo OCA1b.

45 Usando el mismo protocolo descrito anteriormente, se documentaron la tirosina en plasma, el color del pelaje (macroscópica y microscópicamente), el pigmento del segmento anterior y el pigmento del segmento posterior de nivel inicial para cada ratón antes de iniciar los experimentos. Se trataron al menos diez ratones C57BL/6J- $Tyr^{c-h/c-h}$, de 3-4 meses de edad, con aproximadamente 25 μg de NTBC en un volumen de aproximadamente 0,2-0,3 ml, cada dos días, mediante sonda oral durante un periodo de cuatro semanas. Se compararon estos ratones tratados con una cohorte apareada para la edad y el género de ratones C57BL/6J- $Tyr^{c-h/c-h}$ a lo largo del mismo periodo de tiempo. Se monitorizó la irritación de la córnea debida a tratamiento con NTBC diariamente. Al comienzo del tratamiento, se depiló/afeitó una zona de pelo del lomo de cada ratón, lo que tiene el efecto de estimular el crecimiento de pelo nuevo y posiblemente nueva deposición de pigmento en el tallo del pelo. Al final del tiempo de cuatro semanas, se evaluaron las concentraciones de tirosina en plasma en animales tanto tratados como control.

La evaluación del efecto del tratamiento y el final del periodo de tiempo experimental comienza con

5 fotodocumentación del color del pelaje, pigmento del segmento anterior y pigmento del segmento posterior de cada ratón. Se sacrificaron los ratones usando un protocolo de eutanasia con CO₂ convencional. Se sometió un ojo de cada ratón a microscopía óptica, mientras que el otro se prepara para microscopía electrónica. Se recogieron tejidos de hígado y de riñón y se procesaron para histología mediante microscopía óptica, para asegurar que no hay ninguna patología asociada con el tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre adicionales y se congelaron en el momento de la eutanasia, para posibles estudios en el futuro. Se examinaron tallos de pelo en zonas depiladas y no depiladas y se fotografiaron mediante microscopía óptica. Se cuantificó el número y el tamaño de los melanosomas en las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) y coroides del polo posterior de ratones tanto tratados como no tratados, de un modo enmascarado, tal como se describió anteriormente.

10 Resultados. Al igual que en el ejemplo 1 anterior, se trataron ocho ratones *Tyr^{c-h/c-h}* y se determinaron los niveles de tirosina en plasma tras un mes. A esta dosis, a lo largo de este intervalo, no se observaron cambios en el fenotipo y las concentraciones de tirosina en plasma no eran diferentes de manera estadísticamente significativa entre animales tratados y control.

15 Se aumentó la dosificación de NTBC en ocho ratones *Tyr^{c-h/c-h}* hasta 4 mg/kg por vía oral, cada dos días. Se presentan mediciones de tirosina en plasma de animales control y tratados en la tabla 1. El tratamiento con NTBC dio como resultado un aumento de aproximadamente 4 veces en las concentraciones de tirosina en plasma en estado estacionario en ratones *Tyr^{c-h/c-h}* (datos no mostrados).

20 Se encontró que los cambios bioquímicos iban acompañados de cambios en el fenotipo en los ratones *Tyr^{c-h/c-h}*, pero no en los *Tyr^{h-2J/c-2J}*. Se depositó nuevo pigmento en tallos de pelo de los ratones según crecían. Para estimular este crecimiento, se afeitó una zona de pelo sobre el lomo de animales control y tratados inmediatamente antes de la aleatorización. También se tomaron fotografías de la pigmentación ocular del segmento anterior y posterior antes y después del periodo de estudio. Mientras que la pigmentación del pelaje y ocular de ratones *Tyr^{h-2J/c-2J}* no cambiaron macroscópicamente a lo largo del periodo de un mes, hubo un aumento observable en pigmentación en los ratones *Tyr^{c-h/c-h}* tratados en comparación con ratones *Tyr^{c-h/c-h}* control. En algunos casos, la pigmentación se extendió más allá de la zona inmediata que se afeitó y otras zonas que estaban un tanto pigmentadas anteriormente (por ejemplo, la nariz) (datos no mostrados).

25 Mientras que los iris de los ratones del Himalaya en el grupo control y pretratamiento mostraron una ausencia casi completa de pigmentación, todos los animales en el grupo tratado mostraron cierto aumento en la pigmentación del iris (datos no mostrados). La pigmentación del fondo del ojo tampoco cambió macroscópicamente. Sin embargo, cuando se examinó a nivel de microscopía electrónica, los datos preliminares mostraron un aumento significativo en el EPR y contenido de pigmento en melanosomas coroides en los ratones tratados, pero no en los ratones control (figura 3).

EJEMPLO 3

35 En este ejemplo, se proporciona un estudio con pacientes pediátricos para el tratamiento de problemas de visión asociados con albinismo oculocutáneo de tipo OCA1b.

40 La inclusión de pacientes comienza con pruebas de genotipo para determinar qué tipo de albinismo presenta cada sujeto clínico. Se examinan los pacientes en base al gen que está mutado, por ejemplo, tirosinasa (OCA1), el gen de la proteína P (OCA2), el gen de la proteína relacionada con tirosinasa-1 (TYRP-1, OCA3) y el gen de MATP (OCA4). OCA1, la forma más común de OCA en personas de raza blanca de Norte América, puede dividirse adicionalmente en aquellos individuos que carecen de actividad tirosinasa (OCA1a) y aquellos que tienen cierta actividad tirosinasa residual (OCA1b). Se usan pruebas moleculares clínicas del gen de tirosinasa para identificar mutaciones en pacientes que cumplen con los criterios clínicos para albinismo, pero que producen cierto pigmento. El efecto de la mutación sobre la actividad enzimática se determina de manera experimental.

45 La evaluación de la visión de todos los pacientes se lleva a cabo para medir la agudeza visual, la sensibilidad a contraste (con y sin deslumbramiento), la velocidad de lectura, la producción de pigmento (mediante fotografía), el nistagmo, el estrabismo y la fotofobia, usando métodos convencionales en la técnica.

50 Entonces se aleatorizan los pacientes y se asignan a grupos control y de tratamiento ciegos. Los grupos de tratamiento se dividen adicionalmente en dos niveles de dosificación: 0,7 mg/kg/día y 1,0 mg/kg/día. La duración del estudio es de noventa días. Cada semana durante el estudio, y al final del ensayo del día treinta, se realizan evaluaciones visuales de los pacientes. Además, se realizan observaciones de cualquier otra manifestación clínica de aumento de la pigmentación. Al final del estudio se comparan las mediciones visuales de los pacientes en las dos ramas de tratamiento con las de la rama control y se distinguen diferencias estadísticas significativas entre los grupos.

EJEMPLO 4

55 Este ejemplo proporciona evidencias de que el tratamiento con NTBC aumenta el contenido en melanina en los melanosomas de tejidos oculares.

Con el fin de cuantificar el efecto de NTBC sobre la pigmentación en tejidos oculares y evaluar para determinar cambios subclínicos en la pigmentación ocular, se realizó microscopía de transmisión electrónica (TEM) de iris, epitelio pigmentario de la retina (EPR) y coroides de ratones tratados y control (n=4 ojos de 2 ratones para cada grupo). Cuando se compararon imágenes de TEM de iris, coroides y EPR de ratones $Tyr^{c-2J/c-2J}$ tratados con NTBC con los de ratones no tratados, se observó de poco a ningún aumento en el número de melanosomas pigmentados (fases III y IV), lo que concuerda con las observaciones clínicas (datos no mostrados). La pequeña cantidad de pigmento presente en ratones tratados era irregular y no clara en melanosomas. En cambio, las imágenes de TEM de iris, coroides y EPR de ratones $Tyr^{c-h/c-h}$ tratados con NTBC mostró un claro aumento en el número de melanosomas pigmentados en comparación con controles. Esta diferencia era estadísticamente significativa en los tres tejidos examinados (figura 4).

EJEMPLO 5

El siguiente ejemplo describe cómo el tratamiento prenatal con NTBC aumenta la pigmentación del pelaje y el iris en crías $Tyr^{c-h/c-h}$.

Con el fin de evaluar si la elevación de tirosina en plasma mediante tratamiento con NTBC podría tener un efecto temprano en el desarrollo, se trataron hembras $Tyr^{c-h/c-h}$ preñadas con 4 mg/kg de NTBC. Mientras que las crías de madres tratadas con vehículo tenían un color del pelaje similar al silvestre, las crías de madres tratadas con NTBC eran considerablemente más oscuras. Los exámenes oculares realizados próximos al momento de destete mostraron que los iris de crías nacidas de madres tratadas con vehículo se asemejaban a los de ratones del Himalaya no tratados. Sin embargo, los iris de crías nacidas de madres tratadas con NTBC mostraron pigmentación significativa en examen clínico. No hubo diferencias significativas entre el aspecto de fondo del ojo de crías nacidas de madres tratadas con vehículo y tratadas con fármaco (datos no mostrados). Las crías de madres tratadas no tenían malformaciones congénitas o enfermedades sistémicas evidentes. Estos datos sugieren que la eficacia de NTBC en el aumento de pigmentación ocular y cutánea en ratones del Himalaya se extiende al periodo prenatal/neonatal.

EJEMPLO 6

En el siguiente ejemplo, el modelado *in silico* de mutaciones de tirosinasa de ratón concuerda con las observaciones *in vivo*.

Se pensó que la NTBC ejercía su efecto de aumento de pigmento en ratones del Himalaya aumentando las concentraciones de tirosina, que, a su vez, actúa como chaperona molecular para tirosinasa. Con el fin de explicar los efectos distintos de NTBC sobre los dos modelos de OCA estudiados, se modeló *in silico* el efecto predicho de los mutantes de tirosinasa *c-2J* (R77L) y *c-h* (H420R).

Se realizaron las simulaciones de dinámica molecular (DM) y procedimiento de minimización con el módulo Impact del paquete de programa Maestro (versión 8.0.308, Schrodinger, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.). Se añadieron átomos de hidrógeno a la estructura de tirosinasa de ratón y se regularizó la estructura mediante un procedimiento de minimización de la energía usando los potenciales OPLS_2005, los valores de corte de material no unido de 12 Å, la constante dieléctrica dependiente de la distancia y 100 etapas de minimización de descenso brusco seguidas por 200 etapas de gradiente conjugado en presencia de moléculas de agua 7135 SPC en la etapa final. Se calcularon trayectorias de DM en una caja rectangular periódica de moléculas de agua SPC explícitas. Se equilibraron las estructuras de la enzima y los dominios similares a EGF usando la caja de agua SPC con dimensiones 70 Åx70 Åx70 Å para el dominio de la enzima tirosinasa y motivo similar a EGF. Todos los enlaces estaban restringidos por el algoritmo de resolución de restricción lineal. Se mantuvo la temperatura constante a 298,15°K. Se aplicaron acoplamiento de presión isotrópica del sistema y electrostática de partículas de malla de Ewald rápida. Se equilibró el disolvente mediante 20 ps de DM restringida de posiciones de soluto (20.000 de etapas 1 fs). Finalmente, se sometió a prueba la calidad de la estructura predicha con el programa Procheck (R. A. Laskowski, *et al.*, J. Appl. Cryst., 26:283 (1993)).

Debido a que la cristalografía de rayos X no se ha realizado satisfactoriamente en tirosinasa de mamíferos, los análisis de homología-modelado indicados anteriormente y presentados en el presente documento se basan, en parte, en las estructuras cristalinas disponibles de tirosinasa de procariota (*Streptomyces castaneoglobisporus*) y de hongos, hemocianina de invertebrados y catecol oxidasa vegetal (véanse, J. C. Garcia-Borron, *et al.*, Pigment Cell Res., 15:162 (2002); W. P. Gaykema, *et al.*, J. Mol. Biol., 187:255 (1986); T. Klabunde, *et al.*, Nat. Struct. Biol., 5:1084 (1998); T. Schweikardt *et al.*, Pigment Cell Res., 20:394 (oct. 2007); M. Sendovski, *et al.*, J. Mol. Biol., 405:227 (2011); Y. Matoba, *et al.*, J. Biol. Chem., 281:8981 (2006)).

La mutación de *c-2J*, R77L, se produce en un fragmento estructural en el extremo amino-terminal que se identifica mediante la Herramienta de investigación de arquitectura modular simple (*Simple Modular Architecture Research Tool*) (SMART) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) como un dominio similar a EGF/laminina. Aunque la función precisa de este dominio no se conoce, se predice que la mutación de R77L tiene consecuencias estructurales principales basándose en la puntuación de blosum70 negativa (-3) y una distancia de Grantham significativa de 102. El equilibrado de la estructura usando dinámica molecular 3ps sugiere que el cambio mutacional tiene un efecto

drástico sobre la unión a tirosina, lo que se cree que se produce en la superficie hidrófoba del sitio catalítico. Como tal, se creyó que elevar las concentraciones de tirosina del entorno tendrá poco o ningún efecto sobre la función enzimática de nivel inicial, de acuerdo con los resultados *in vivo* encontrados.

- 5 En cambio, la mutación del Himalaya (*c-h*), H420R, demuestra una puntuación blosum70 de 0 y una menor distancia de Grantham de 29, sugiriendo ambos un cambio estructural menos grave. Más que afectar directamente a la estructura del bolsillo de unión a tirosina hidrófobo, el modelo descrito en el presente documento predice un mayor efecto sobre la coordinación de cobre junto al sitio activo. Como tal, estos resultados concuerdan con los datos *in vivo* descritos en el presente documento.

EJEMPLO 7

- 10 Este ejemplo describe cómo las concentraciones de tirosina elevadas estabilizan tirosinasa H420R, pero no R77L.

Dado el análisis *in silico* descrito anteriormente, se planteó la hipótesis de que la tirosinasa H420R pero no R77L puede unirse eficazmente a tirosina, y que la tirosina del entorno elevada podría actuar como chaperona molecular y estabilizar selectivamente la proteína del Himalaya. Con el fin de someter a prueba esta hipótesis, se expresaron proteínas tirosinasa silvestre, mutante R77L o H420R en células de ovario de hámster chino (CHO), y se midió la estabilidad de la proteína tirosinasa usando cicloheximida para inhibir la síntesis de proteína nueva. Se observaron niveles similares de expresión de proteína silvestre y mutante en inmunotransferencias de tipo Western de lisados de proteínas de células en el nivel inicial (figura 5). Tal como se predijo, tirosina 1 mM mejoró la estabilidad de la proteína mutante H420R (figura 6) en puntos de tiempo posteriores (9 y 24 horas) con respecto a una proteína marcadora, GAPDH. Aunque había una tendencia hacia la estabilización del mutante R77L con tirosina 1 mM, no era estadísticamente significativa (figura 7). Estos resultados concuerdan con las observaciones *in vivo* de que la elevación farmacológica de tirosina en plasma aumenta la pigmentación en el modelo del Himalaya de OCA-1B, pero no en el modelo de $Tyr^{c-2J/c-2J}$ de OCA-1A.

EJEMPLO 8

- 25 En este ejemplo, concentraciones de tirosina elevadas dieron como resultado producción de pigmento en melanocitos que expresan los alelos de *Tyr* OCA-1B, pero no OCA-1A, *in vitro*.

También se investigó la capacidad de las proteínas mutantes R77L y H420R para producir pigmento *in vitro*, en comparación con la proteína silvestre, en melanocitos de ratón albino (células Melan-c, D.C. Bennett *et al.*, Development 105:379 (1989)). Como reflejo de los resultados *in vivo*, la tirosina 1 mM aumentó la actividad enzimática con respecto al nivel inicial en células Melan-c que expresan la tirosinasa mutante H420R ($p=0,03$), pero no tirosinasa mutante R77L (figura 8A).

Además, se estudió la respuesta de melanocitos humanos cultivados a partir de la piel de pacientes con OCA-1A y OCA-1B. De manera similar a los resultados con células Melan-c de ratón transfectadas, los melanocitos silvestres producen melanina significativa en presencia de tirosina 1 mM (figuras 8B, 8C). Los melanocitos de un paciente con OCA-1A no produjeron pigmento detectable ni en presencia ni en ausencia de tirosina 1 mM. Los melanocitos de un paciente con OCA-1B mostraron cantidades de nivel inicial de pigmento similares a controles sin tratar. Sin embargo, el tratamiento con tirosina 1 mM aumentó significativamente la pigmentación ($p=0,0025$), aunque no hasta el nivel observado en melanocitos silvestres. Estos resultados *in vitro* sugieren que la elevación de tirosina en circulación puede aumentar la pigmentación en seres humanos con actividad tirosinasa residual, lo que implica que el efecto observado en ratones del Himalaya puede generalizarse a otros alelos hipomórficos de *TYR/Tyr*, y apoya la idea de que la administración de una cantidad eficaz de NTBC a seres humanos puede proporcionar al menos un aumento temporal en la pigmentación de la piel para usos cosméticos.

Debe interpretarse que el uso de los términos “un” y “una” y “el/la/los/las” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, significan “que incluye, pero sin limitarse a”), a menos que se indique lo contrario. La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende servir simplemente como método de referirse de manera abreviada individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente de otra manera por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento, pretende simplemente iluminar mejor la invención y no supone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario.

55

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende (a) 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona (NTBC) o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (b) un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable, para su uso en el tratamiento de visión deteriorada en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo o albinismo ocular.
2. Composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en la que el uso da como resultado un aumento de las concentraciones plasmáticas de tirosina de desde aproximadamente 7 micromolar (μM) hasta aproximadamente 2 milimolar (mM), preferiblemente desde aproximadamente 50 μM hasta aproximadamente 300 μM , y más preferiblemente de aproximadamente 70 μM en el sujeto.
3. Composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1 ó 2, que comprende el uso de NTBC en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.
4. Composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la composición es para su uso en el tratamiento de albinismo oculocutáneo de tipo OCA1a, albinismo oculocutáneo de tipo OCA1b o albinismo ocular de tipo 1.
5. Composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el albinismo se debe a una mutación en el gen de la proteína P (OCA2) y/o el gen de la proteína relacionada con tirosinasa-1 (TYRP-1, OCA3) y/o el gen de la proteína tau asociada a microtubulina (MATP, OCA4).
6. Uso de una composición que comprende (a) 2-(2-nitro-4-trifluorometilbenzoil)-1,3-ciclohexanodiona (NTBC) o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (b) un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable, para aumentar la pigmentación discernible visualmente en los ojos, el pelo o la piel para fines cosméticos.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el uso da como resultado un aumento de las concentraciones plasmáticas de tirosina de desde aproximadamente 7 micromolar (μM) hasta aproximadamente 2 milimolar (mM), preferiblemente desde aproximadamente 50 μM hasta aproximadamente 300 μM , y más preferiblemente de aproximadamente 70 μM en el sujeto.
8. Uso según las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende el uso de NTBC en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.
9. Uso de (a) NTBC o una sal, un hidrato o un solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, y (b) un portador farmacéutica y fisiológicamente aceptable en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de visión deteriorada en un sujeto que padece albinismo oculocutáneo o albinismo ocular.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el uso da como resultado un aumento en concentraciones plasmáticas de tirosina de desde aproximadamente 7 μM hasta aproximadamente 2 mM, preferiblemente desde aproximadamente 50 μM hasta aproximadamente 300 μM , y más preferiblemente de aproximadamente 70 μM en el sujeto.
11. Uso según la reivindicación 9 ó 10, en el que la composición farmacéutica comprende NTBC en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 mg/kg/día y aproximadamente 10 mg/kg/día, preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg/día a aproximadamente 4 mg/kg/día, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 2 mg/kg/día, y lo más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg/día.
12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el albinismo oculocutáneo es albinismo oculocutáneo de tipo OCA1a.
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el albinismo oculocutáneo es albinismo oculocutáneo de tipo OCA1b.
14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el albinismo oculocutáneo es albinismo ocular de tipo 1.
15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el albinismo se debe a una mutación en el gen de la proteína P (OCA2) y/o el gen de la proteína relacionada con tirosinasa-1 (TYRP-1, OCA3) y/o el gen de la proteína tau asociada a microtubulina (MATP, OCA4).

FIGURA 1

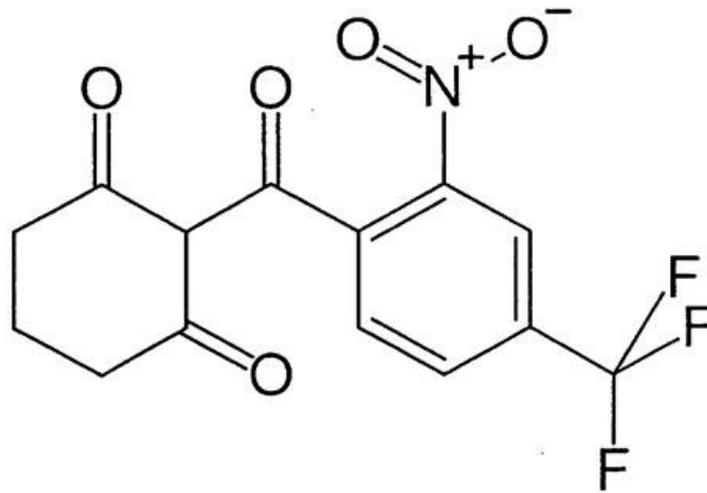


FIGURA 2

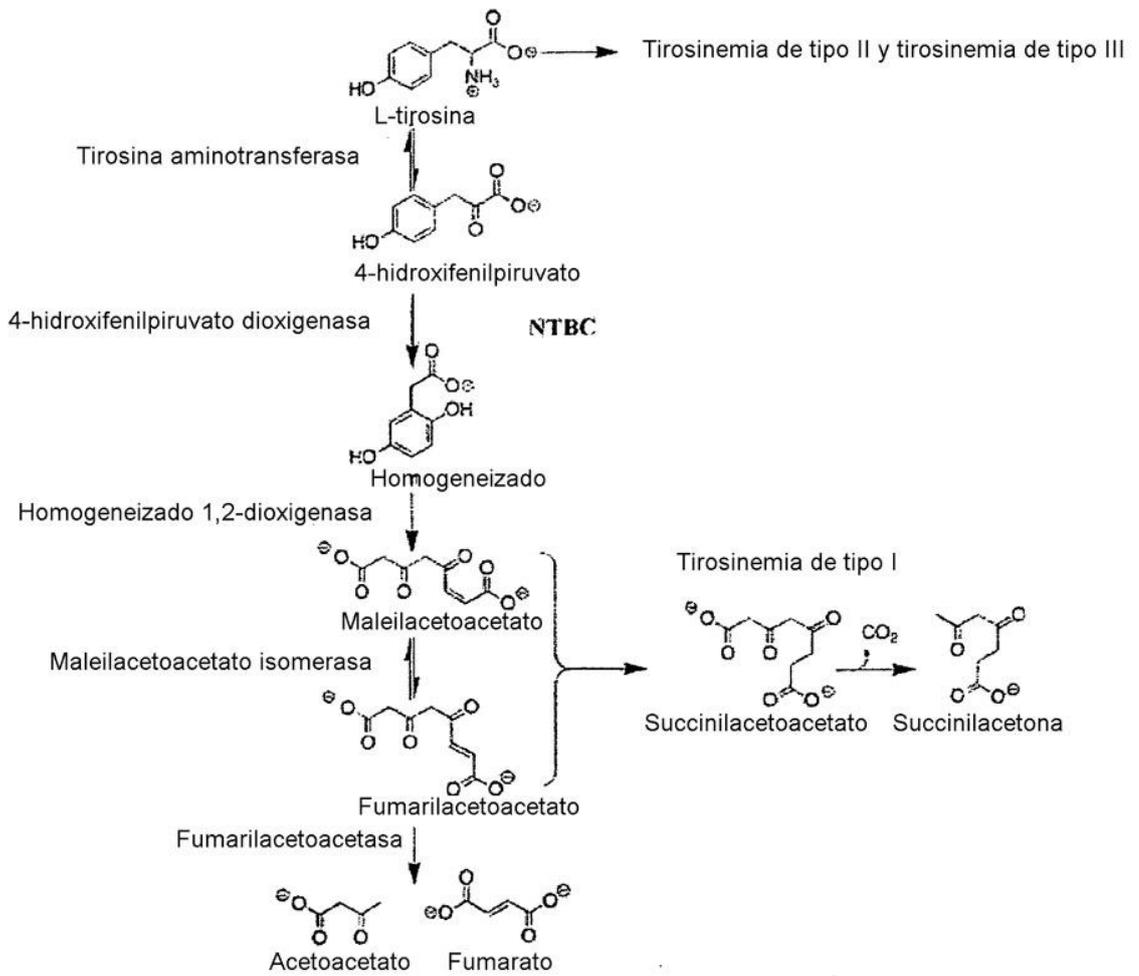
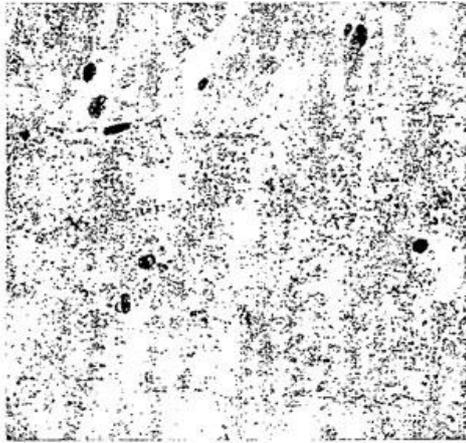


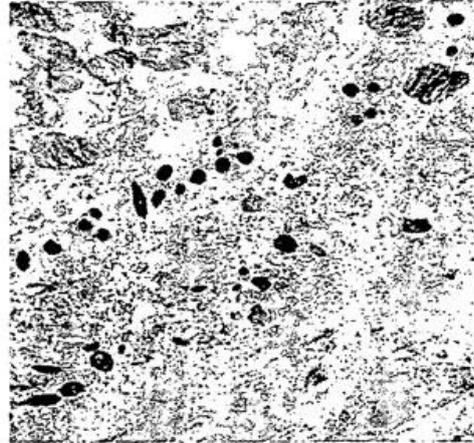
FIGURA 3

Tratamiento de albinismo con NTBC

Tyr^{c-h/c-h}



Sin tratar



Tratado

FIGURA 4

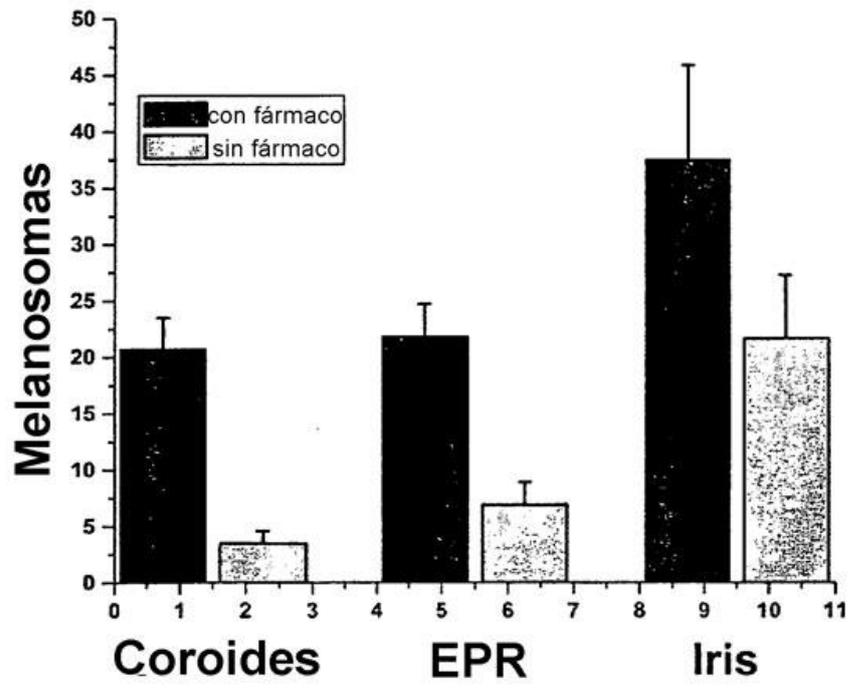


FIGURA 5

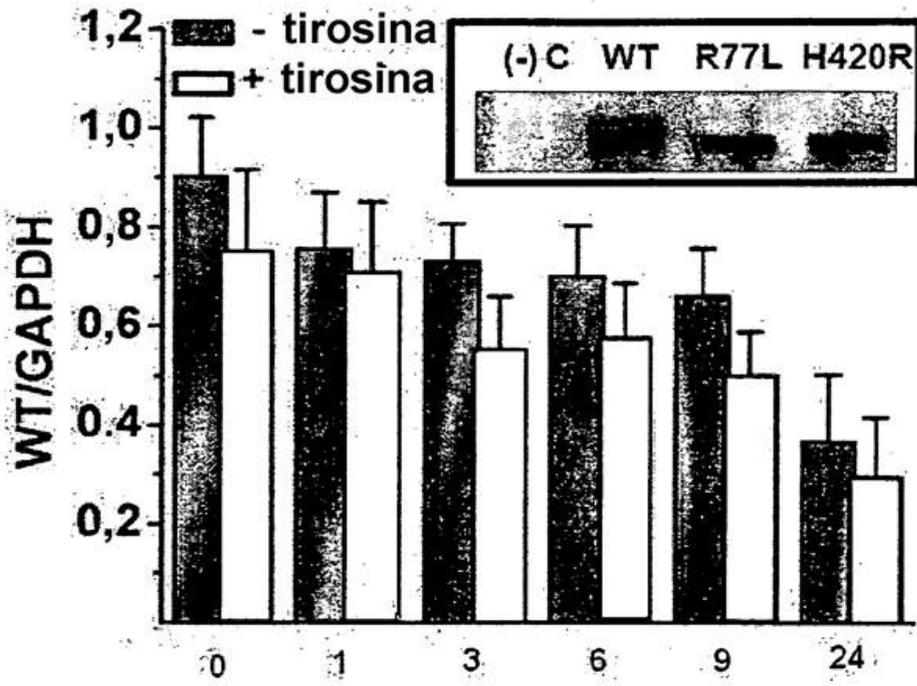


FIGURA 6

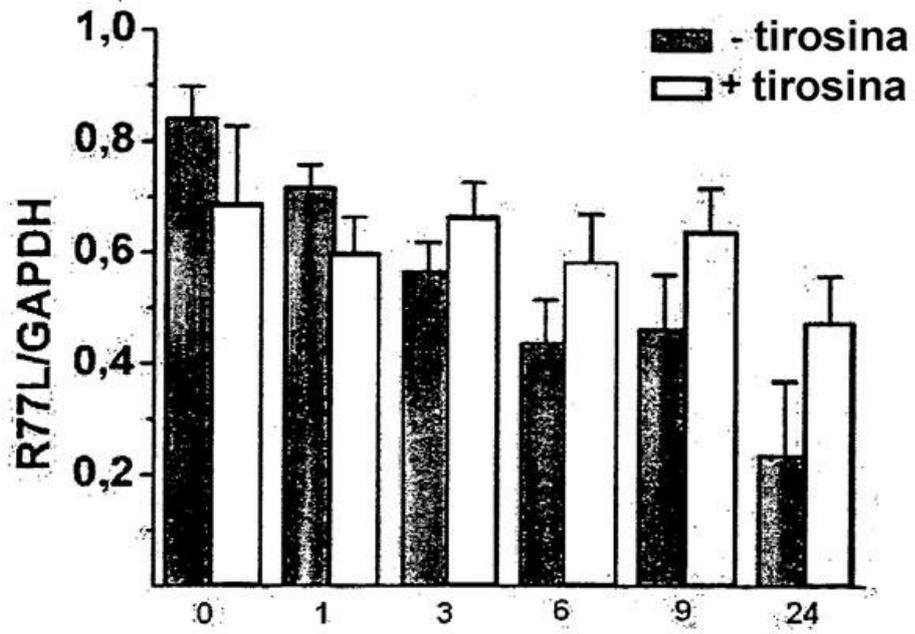


FIGURA 7

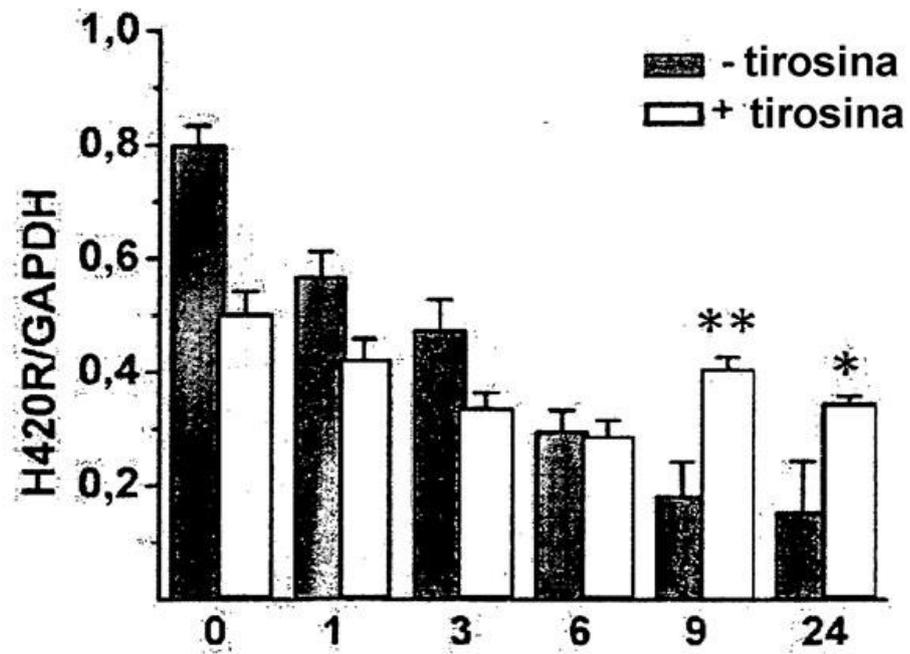


FIGURA 8

