

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 498**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2007 E 14168748 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016 EP 2787345**

54 Título: **Opciones de tratamiento para la enfermedad de Fabry**

30 Prioridad:

16.05.2006 US 801089 P

23.10.2006 US 853631 P

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

08.06.2016

73 Titular/es:

AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

1 Cedar Brook Drive

Cranbury, NJ 08512, US

72 Inventor/es:

LOCKHART, DAVID y

CASTELLI, JEFF

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 573 498 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

Opciones de tratamiento para la enfermedad de Fabry

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry que comprende 1-desoxigalactonojirimicina.

ANTECEDENTES

10 La enfermedad de Fabry es un trastorno del almacenamiento lisosómico de glucoesfingolípidos (GSL) que resulta de una deficiencia heredada relacionada con el cromosoma X de α -galactosidasa A (α -GAL) lisosómica, una enzima responsable de la hidrólisis de restos α -galactosílicos terminales de glucoesfingolípidos (Brady et al. N Engl J Med. 1967; 276: 1163-7). Una deficiencia en la actividad enzimática da como resultado una deposición progresiva de glucoesfingolípidos neutros, predominantemente globotriaosilceramida (trihexósido de ceramida, CTH, GL-3), en la célula de pacientes con Fabry. Los síntomas pueden ser graves y debilitantes, incluyendo insuficiencia renal y mayor riesgo de ataque cardíaco y apoplejía. Algunas de las mutaciones provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de α -GAL que pueden dar como resultado la producción de α -GAL con estabilidad reducida que no se pliega en su conformación tridimensional correcta. Aunque α -GAL producida en células de pacientes retiene a menudo el potencial para cierto nivel de actividad biológica, los mecanismos de control de calidad de las células reconocen y retienen α -GAL no plegada en el retículo endoplásmico, o ER, hasta que finalmente se mueve a otra parte de la célula para degradación y eliminación. Consecuentemente, se mueve poca o ninguna α -GAL al lisosoma, donde normalmente hidroliza GL-3. Esto conduce a la acumulación de GL-3 en las células, lo que se cree que es la causa de los síntomas de la enfermedad de Fabry. Además, la acumulación de la enzima α -GAL no plegada en el ER puede conducir a estrés en las células y a respuestas de tipo inflamatorio, lo que puede contribuir a la disfunción celular y a la enfermedad.

15 La enfermedad de Fabry se clasifica por manifestaciones clínicas en tres grupos: una forma clásica con vasculopatía generalizada, una forma variante atípica con manifestaciones clínicas limitadas al tejido cardíaco, y enfermedad de comienzo tardío, que incluye portadoras femeninas con formas leves a graves de la enfermedad.

20 La frecuencia de la forma clásica de la enfermedad se estima que es alrededor de 1:40.000 a 1:60.000 en hombres, y se da por todo el mundo en diferentes grupos étnicos. Los hombres afectados clásicamente tienen pocos o ningún nivel de α -GAL detectable, y son los afectados más gravemente. Las manifestaciones clínicas incluyen angioqueratoma (manchas rojizas-violetas sobresalientes pequeñas en la piel), acroparestesias (quemadura en las manos y en los pies), hipohidrosis (capacidad reducida para sudar), y opacidades córneas y lenticulares características (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8ª Edición 2001, Scriver et al., ed., p. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York). El almacenamiento de lípidos puede conducir a una circulación arterial alterada y a un mayor riesgo de ataque cardíaco o apoplejía. El corazón se puede agrandar también, y los riñones se ven implicados progresivamente. Otros síntomas incluyen fiebre y dificultades gastrointestinales, particularmente después de comer. La expectativa de vida de los hombres afectados se reduce, y la muerte se produce habitualmente en la cuarta o quinta década como resultado de enfermedad vascular del corazón, cerebro, y/o riñones.

30 Los individuos con la enfermedad de Fabry de comienzo tardío pueden ser hombres o mujeres. La enfermedad de Fabry de comienzo tardío se presenta como la forma variante atípica, y cada vez más pruebas indican que puede haber un número significativo de "variantes atípicas" que no tienen explicación en el mundo. Las mujeres, que heredan un cromosoma X que contiene una mutación de α -GAL, pueden mostrar síntomas más tarde en la vida, aumentando significativamente la prevalencia de esta enfermedad. Estos pacientes experimentan típicamente primero síntomas de la enfermedad en la etapa adulta, y a menudo tienen síntomas de la enfermedad enfocados en un solo órgano. Por ejemplo, muchos hombres y mujeres con enfermedad de Fabry de comienzo tardío tienen un agrandamiento del ventrículo izquierdo del corazón. La enfermedad de Fabry de comienzo tardío también se puede presentar en forma de apoplejías de causa desconocida. A medida que los pacientes avanzan en edad, progresan las complicaciones cardíacas de la enfermedad, y pueden conducir a la muerte.

35 Por el contrario, los pacientes con la "variante cardíaca" más leve de la enfermedad de Fabry tienen normalmente 5-15% de actividad de α -GAL normal, y presentan hipertrofia ventricular izquierda o una cardiomiopatía. Estos pacientes con variante cardíaca permanecen esencialmente asintomáticos cuando sus contrapartes clásicamente afectadas se ven gravemente comprometidas. Las variantes cardíacas se encontraron en 11% de los pacientes masculinos adultos con cardiomiopatía hipertrófica ventricular izquierda sin explicación, sugiriendo que la enfermedad de Fabry puede ser más frecuente que lo previamente estimado (Nakao et al., N. Engl. J. Med. 1995; 333; 288-293).

50 El gen de α -GAL se ha cartografiado para Xq22 (Bishop et al., Am. J. Hum. Genet. 1985; 37: A144), y se han dado a conocer el ADNc de longitud completa y las secuencias genómicas de 12 kb completas que codifican α -GAL (Calhoun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985; 82: 7364-7368; Bishop et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986; 83:

4859-4863; Tsuji et al., Eur. J. Biochem. 1987; 165: 275-280; Y Kornreich et al., Nucleic Acids Res. 1989; 17: 3301-3302). Hay una marcada heterogeneidad genética de las mutaciones que provocan la enfermedad de Fabry (The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8ª Edición 2001, Scriver et al., ed., p. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York; Eng et al., Am. J. Hum. Genet. 1993; 53: 1186-1197; Eng et al., Mol. Med. 1997; 3: 174-182; y Davies et al., Eur. J. Hum. Gene. 1996; 4: 219-224). Hasta la fecha, se han dado a conocer una variedad de mutaciones de pérdida de sentido, sin sentido, y de ajuste, además de pequeñas supresiones e inserciones, y reordenamientos génicos más grandes, aunque la mayoría de las mutaciones son mutaciones con falta de sentido.

La enfermedad de Fabry es heterogénea, y a menudo es difícil de correlacionar genotipo con fenotipo. Las personas con el mismo genotipo muestran a menudo diferentes síntomas clínicos y patología de la enfermedad. Sin embargo, parece que hay una correlación entre la actividad enzimática residual y la gravedad de la enfermedad, dando la menor actividad de α -GAL como resultado la mayor gravedad de la enfermedad. Aunque la inmensa mayoría de mutaciones de α -GAL son mutaciones de pérdida de sentido, estando la mayoría fuera del sitio catalítico, es difícil predecir qué mutaciones dan como resultado una enzima inestable que se podría "rescatar" por una chaperona farmacológica específica (SPC) que estabiliza la enzima, y cuáles no se podrían estabilizar usando una SPC.

Diagnóstico de la enfermedad de Fabry

Debido a que la enfermedad de Fabry es rara, implica múltiples órganos, tiene un intervalo de comienzo de muchas edades, y es heterogénea, el diagnóstico apropiado es un reto. El conocimiento es escaso entre los profesionales sanitarios, y a menudo son frecuentes los diagnósticos erróneos. Algunos ejemplos de diagnósticos seriamente considerados en pacientes a los que se les diagnosticó eventualmente con la enfermedad de Fabry incluyen: prolapso de la válvula mitral, glomerulonefritis, proteinuria idiopática, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Whipple, abdomen agudo, colitis ulcerosa, porfirias intermitentes agudas, y neoplasias ocultas. De este modo, incluso para hombres afectados de forma clásica, el diagnóstico tarda típicamente de alrededor de 5-7 años o incluso más. Esto es un problema debido a que cuanto más tiempo tiene la persona la enfermedad de Fabry, más probable es que se produzca mayor daño en los órganos y tejidos afectados, y más grave se hace el estado de la persona. El diagnóstico de la enfermedad de Fabry se conforma muy a menudo en base a la actividad reducida de α -GAL en leucocitos plasmáticos o periféricos (WBCs) una vez que el paciente está sintomático, acoplado con análisis mutacional. En las mujeres, el diagnóstico es incluso más desafiante, puesto que la identificación enzimática de mujeres portadoras es menos fiable debido a la inactivación del cromosoma X al azar en algunas células de las portadoras. Por ejemplo, algunos portadores estrictos (hijas de hombres afectados clásicamente) tienen actividades de la enzima α -GAL que oscilan desde actividades normales hasta actividades muy bajas. Puesto que los portadores pueden tener actividad normal de la enzima α -GAL en leucocitos, sólo la identificación de una mutación de α -GAL mediante ensayo genético proporciona la identificación y/o diagnóstico precisos del portador.

Tratamiento de la enfermedad de Fabry

La única terapia aprobada para tratar la enfermedad de Fabry es la terapia de sustitución enzimática, que implica típicamente la infusión intravenosa de una forma purificada de la proteína de tipo salvaje correspondiente (Fabrazyme®, Genzyme Corp.). Una de las complicaciones principales con la terapia de sustitución proteica es el logro y el mantenimiento de cantidades terapéuticamente eficaces de proteínas *in vivo* debido a la rápida degradación de la proteína infundida. El enfoque actual para superar este problema es llevar a cabo numerosas infusiones costosas de dosis elevadas.

La terapia de sustitución proteica tiene varias advertencias adicionales, tales como dificultades con la generación a gran escala, purificación y almacenamiento de proteína apropiadamente plegada; la obtención de proteína nativa glucosilada; la generación de una respuesta inmunitaria anti-proteínica; y la incapacidad de la proteína para atravesar la barrera hematoencefálica para mitigar patologías del sistema nervioso central (*es decir*, baja biodisponibilidad). Además, la enzima de sustitución no puede penetrar el corazón o el riñón en cantidades suficientes para reducir la acumulación de sustrato en podocitos renales o miocitos cardíacos, que aparecen predominantemente en la patología de Fabry.

La terapia génica que usa vectores recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína funcional, o que usa células humanas genéticamente modificadas que expresan una proteína funcional, también está siendo evaluada para tratar deficiencias de proteínas y otros trastornos que se benefician de la sustitución de proteínas. Aunque prometedor, este enfoque también está limitado por dificultades técnicas tales como la incapacidad de los vectores para infectar o transducir células en división, la baja expresión del gen diana, y la regulación de la expresión una vez que se suministra el gen.

Un tercer enfoque relativamente reciente para tratar algunas deficiencias enzimáticas implica el uso de inhibidores de tipo pequeñas moléculas para reducir la producción del sustrato natural de proteínas enzimáticas deficientes, mejorando de ese modo la patología. Este enfoque de "reducción del sustrato" se ha descrito específicamente para una clase de alrededor de 40 trastornos enzimáticos relacionados denominados trastornos de almacenamiento lisosómico, que incluyen trastornos de almacenamiento de glucoesfingolípidos. Los inhibidores de tipo pequeñas moléculas propuestos para uso como terapia son específicos para inhibir las enzimas implicadas en la síntesis de glucolípidos, reduciendo la cantidad de glucolípido celular que es necesario romper por la enzima deficiente. Este

enfoque también está limitado por cuanto los glucolípidos son necesarios para la función biológica, especialmente la función neurológica, y la falta excesiva puede provocar efectos adversos.

Se ha mostrado previamente que la unión de inhibidores de tipo pequeñas moléculas de enzimas asociadas con LSDs puede incrementar la estabilidad tanto de la enzima mutante como de la enzima de tipo salvaje correspondiente (véanse las patentes U.S. n^{os} 6.274.597; 6.583.158; 6.589.964; 6.599.919; 6.916.829, y 7.141.582). En particular, se descubrió que la administración de derivados de tipo pequeñas moléculas de glucosa y galactosa, que son inhibidores competitivos específicos y selectivos para varias enzimas lisosómicas diana, incrementó eficazmente la estabilidad de las enzimas en células *in vitro*, y, de este modo, incrementó el tráfico de las enzimas al lisosoma. De este modo, al aumentar la cantidad de enzima en el lisosoma, se espera que aumente la hidrólisis de los sustratos enzimáticos. La teoría original detrás de esta estrategia fue la siguiente: puesto que la proteína enzimática mutante es inestable en el ER (Ishii et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retrasa en la ruta de transporte normal (ER → aparato de Golgi → endosomas → lisosoma) y se degrada prematuramente. Por lo tanto, un compuesto que se una a e incremente la estabilidad de una enzima mutante puede servir como una "chaperona" para la enzima, y puede incrementar la cantidad que puede salir del ER y que se puede mover a los lisosomas. Además, debido a que el plegamiento y el tráfico de algunas proteínas de tipo salvaje es incompleto, degradándose hasta 70% de algunas proteínas de tipo salvaje en algunos casos antes de alcanzar su localización celular final, las chaperonas se pueden usar para estabilizar enzimas de tipo salvaje e incrementar la cantidad de enzima que puede salir del ER y se puede mover a los lisosomas. Se ha mostrado que esta estrategia incrementa varias enzimas lisosómicas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo β -glucocerebrosidasa y α -glucosidasa, cuyas deficiencias están asociadas, respectivamente, con la enfermedad de Gaucher y de Pompe.

Sin embargo, como se indica anteriormente, los candidatos con éxito para la terapia SPC deben tener una mutación que dé como resultado la producción de una enzima que tiene el potencial para ser estabilizada y plegada en una conformación que permita su tráfico fuera del ER. Las mutaciones que truncan gravemente la enzima, tales como mutaciones sin sentido, o mutaciones en el dominio catalítico que evitan la unión de la chaperona, probablemente no serán "rescatables" o "potenciables" usando la terapia SPC. Aunque es más probable que las mutaciones con falta de sentido fuera del sitio catalítico sean rescatables usando SPCs, no hay ninguna garantía, necesitando el cribado para mutaciones receptivas. Esto significa que, incluso cuando se diagnostica la enfermedad de Fabry detectando actividad deficiente de α -GAL en WBCs, es muy difícil, si no imposible, predecir si un paciente con Fabry particular responderá al tratamiento con una SPC. Además, puesto que los WBCs sólo sobreviven durante un corto período de tiempo en cultivo (*in vitro*), el cribado para la potenciación de α -GAL mediante SPC es difícil.

A fin de aplicar eficazmente la terapia SPC, es necesario adoptar antes del inicio del tratamiento un método ampliamente aplicable, rápido y eficiente para cribar pacientes para determinar la sensibilidad a la terapia SPC. De este modo, existe en la técnica la necesidad de métodos relativamente no invasivos para evaluar rápidamente la potenciación enzimática con terapias potenciales antes de tomar decisiones de tratamiento, tanto para beneficios de coste como emocionales para el paciente.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, donde la formulación es una forma de dosificación oral que comprende un vehículo y 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales se administra a un paciente con la enfermedad de Fabry en una cantidad de 150 mg cada dos días.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Curso de tiempo para potenciación para A97V. Células T que poseen la mutación A97V en α -Gal A se cultivaron en ausencia (círculos en blanco) o en presencia (círculos oscuros) de 20 μ M de DGJ durante uno a cuatro días, y después se ensayaron en busca de la actividad de α -GAL. El cambio de medio después de 2 días y la sustitución por medio reciente con (triángulo blanco) o sin DGJ (triángulo oscuro) no tuvo ningún efecto sobre la actividad enzimática observada.

Figura 2A-C. Dependencia de DGJ con la concentración en células T de pacientes de control normales y pacientes con Fabry. Células T procedentes de individuos normales (2A) se incubaron durante 3 días con DGJ de 2 nM a 200 μ M, y después se ensayaron para determinar la actividad de α -GAL. Se muestran los resultados de tres experimentos en diferentes días. Células T procedentes de pacientes con Fabry con las mutaciones A97V (2B), R112H (2C), o R301Q (2C), respectivamente, se cultivaron con DGJ de 2 nM a 200 μ M, y después se ensayaron para determinar la actividad de α -GAL. Se muestran tres conjuntos independientes de experimentos de dosificación de DGJ, cada uno de los cuales se realizó con conjuntos triplicados.

Figura 3. Células T procedentes de diversos pacientes con Fabry se cultivaron en ausencia o en presencia de 20 μ M de DGJ durante tres días, y después se ensayaron para determinar la actividad de α -GAL. Se representó gráficamente el porcentaje del promedio normal de actividad específica de la α -GAL para mostrar el efecto del rescate con DGJ en los diferentes genotipos de pacientes con Fabry. El panel inferior muestra los resultados de la transferencia Western para cada mutación, sondada con anticuerpo de conejo policlonal específico para α -GAL.

Esto demuestra una mayor estabilidad proteica para las mutaciones potenciabiles A97V y R301Q, y ningún incremento en la cantidad de proteína para las mutaciones R356W, G132R y A143P.

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

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 La presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, donde la formulación es una forma de dosificación oral que comprende un vehículo y 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales se administra a un paciente con la enfermedad de Fabry en una cantidad de 150 mg cada dos días.

Convenientemente, la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales se administra durante al menos 12 semanas.

Definiciones

15 Los términos usados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados normales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se discuten más abajo o en cualquier otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al especialista a la hora de describir las composiciones y métodos de la invención y cómo obtenerlas y usarlas.

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

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

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

30 Un "paciente" se refiere a un sujeto que ha sido diagnosticado con una enfermedad particular. El paciente puede ser humano o animal. Un "paciente con enfermedad de Fabry" se refiere a un individuo que ha sido diagnosticado con la enfermedad de Fabry y tiene una α -GAL mutada como se define posteriormente más abajo. Los marcadores característicos de la enfermedad de Fabry pueden aparecer en hemocigotos masculinos y portadoras femeninas con la misma prevalencia, aunque las mujeres típicamente se ven afectadas de forma menos grave.

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

35 Como se usa aquí en una realización, la expresión " α -GAL mutada" incluye un α -GAL que tiene una mutación en el gen que codifica α -GAL, que da como resultado la incapacidad de la enzima para lograr una conformación estable en las condiciones normalmente presentes en el ER. El fracaso a la hora de lograr una conformación estable da como resultado que se degrada una cantidad sustancial de la enzima, en lugar de ser transportada al lisosoma. Tal mutación se denomina algunas veces un "mutante conformacional".

40 Las mutaciones de α -GAL ejemplares no limitantes, asociadas con la enfermedad de Fabry, que dan como resultado α -GAL inestable, incluyen L32P; N34S; T41I; M51K; E59K; E66Q; I91T; A97V; R100K; R112C; R112H; F113L; T141L; A143T; G144V; S148N; A156V; L166V; D170V; C172Y; G183D; P205T; Y207C; Y207S; N215S; A228P; S235C; D244N; P259R; N263S; N264A; G272S; S276G; Q279E; Q279K; Q279H; M284T; W287C; I289F; M296I; M296V; L300P; R301Q; V316E; N320Y; G325D; G328A; R342Q; E358A; E358K; R363C; R363H; G3705; y P409A.

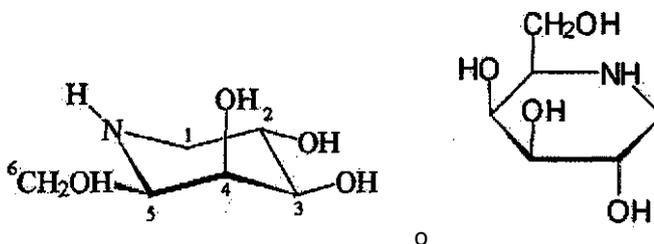
45 Como se usa aquí, la expresión "chaperona farmacológica específica" ("SPC") o "chaperona farmacológica" se refiere a cualquier molécula, incluyendo una pequeña molécula, proteína, péptido, ácido nucleico, hidrato de carbono, etc., que se une específicamente a una proteína y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) potenciar la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) incluye el tráfico de la proteína desde el ER hacia otra localización celular, preferiblemente una localización celular nativa, es decir, evita la degradación de la proteína asociada al ER; (iii) evita la agregación de proteínas plegadas erróneamente; y/o (iv) restaura o potencia al menos parcialmente la función de tipo salvaje y/o actividad de la proteína. Un compuesto que se une específicamente a, *por ejemplo*, α -GAL, significa que se une a y ejerce un efecto de chaperona sobre α -GAL y no un grupo genérico de enzimas relacionadas o no relacionadas. Más específicamente, esta expresión no se refiere a

chaperonas endógenas, tales como BiP, o a agentes no específicos que tienen actividad de chaperona no específica demostrada frente a diversas proteínas, tales como glicerol, DMSO o agua deuterada, es *decir*, chaperonas químicas (véanse Welch et al., Cell Stress and Chaperones 1996; 1(2):109-115; Welch et al., Journal of Bioenergetics and Biomembranes 1997; 29(5):491-502; patente U.S. nº 5.900.360; patente U.S. nº 6.270.954; y patente U.S. nº 6.541.195). En la presente invención, la SPC puede ser un inhibidor competitivo reversible.

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

A continuación se da una descripción de algunas chaperonas farmacológicas específicas contempladas por esta invención:

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



Este término incluye tanto la base libre como cualesquiera formas salinas. La sal de hidrocloreto de DGJ es conocida como hidrocloreto de migalastat (Migalastat).

Todavía otras SPCs para α -GAL se describen en las patentes U.S. 6.274.597, 6.774.135, y 6.599.919 de Fan et al., e incluyen α -3,4-di-epi-homonojirimicina, 4-epi-fagomina, y α -alo-homonojirimicina, N-metil-desoxigalactonojirimicina, β -1-C-butir-desoxigalactonojirimicina, y α -galacto-homonojirimicina, calistegina A₃, calistegina B₂, calistegina B₃, N-metil-calistegina A₃, N-metil-calistegina B₂ y N-metil-calistegina B₃.

Como se usa aquí, la expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con una proteína tal como α -GAL, específicamente una interacción con restos de aminoácidos de la proteína que participa directamente en la puesta en contacto con la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína diana, *por ejemplo*, α -GTAL, para ejercer un efecto de chaperona sobre α -GAL y no un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los restos de aminoácidos de una proteína que interaccionan con una chaperona farmacológica dada pueden estar o no dentro del "sitio activo" de la proteína. La unión específica se puede evaluar mediante ensayos de unión habituales o mediante estudios estructurales, *por ejemplo*, co-cristalización, RMN, y similares. El sitio activo para α -GAL es el sitio de unión del sustrato.

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

Como se usa aquí, las expresiones "potenciar la actividad de α -GAL" o "incrementar la actividad de α -GAL" se refieren a incrementar la cantidad de α -GAL que adopta una conformación estable en una célula que se pone en contacto con una chaperona farmacológica específica para la α -GAL, con respecto a la cantidad en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, *por ejemplo*, en una etapa más temprana) que no se pone en contacto con la chaperona farmacológica específica para la α -GAL. Esta expresión también se refiere a incrementar el tráfico de α -GAL hacia el lisosoma en una célula que se pone en contacto con una chaperona farmacológica específica para la α -GAL, con respecto al tráfico de α -GAL que no se pone en contacto con la chaperona farmacológica específica para la proteína. Estas expresiones se refieren tanto a α -GAL de tipo salvaje como mutante. En una realización, el incremento en la cantidad de α -GAL en la célula se mide midiendo la hidrólisis de un sustrato artificial en lisados procedentes de células que han sido tratadas con la SPC. Un incremento en la hidrólisis es indicativo de una mayor actividad de α -GAL.

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

Un “respondedor” es un individuo (diagnosticado con o que se sospecha que tiene la enfermedad de Fabry) cuyas células muestran una actividad de α -GAL suficientemente incrementada, y/o mejoría de los síntomas o mejora en marcadores sustitutos, en respuesta al contacto con una SPC. Los ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores sustitutos para la enfermedad de Fabry incluyen incrementos en los niveles o actividad de α -GAL en células (*por ejemplo*, fibroblastos) y tejido; reducciones en la acumulación de GL-3; menores concentraciones plasmáticas de homocisteína y molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1); menor acumulación de GL-3 en las células del miocardio y fibrocitos valvulares; reducción en la hipertrofia cardíaca (especialmente del ventrículo izquierdo), mejora de la insuficiencia valvular y arritmias; mejora de la proteinuria; menores concentraciones urinarias de lípidos tales como CTH, lactosilceramida, ceramida, y mayores concentraciones urinarias de glucosilceramida y esfingomielina (Fuller et al., *Clinical Chemistry*, 2005; 51: 688-694); la ausencia de cuerpos de inclusión laminados (cuerpos de Zebra) en células epiteliales glomerulares; mejoras en la función renal; mitigación de la hipohidrosis; ausencia de angioqueratomas; y mejoras de anomalías de la audición tales como pérdida de audición sensorineural de alta frecuencia, pérdida de audición progresiva, sordera repentina, o acúfenos. Las mejoras en síntomas neurológicos incluyen prevención de ataque isquémico transitorio (TIA) o apoplejía; y mejora de dolor neuropático que se manifiesta por sí mismo como acroparestesia (escozor u hormigueo en las extremidades).

La dosis que logra una o más de las respuestas mencionadas anteriormente es una “dosis terapéuticamente eficaz”.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente reacciones inapropiadas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa aquí, la expresión “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia normativa del gobierno federal o del gobierno estatal, o enunciado en la Farmacopea de los Estados Unidos de América u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra el compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites. El agua o la disolución acuosa, disoluciones salinas o disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferiblemente como vehículos, particularmente para disoluciones inyectables. Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” por E.W. Martin, 18ª Edición, u otras ediciones.

Como se usa aquí, el término “aislado” significa que el material citado se elimina del entorno en el que se encuentra normalmente. De este modo, un material biológico aislado puede estar libre de componentes celulares, *es decir*, componentes de las células en las cuales se encuentra o se produce el material. En el caso de moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, una banda de ARNm en un gel, un ADNc, o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se escinde preferiblemente del cromosoma en el que se puede encontrar, y más preferiblemente ya no está unido a regiones no reguladoras, no codificantes, o a otros genes, situados en dirección 5' o en dirección 3' del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En todavía otra realización, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Los ácidos nucleicos aislados incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, y similares. De este modo, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada se puede asociar con otras proteínas o ácidos nucleicos, o con ambos, con los que se asocia la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se retira del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede estar, aunque no es necesario, purificado.

Las expresiones “alrededor de” y “aproximadamente” significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida, dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Los grados ejemplares típicos de error están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor o intervalo de valores dado. Como alternativa, y particularmente en sistemas biológicos, las expresiones “alrededor de” y “aproximadamente” pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 10 ó 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas dadas aquí son aproximadas excepto que se establezca de otro modo, queriendo decir que la expresión “alrededor de” o “aproximadamente” se puede inferir cuando no se señale expresamente.

Método

Para determinar fácilmente si la terapia con SPC será un tratamiento viable para pacientes con Fabry, incluyendo portadoras femeninas, se desarrolló un ensayo de rescate con DGJ simple, no invasivo, de la actividad de α en WBCs, o subconjuntos de WBCs, procedentes de pacientes con Fabry.

I. Ensayo in vitro

El método de diagnóstico implica purificar células T y establecer cultivos de células T a partir de especímenes de sangre procedentes de pacientes con Fabry (o pacientes que se sospecha que tienen la enfermedad de Fabry). Los cultivos de células T se tratan entonces con o sin una SPC, *por ejemplo* DGJ, durante un período de tiempo suficiente para demostrar la potenciación (*es decir*, incremento) de la actividad de α -GAL. Las células T se lisan entonces, y el lisado se usa en un ensayo para determinar la actividad enzimática. Un incremento suficiente en la actividad de α -GAL en los lisados procedentes de células tratadas con la SPC con respecto a la actividad en los

lisados procedentes de células no tratadas indica que el paciente probablemente responderá a la terapia con SPC (es decir, el paciente será un “respondedor”).

Este método se puede llevar a cabo según lo siguiente.

Separación de glóbulos blancos

5 Los WBCs se preparan usando técnicas estándar, *por ejemplo* recolección, centrifugación, separación, y lavado. Más específicamente, se pueden preparar según las siguientes etapas:

1. Se extrae una muestra de sangre de un paciente con Fabry. En realizaciones específicas, se extraen aproximadamente 8 a 10 ml en un recipiente apropiado, tal como un tubo CPT de Becton-Dickenson (que contiene un anticoagulante y un medio de separación).

10 2. La muestra de sangre se centrifuga para separar glóbulos rojos de glóbulos blancos y plasma. Típicamente, esta etapa se puede realizar a temperatura ambiente (18-25°C) a alrededor de 1800 x g con una centrifugadora de mesa durante alrededor de 20-30 minutos, o hasta que los glóbulos rojos se separan del plasma y de los glóbulos blancos (WBCs). Sin embargo, también se pueden usar otras técnicas conocidas de separación de glóbulos blancos, *por ejemplo* Ficoll-Hypaque, Percoll u otros gradientes de densidad similares. En una realización alternativa, las células T se enriquecen de WBCs usando separación magnética o mediada por anticuerpos usando selección negativa para eliminar otros tipos celulares a fin de obtener células T no unidas. Se puede usar cualquier técnica conocida para enriquecer células T, aunque se prefieren los métodos menos caros y más oportunos.

15 3. Se descarta la mitad de la capa plasmática (sin perturbar la capa de glóbulos blancos), y el fluido que queda, que contiene los glóbulos blancos, se transfiere a un tubo de centrifugadora.

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

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

Cultivos de células T

30 Los cultivos de células T se establecen estimulando las células T presentes en la preparación de WBC, *por ejemplo*, según el siguiente procedimiento.

35 1. Las células lavadas procedentes de lo anterior se resuspenden en un medio de cultivo celular apropiado, tal como RPMI suplementado con citocinas y/o mitógenos estimulantes de células T. Las citocinas estimulantes sugeridas incluyen IL-2, IL-12, IL-15, fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (con A), y mitógeno de fitolaca. En una realización particular, los WBCs se resuspenden en un volumen apropiado de medio RPMI 1640 suplementado con FBS, IL-2 y una concentración estimulante de PHA. Entonces se pueden transferir a una vasija de cultivo apropiada, y se incuban durante un tiempo suficiente para la expansión, *por ejemplo* alrededor de 2-3 días.

2. Después de que las células T se expanden, se pueden congelar, *por ejemplo* a alrededor de 3×10^6 células/vial usando medio RPMI 1640 suplementado para criopreservación, *por ejemplo* que contiene FCS y DMSO. Esto es suficiente para congelar 5 ml de cultivo a 5×10^5 células viables/ml.

40 Se ha de señalar que un experto normal en la técnica será capaz de averiguar las cantidades apropiadas de citocinas o mitógenos estimulantes de células T, aunque típicamente tales agentes se añaden en cantidades de entre alrededor de 1 ng/ml y alrededor de 25 ng/ml (o alrededor de 100 U/ml) para citocinas. Para los mitógenos, las concentraciones oscilan de alrededor de 10 ng/ml a alrededor de 10 µg/ml, estando las más eficaces para mitógenos en el intervalo bajo de µg/ml.

45 Ensayo de actividad/potenciación enzimática

50 Típicamente, las células T aisladas anteriormente (*por ejemplo*, aproximadamente $2,5 \times 10^6$) se hacen crecer en medio de cultivo (precedido de la descongelación, si están congeladas) en una vasija de cultivo apropiada en ausencia o presencia de la SPC, *por ejemplo* DGJ, durante un tiempo suficiente para evaluar el cambio en la actividad de α-GAL, *por ejemplo* 2 ó 3 días. Las dosis de DGJ que se espera que potencien α-GAL están en el intervalo de alrededor de 2 nM a alrededor de 150 µM, preferiblemente alrededor de 1 µM a 100 µM, y más preferiblemente alrededor de 5 µM a 50 µM. En una realización específica, DGJ se añade a alrededor de 20 µM. Las células se pueden cosechar mediante centrifugación, y se lavan dos veces con PBS. Los peletes se pueden almacenar congelados a -80°C hasta que se evalúan para determinar la actividad enzimática.

Las células se lisan entonces mediante adición de tampón de lisis (o agua desionizada) y la disgregación física (pipeteo, sometiendo a vórtice y/o agitación, y/o sometiendo a ultrasonidos) a temperatura ambiente o en hielo, seguido de la reunión de los lisados en hielo, y separando después el lisado reunido en pequeñas alícuotas y congelando.

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

Diversas modificaciones de este ensayo serán fácilmente averiguables para aquel de pericia normal en la técnica. Los ejemplos de sustratos artificiales que se pueden usar para detectar la actividad de α -GAL incluyen, pero no se limitan a, p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido y 4-MU GAL. Obviamente, sólo son adecuados para uso los sustratos
20 que se pueden escindir mediante α -GAL humana. Se observa que aunque se prefiere el uso de un sustrato fluorógeno, se contemplan otros métodos de determinación de la actividad de α -GAL para uso en el método, incluyendo sustratos cromógenos y técnicas de inmunocuantificación.

Diagnóstico y pronóstico. El ensayo de células T se puede modificar fácilmente para uso como un ensayo de diagnóstico para diagnosticar la enfermedad de Fabry eliminando simplemente la etapa de cultivo de las células T en presencia de DGJ antes de llevar a cabo los ensayos de potenciación. La actividad de α -GAL en células T establecidas a partir de un individuo que se sospecha que tiene la enfermedad de Fabry se puede cuantificar en su lugar usando células T procedentes de un individuo normal como control. Además, tanto la actividad de α -GAL como los ensayos de potenciación mediante SPC se pueden llevar a cabo casi simultáneamente usando las mismas células T derivadas de una muestra del paciente. Puesto que las células T pueden expresar más α -GAL (la α -GAL en células T normales en comparación con WBCs es mucho mayor), será más fácil de confirmar con más certeza si un paciente tiene actividad de α -GAL por debajo del intervalo normal, debido a que el margen de error será más pequeño. En consecuencia, el uso del ensayo de células T podría evitar potencialmente diagnósticos erróneos.

Además, el ensayo modificado también se puede usar para monitorizar periódicamente el progreso de los pacientes en los que se inició la terapia con SPC para confirmar que la actividad de α -GAL sigue aumentando con respecto a
35 antes del inicio del tratamiento.

II. Ensayo in vivo

Se evaluaron WBCs para la potenciación de α -GAL mediante una SPC *in vivo*. La actividad de α -GAL en WBCs derivados de pacientes se evalúa antes de la administración de SPC, a fin de obtener un valor de línea base. A los pacientes se les administra entonces DGJ diariamente (*por ejemplo*, 150 mg/día) durante un periodo de tiempo suficiente, *por ejemplo* alrededor de 10 días a alrededor de 2 semanas, seguido de la extracción de sangre y determinación de cambios en la actividad de α -GAL desde el valor de línea base. No es necesario el cultivo de las células antes o tras la administración.

La dosis y el régimen de dosificación de la administración de DGJ durante el período de evaluación *in vivo* puede variar dependiendo del paciente, puesto que hay tanta heterogeneidad entre las mutaciones, y dependiendo de la actividad residual de α -GAL del paciente. Como ejemplos no limitantes, se espera que las siguientes dosis y regímenes sean suficientes para incrementar α -GAL en individuos mayoritariamente "rescatables": 25 mg b.i.d.; 50 mg una vez al día; 50 mg b.i.d.; 50 mg una vez cada dos días, 75 mg una vez al día; 75 mg b.i.d.; 100 mg una vez al día; 100 mg b.i.d.; 150 mg una vez al día; 150 mg b.i.d., 150 mg una vez cada dos días; 250 mg una vez al día; 250 mg b.i.d. y 250 mg una vez cada dos días. En realizaciones específicas, las dosis son 50 mg una vez al día; 50 mg una vez cada dos días; 150 mg una vez al día; 150 mg una vez cada dos días.

La administración de DGJ de acuerdo con la presente invención se realiza en una formulación adecuada para la administración por boca en una forma de dosificación oral tal como un comprimido, cápsula o disolución. Como ejemplo, al paciente se le administran oralmente cápsulas que contienen cada una 25 mg, 50 mg, 75 mg o 100 mg, o sus combinaciones. Para este ensayo, en el caso de la administración oral, se prefiere que al paciente se le administre la DGJ sin alimentos (*por ejemplo*, sin alimentos 2 horas antes y durante 2 horas después de la dosificación), puesto que la biodisponibilidad puede ser menor si se toma con alimento, con riesgo de ese modo de resultados inexactos.

Los pacientes que han estado en otras terapias, tales como ERT, deberían cesar el tratamiento durante al menos alrededor de 28 días antes del ensayo *in vivo*, para asegurar los resultados más exactos.

Separación de los glóbulos rojos

5 Los WBCs se aislaron y separaron como se describe anteriormente para el ensayo *in vitro* de células T. Sin embargo, no se ha de añadir medio RPMI o DMSO a los peletes antes de la congelación (como ocurrió en la etapa 5 anterior).

Ensayo de actividad/potenciación enzimática

10 Los peletes se descongelaron en hielo, y las células se lisaron entonces mediante adición de tampón de lisis y disgregación física (tal como mediante el uso de una mezcladora de vórtice y agitación, y/o ultrasonidos a temperatura ambiente) durante un tiempo suficiente, seguido de la reunión de los lisados en un tubo de polipropileno en hielo, separando después el lisado reunido en alícuotas para la congelación.

15 Los lisados de WBC se descongelaron entonces en hielo y se mezclaron (nuevamente mediante ultrasonidos y/o sometiendo a vórtice). Entonces se añadieron muestras de cada lisado, así como patrones y controles negativos, a los pocillos apropiados en, *por ejemplo*, una microplaca de 24 ó 96 pocillos. Se añaden cantidades iguales de GalNAc a cada pocillo en por ejemplo tampón de citrato/fosfato, pH 4,6, seguido de la adición de un sustrato marcado, tal como 4-MU Gal (también en tampón de citrato/fosfato, pH 4,6) a todos los pocillos, y la incubación durante un tiempo corto a temperatura ambiente. La placa se mezcla entonces brevemente y se incuba a 37°C durante un período de tiempo suficiente para permitir la hidrólisis del sustrato, *por ejemplo* alrededor de 1 hora. Después del período de tiempo suficiente, la reacción se detiene mediante adición de tampón de parada, y la placa se lee en un lector de placas fluorescente (*por ejemplo*, Wallac 1420 Victor3™) para determinar la actividad enzimática por pocillo.

25 Diversas modificaciones de este ensayo serán fácilmente averiguables por aquel de pericia normal en la técnica. Los ejemplos de sustratos artificiales que se pueden usar para detectar la actividad de α -GAL incluyen, pero no se limitan a, p-nitrofenil- α -D-galactopiranosido y 4-MU Gal. Obviamente, sólo son adecuados para uso los sustratos que se pueden escindir mediante α -GAL humana. Se señala que aunque se prefiere el uso de un sustrato fluorógeno, se contemplan otros métodos de determinación de la actividad de α -GAL para uso en el método, incluyendo sustratos cromógenos o técnicas de inmunocuantificación.

Criterios de determinación de idoneidad

30 Los criterios para determinar la idoneidad de la terapia con SPC dependen de la actividad enzimática residual del paciente en la línea base, *es decir*, la actividad determinada en las células T no tratadas en el ensayo *in vitro*, o la actividad en los WBCs antes de la administración de SPC en el ensayo *in vivo*. Cuanto menor es la actividad residual, mayor necesidad de potenciación a fin de que el paciente sea considerado un respondedor probable al tratamiento.

Los criterios para determinar la idoneidad para el ensayo *in vitro* son los siguientes:

- 35
- Si la actividad residual de α -Gal A en linfocitos es menor que 1% del normal, entonces la actividad de α -GAL tras la incubación con DGJ debe ser al menos 2% del normal;
 - si la actividad residual de α -GAL en linfocitos está entre 1% del normal y <3% del normal, entonces la actividad de α -GAL tras la incubación con DGJ debe ser al menos 2x el nivel de la línea base;
 - si la actividad residual de α -GAL en linfocitos está entre 3% del normal y <10% del normal, entonces la actividad de α -GAL tras la incubación con DGJ debe ser al menos 3% del normal mayor que el nivel de la línea base; y
 - si la actividad residual de α -GAL en linfocitos es 10% del normal o más, entonces la actividad de α -GAL tras la incubación con DGJ debe ser al menos 1,3x el nivel de la línea base.
- 40

45 Como alternativa, los pacientes con enfermedad de Fabry se podrían categorizar como idóneos para la terapia con SPC si su actividad de α -GAL en células T en presencia de una SPC tal como DGJ es al menos alrededor de 35-40 nmoles/h/mg de proteína, lo que es alrededor de 58% del normal. De acuerdo con la presente invención, el promedio específico fue demasiado variable para darlo como una media global. En consecuencia, las muestras de células T de los pacientes se compararon en actividad con al menos tres controles normales recogidos en las 48 h de la fecha de recogida para la muestra de paciente, y se hicieron crecer en condiciones idénticas (véase el Ejemplo 1). Como comparación, la actividad de α -GAL en células T procedentes de pacientes con Fabry con A97V, R301Q, y R111H en la línea base fue 8 nmoles/h/mg de proteína, 4 nmoles/h/mg y 1,8 nmoles/h/mg. Las células T expresan mayores niveles de α -GAL en comparación con otros WBCs, de manera que se espera que la actividad de α -GAL en un cultivo enriquecido para células T será significativamente mayor que cuando se considera normal en WBCs totales (21 nmoles/h/mg de proteína a alrededor de 50 nmoles/h/mg de proteína; Desnick et al., The Metabolic and

50

Molecular Bases of Inherited Disease. 8ª Edición 2001, Scriver et al., ed., p. 3733-3774, McGraw-Hill, Nueva York). Para comparación, tres pacientes con Fabry que tienen las mutaciones R220X, R356W, y G132R tuvieron una actividad de α -GAL en WBC de 0,22, 0,18, y 0,26 nmoles/br/mg de proteína, respectivamente.

Para el ensayo *in vivo*, se usaron los siguientes criterios para determinar los criterios de idoneidad:

- 5 • Si α -GAL de la línea base es menor que 1% del normal, entonces la actividad de α -GAL en el Día 15 tras el tratamiento con DGJ debe ser al menos 2% del normal;
- si α -GAL de la línea base está entre 1% del normal y <5% del normal, entonces la actividad de α -GAL debe ser al menos 2x el nivel de línea base después del período de tratamiento;
- 10 • si α -GAL de la línea base está entre 5% del normal y <10% del normal, entonces la actividad de α -GAL debe ser al menos 5% del normal mayor que el nivel de la línea base después del período de tratamiento; y
- si α -GAL de la línea base está es 10% del normal o más, entonces la actividad de α -GAL debe ser al menos 1,5x el nivel de línea base después del período de tratamiento.

15 Como alternativa, un incremento en la actividad de al menos alrededor de 20% en las células cultivadas con SPC con respecto a la actividad en las células no cultivadas con SPC, ya sea en el ensayo *in vitro* o *in vivo*, puede ser indicativo de que el paciente tendrá una respuesta clínicamente relevante (terapéuticamente eficaz) a la terapia con SPC.

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

EJEMPLOS

25 EJEMPLO 1: Método *in vitro* para evaluar los efectos de una SPC sobre la actividad de α -GAL

El presente Ejemplo proporciona el ensayo de diagnóstico *in vitro* para determinar una capacidad de respuesta del paciente con Fabry a chaperona farmacológica específica.

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

1. Materiales:

- 30 • Tubo CPT: Becton-Dickenson (tubo de preparación de células BD Vacutainer® CPT™ con citrato de sodio, nº de cat. 362761). IL-2 humana (recombinante), PreProTECH, nº de cat. 200-02
- Fitohemaglutinina (Forma M) (PHA), líquida, Invitrogen, nº de cat. 10576-015
- Medio RPMI-1640, Mediatech Inc., nº de cat. 10-040-CV
- 35 • Suero fetal bovino, Mediatech Inc., nº de cat. 35-010-CV Ácido cítrico, monohidrato, ACS, Mallinckrodt, nº de cat. 0627
- Fosfato sódico dibásico (Na_2HPO_4), ACS, Mallinckrodt nº de cat. 7917
- Hidróxido de sodio, disolución volumétrica ION, Mallinckrodt nº de cat. H385
- Ácido fosfórico, ACS, Mallinckrodt nº de cat. PX0995-3
- 40 • 4-MU α -D-galactopiranosido (4-MU-Gal), Sigma nº de cat. M-7633 N-Acetil-D-galactosamina (GalNAc), Sigma nº de cat. A-2795
- 4-metilumbeliferona (4-MU), Sigma nº de cat. M-1381
- Glicina, grado de cultivo tisular, Fisher nº de cat. BP381
- Agua doblemente desionizada
- 45 • Disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, PBS, (sin Ca, sin Mg), Mediatech Inc. nº de cat. 21-031-CV

ES 2 573 498 T3

- Kit de ensayo de proteínas Micro BCA, Pierce nº de cat. 23235
 - Placas de microtitulación de 96 pocillos, Costar fondo redondo de 96 pocillos de poliestireno negro, nº de cat. 3792 Microplacas tratadas de cultivo tisular de 24 pocillos Costar, Corning Life Sciences, nº de cat. 3526
 - Tubos Falcon de polipropileno de 15 ml, Becton Dickinson, nº de cat. 352097
- 5
- Crioviales estériles
 - Incubadora humidificada de CO₂ al 5%, 37°C
 - Baño de agua a 37°C
 - Lector de placas mediante fluorescencia
2. Separación de WBC:
- 10
- Se extrajo sangre del paciente en un tubo de CPT de 8 ml, que se ha almacenado a 18-25°C.
 - Inmediatamente después de recoger sangre, se mezcló invirtiendo el tubo 8-10 veces.
 - El tubo se centrifugó a temperatura ambiente (18-25°C) durante 30 minutos a 1800 x g usando una centrifugadora de mesa equipada con cubetas oscilantes. Se llevaron a cabo normas de seguridad para la manipulación de muestras de sangre, incluyendo el uso de una cubeta de tipo canasto cerrada para la centrifugación.
- 15
- Tras la centrifugación, varias capas de la composición sanguínea se hicieron distinguibles, lo que representó la separación de los glóbulos rojos del plasma y glóbulos blancos. Si esto no se produce, caliéntese en las manos durante 5 minutos y centrifúguese de nuevo.
3. Lavado de los WBCs
- 20
- La mitad de la capa plasmática se aspiró mediante vacío y se desechó sin perturbar la capa de glóbulos blancos. Todo el fluido que queda, incluyendo la capa celular, se transfirió con una pipeta Pasteur a un tubo de centrifugadora Falcon de tapa de rosca cónico de 15 ml.
 - Se añadió PBS para llevar el volumen hasta 14 ml, y el tubo se mezcló mediante inversión.
 - El tubo se centrifugó a temperatura ambiente durante 20-30 minutos a 1300 rpm (aproximadamente 320 x g).
- 25
- Inmediatamente después de la centrifugación, se aspiró tanto sobrenadante como fue posible mediante vacío y se desechó sin perturbar el pelete celular.
4. Lavado opcional
- 30
- El pelete celular se resuspendió en el líquido que queda golpeando contra la parte inferior del tubo.
 - Se añadieron 10 ml de PBS a las células resuspendidas, y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 minutos a 1300 rpm.
 - Inmediatamente después de la centrifugación, se aspiró tanto sobrenadante como fue posible mediante vacío y se desechó sin perturbar el pelete celular.
5. Opcional: Congelación del pelete de WBC
- 35
- El pelete celular se mezcló en el líquido que queda golpeando con un dedo contra la parte inferior del tubo.
 - Se añadieron 0,5 a 1 ml de PBS a las células resuspendidas, y se transfirió la mitad del pelete (usando una punta estéril en una micropipeta) a un criovial de 1,8 ml marcado.
 - El criovial se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 5000 rpm (aproximadamente 2250 g) en una microcentrifugadora.
 - Todo el líquido del sobrenadante se desechó usando una pipeta Pasteur sin perturbar el pelete celular.
- 40
- Entonces se añadieron al tubo 0,5 a 1 ml de RPMI 1640 que contiene 10% de FBS y 5% de DMSO y se mezcló con una pipeta y se congeló toda la noche a -80C antes de transferir a un congelador de almacenamiento de células en nitrógeno líquido.
- B. Establecimiento de cultivos de células T a partir de muestras de sangre

ES 2 573 498 T3

1. Las células lavadas se resuspendieron en 3,0 ml de medio RPMI 1640 con 10% de suero Cosmic Calf Serum (CCS, Hyclone Laboratories, Logan, UT), alrededor de 25 ng/ml de IL-2 (PreProTECH, Rocky Hill, NJ) y la concentración de PHA (Life Technology, Gaithersburg, MD) recomendada por el fabricante. Las células se transfirieron entonces a un matraz de cultivo de 25 cm³ vertical, y se incubaron durante 3-4 días a 37°C, 5% de CO₂.
- 5 2. El cultivo celular se diluyó hasta 5 ml con medio de crecimiento (RPMI-1640, 10% de FBS, 25 ng/ml de IL-2). La concentración celular se ajustó entonces a alrededor de 5 x 10⁵ células/ml en el matraz.
3. El crecimiento de las células se monitorizó diariamente. Las células se mantuvieron entre 5 x 10⁵ y 1,5 x 10⁶ células en un matraz vertical. La profundidad del medio en el matraz no superó 1 cm (alrededor de 7 ml en un T25 y 20 ml en un T75). Los cultivos se pueden mantener durante aproximadamente 21 días con un tiempo de duplicado de alrededor de 24 h. La senescencia del cultivo será manifiesta mediante una reducción drástica en la tasa de crecimiento. El tiempo de cultivo se puede extender posiblemente mediante reestimulación con PHA.
- 10 4. Congelación opcional de linfocitos T: los linfocitos T se pueden congelar a 3 x 10⁶ células/vial usando medio RPMI 1640 que contiene 20% de FCS y 7,5% de DMSO. En el día 5, 6 ó 7, crioconsérvense tantos viales como sea posible a 3 x 10⁶ células/vial. Esto es suficiente para descongelar 5 ml de cultivo a 5 x 10⁵ células viables/ml.
- 15 Cuando se establezcan cultivos de células T, se debería observa lo siguiente.
 - Las muestras de sangre reciente se deberían recoger en tubos heparinizados (o tubos que contengan un anticoagulante apropiado), y se deberían usar el mismo día. Se deberían tubos ACD si las muestras no se pueden procesar en las 24 horas. (Clin Chem. enero de 1988; 34(1): 110-3; Clin Diagn Lab Immunol. noviembre de 1998; 5(6): 804-7.).
 - 20 • Habitualmente es suficiente ocho-10 ml de sangre para establecer 20 millones de células hacia el día 5.
 - Los linfocitos T son las dianas específicas del virus del VIH. Extrémese la precaución si se desconoce el estado de VIH del paciente.
 - Cada nuevo lote de IL-2 se debería ensayar para determinar la concentración óptima. Se ha encontrado que el lote procedente de PreProTECH usado para estos experimentos es óptimo a 25 ng/ml, con sólo una ligera reducción en el crecimiento celular a concentraciones hasta 50 ng/ml.
 - 25 • Cada lote de mitógeno, por ejemplo fitohemaglutinina A (PHA), se evalúa por el proveedor (Invitrogen), y se debería usar a la dilución recomendada.
 - Todos los cultivos se mantuvieron en una atmósfera saturada con agua a 37C, 5% de CO₂.
 - 30 • Las células mononucleares y los linfocitos también se pueden recoger usando medio de separación de linfocitos (Ficoll-Hypaque) o tubos Lymphoprep, siguiendo el procedimiento estándar del fabricante.

Cuando se analiza mediante clasificación celular activada por fluorescencia, el régimen de estimulación de IL-2 y PHA da como resultado 99% células CD3-positivas (que tiñen todos los subconjuntos de células T), con números iguales de células CD4-positivas y CD4-negativas (datos no mostrados).

C. Tratamiento con chaperonas

- 35 La densidad de las células T se ajustó a 1 x 10⁶ por 3 ml de medio de cultivo (RPMI-1640, 10% de FBS, 25 ng/ml de IL-2). Entonces se pipetea 3 ml (~1 x 10⁶ células) en cada uno de 6 pocillos de una placa de cultivo marcada de 6 pocillos, y se incubó toda la noche a 37°C, 5% de CO₂. Entonces se añadieron 3 ml de medio adicional a 3 pocillos para dar un volumen final de 6 ml/pocillo. A los tres pocillos que quedan, 3 ml de medio que contiene DGJ (Cambridge Major Laboratories, Inc., Germantown, WI) a una concentración de alrededor de 40 µM (2x; la
- 40 concentración final es 20 µM), durante 4-5 días. Las células se cosecharon mediante centrifugación (400 x g durante alrededor de 10 minutos) y se lavaron 1x en 10 ml de PBS. Los peletes resultantes se resuspendieron en 1 ml de PBS y se transfirieron a un tubo de microcentrifugadora de 1,7 ml, y se centrifugaron en una microcentrifugadora refrigerada a 3000 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante, y los peletes se almacenaron congelados a -80°C hasta que se ensayaron para determinar la actividad enzimática.
- 45 Obsérvese que antes de llevar a cabo el ensayo de potenciación, se determinó la concentración óptima de DGJ usando un intervalo de 2 nM-200 µM. Se determinó que 20 µM fue el óptimo.

D. Preparación de fibroblastos

- 50 Para una comparación, se prepararon cultivos de fibroblastos como se describió previamente (por ejemplo, documento U.S. 6.274.597). De forma breve, los cultivos de fibroblastos derivaron de biopsias de piel de pacientes y se hicieron crecer en DMEM con 10% de FBS hasta que se establecieron (3-4 semanas).

E. Ensayo de actividad

Antes del ensayo, las células T se descongelaron en hielo y se sometieron a ultrasonidos durante 2 minutos, y todos los otros reactivos del ensayo se descongelaron a temperatura ambiente. El ensayo fluorométrico de la actividad de α -GAL se llevó a cabo esencialmente como se describió previamente (Kusiak et al., J Biol Chem. 1978; 253(1), 184-190). Las células se lisaron en 0,2 ml de agua desionizada, combinado con un pipeteado y un vórtice vigorosos. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación a 13000 rpm durante 2 min. a 4°C se colocó en un tubo reciente y se usó como la fuente de α -GAL. La actividad de α -GAL se determinó incubando alícuotas de 50 μ l del sobrenadante (que contiene cantidades comparables de proteína según se determina usando 20 μ l en un ensayo de cuantificación de proteína estándar) en una placa de 24 pocillos a 37°C con 3,75 mM de 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (4-MU Gal) (Research Products International, Mount Prospect IL) en tampón de ácido cítrico/fosfato (tampón de 27 mM de citrato/46 mM de fosfato, pH 4,6) sin taurocolato y con BSA (3 mg/ml). El porcentaje de α -GAL se determinó comparando la actividad total con la actividad observada en presencia de 117 mM de N-acetilgalactosamina (GalNAc) Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), un inhibidor específico de N-acetilgalactosaminidasa. Se usó un lector de detección de fluorescencia Wallac 1420 Victor3™ (Perkin Elmer, CA) para medir la 4-MU liberada, a longitudes de excitación y de emisión de 355 nm y 460 nm, respectivamente. También se emplearon pocillos apropiados para patrones fluorescentes y negativo (sin sustrato o sin lisado). Para cada muestra de paciente, se ensayaron concurrentemente al menos tres muestras normales.

Las incubaciones duraron típicamente 30 minutos, pero se pueden emplear períodos más prolongados o más cortos con resultados similares.

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

$$\frac{\text{Fluorescencia de la muestra}}{\text{Fluorescencia del patrón}} * \frac{60 \text{ min.}}{\text{Tiempo de incubación (min.)}} * \frac{1000 \mu\text{l}}{\text{Volumen evaluado } (\mu\text{l})} * \frac{1}{\text{Valor de proteína (mg/ml)}}$$

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 nmol de 4-metilumbeliferona por hora. El "ruido" de la línea base en el resultado de fluorescencia se obtuvo evaluando seis veces el promedio del blanco. Si la actividad tras el tratamiento con SPC fue al menos 2 desviaciones estándar por encima de la línea base, se consideró sensible y sin ruido.

Para el ensayo de potenciación de fibroblastos comparativo, se hicieron crecer fibroblastos ($\sim 1,5 \times 10^6$) en 12 ml de medio de cultivo en un matraz de cultivo tisular T75 en ausencia o presencia de DGJ a 20 μ M durante 3 días. Al final del período de incubación, las células se eliminaron del matraz mediante tratamiento con disolución de tripsina-EDTA, se recogieron mediante centrifugación, y se lavaron 3 veces con disolución salina tamponada con fosfato. Los peletes celulares se congelaron a -80°C hasta que se ensayaron para determinar la actividad de α -GAL. Todas las etapas para procesar el pelete celular para el ensayo, incluyendo el tampón de extracción, el tiempo de ultrasonidos, y los volúmenes usados, son los mismos que los usados para las células T ensayadas anteriormente.

F. Transferencias Western

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

Resultados

Este método descrito anteriormente que usa células T es rápido y eficaz cuando se compara con ensayos de α -GAL a base de fibroblastos realizados sustancialmente de forma similar al ensayo de células T (excepto que se colocan en placas alrededor de $1,5 \times 10^6$ fibroblastos en cada pocillo en lugar de $2,5 \times 10^6$ células T).

Usando este método, se incubaron células T procedentes de pacientes con Fabry sin y con 20 μ M de DGJ durante 1, 2 y 4 días, respectivamente, y se midió la actividad de α -GAL en homogenados celulares y se comparó con valores de control normales. Cuando se repuso el medio después de 2 días y las células se incubaron durante 2 días adicionales, la actividad de α -GAL de A97V fue 13% del control normal (Figura 1, círculos blancos). Sin embargo, cuando se añadió 20 μ M de DGJ al medio de las células T, la actividad de α -GAL aumentó hasta alrededor de 40% del normal después de solamente 1 día de incubación, y continuó hasta 80% del normal tras 4 días de incubación (Figura 1, círculos en negro). La adición de DGJ reciente y de medio después de 2 días, y la incubación durante 2 días adicionales, no dio como resultado ningún cambio en el perfil con respecto al observado con una única adición de DGJ. El incremento observado en la actividad después de 3 días hasta un nivel claramente distinguible de la actividad de α -GAL sin DGJ condujo a la adopción de un tiempo estándar de medición después de 3 días de

incubación con 20 μM de DGJ en experimentos subsiguientes. El uso de un curso de tiempo de tres días evita la necesidad de proporcionar medio reciente y/o de dividir las células después de 3 días en cultivo.

- 5 Para determinar el efecto de la dosificación de DGJ en células T procedentes de controles normales, se midió la actividad de α -GAL en células de pacientes usando un intervalo de DGJ desde 2 nM hasta 200 μM (Figura 2A), y se comparó con valores de controles normales no tratados ensayados en el mismo día. La actividad de α -GAL aumentó entre 2 nM y 20 μM de DGJ. A 200 μM , DGJ inhibió la actividad normal de α -GAL hasta aproximadamente 40% del promedio de los controles normales no tratados. La potenciación óptima de la actividad mutada de α -GAL dentro de este mismo intervalo de concentraciones de DGJ se determinó para la mutación A97V y se comparó con los
- 10 controles normales (Figura 2B). Se llevaron a cabo tres experimentos distintos para los efectos de la dosis sobre A97V. DGJ en concentraciones de 2 nM a 20 μM aumentó la actividad de α -GAL de A97V de una manera dependiente de la dosis. Sin embargo, a concentraciones de DGJ de 200 μM , hubo una disminución en la actividad de α -GAL cuando se compara con su nivel más elevado cuando las células se hicieron crecer en 20 μM de DGJ. En los tres experimentos, la potenciación óptima de la actividad de la mutación A97V se observó a 20 μM de DGJ, con una actividad ligeramente inferior a 2 y 200 μM . Cuando las mutaciones R112H y R301Q se ensayaron en el mismo
- 15 intervalo de concentraciones, surgió un patrón similar, observándose el nivel más elevado de actividad potenciada a 20 μM de DGJ (Figuras 2C). Los resultados mostraron que diversas mutaciones tuvieron perfiles de respuesta a la dosificación similares pero diferentes niveles de potenciaciones. Entre los tres genotipos mutantes de α -GAL ensayados para determinar los efectos de la dosificación, 20 μM de DGJ dio como resultado un incremento en α -GAL hasta al menos 50% del control normal.
- 20 El efecto de rescate de α -GAL mutante de pacientes con enfermedad de Fabry con al menos 11 genotipos distintos se ha observado usando una chaperona farmacológica usando este ensayo de α -GAL a base de células T. Los resultados, presentados en la Tabla 1, más abajo, mostraron que DGJ potenció la actividad de al menos cinco formas mutantes distintas de α -GAL en células T (T) y fibroblastos (F). Sin embargo, la chaperona farmacológica no potenció la actividad de cuatro formas mutantes distintas de α -GAL. La actividad de α -GAL de un paciente con Fabry clásico se potenció mediante DGJ a nivel intermedio. La importancia de este ensayo se basa en el hecho de que se puede usar para cribar pacientes que se pueden beneficiar de la administración de chaperonas farmacológicas, evitando así el gasto y la frustración de una terapia innecesaria y de biopsias tisulares.
- 25

Tabla 1

Número de muestra	Paciente/Normal	Sexo	Mutación	Número de réplicas (n=)	Actividad (% normal)		Relación de potenciación	Grupo
					(- DGJ)	(+ DGJ)		
	1 PT	V	T411	3	48	147	3	E
	2 PT	V	T411	4	61	175	2,9	E
	3 PT	V	M51K	2	6	29	4,6	E
	4 PT	V	A97V	3	14	75	5,5	E
	5 PT	V	R112C	1	10	36	3,8	E
	6 PT	V	R112C	3	8	49	6,3	E
	7 PT	V	R112H	2	3	51	15,9	E
	8 PT	V	R112H	2	8	73	9,4	E
	9 PT	V	R112H	3	3	60	20	E
	10 PT	V	A143T	4	31	69	2,2	E
	11 PT	V	A143T	5	49	62	1,3	E
	12 PT	V	S201F	1	9	82	9,6	E
	13 PT	V	P205T	1	37	108	2,9	E
	14 PT	V	N215S	2	15	79	5,2	E
	15 PT	V	P259R	1	9	297	32,6	E
	16 PT	V	P259R	3	3	138	47,4	E
	17 PT	V	F295C	3	1	29	32,3	E
	18 PT	V	L300P	5	2	72	36,1	E
	19 PT	V	R301Q	1	7	91	12,3	E
	20 PT	V	R301Q	3	22	204	9,1	E
	21 PT	V	R301Q	4	7	80	12,1	E
	22 PT	V	G328A	4	2	54	24,6	E
	23 PT	V	R49C	9	3	11	4,3	I

ES 2 573 498 T3

Número de muestra	Paciente/Normal	Sexo	Mutación	Número de réplicas (n=)	Actividad (% normal)		Relación de potenciación	Grupo
					(- DGJ)	(+ DGJ)		
	24 PT	V	Y207S	3	4	15	3,5	I
	25 PT	V	S276G	1	0	9		I
	26 PT	V	S276G	3	1	12	9,8	I
	27 PT	V	C94S	2	2	2	NE	NE
	28 PT	V	G128E	1	2	4	NE	NE
	29 PT	V	G128E	5	2	2	NE	NE
	30 PT	V	G132R	3	1	2	NE	NE
	31 PT	V	A143P	2	2	1	NE	NE
	32 PT	V	A143P	2	1	1	NE	NE
	33 PT	V	R220X	3	0	1	NE	NE
	34 PT	V	R227Q	3	4	3	NE	NE
	35 PT	V	W236R	3	1	2	NE	NE
	36 PT	V	G261D	1	0	1	NE	NE
	37 PT	V	G271C	1	2	3	NE	NE
	38 PT	V	G271C	3	1	2	NE	NE
	39 PT	V	N272K	1	0	0	NE	NE
	40 PT	V	W287C	1	1	1	NE	NE
	41 PT	V	W287C	1	1	2	NE	NE
	42 PT	V	R356W	1	1	1	NE	NE
	43 PT	V	R356W	4	0	0	NE	NE
	44 PT	V	dE358	3	2	4	NE	NE
	45 PT	V	L415P	1	0	3	NE	NE
	46 PT	V	desconocida	1	1	2	NE	NE
	47 PT	V	desconocida	2	0	1	NE	NE
	48 PT	V	1042insG	3	1	1	NE	NE
	49 PT	V	256del1	1	0	0	NE	NE
	50 PT	V	30delG	6	2	2	NE	NE
	51 PT	V	82insG	2	1	0	NE	NE
	52 PT	V	del26bp21	1	0	1	NE	NE
	53 PT	V	del26bp21	1	0	0	NE	NE
	54 PT	V	ivs4-1g/a	2	0	0	NE	NE
	55 PT	V	Q119X	1	2	1	NE	NE
	56 PT	V	R220X	3	0	1	NE	NE
	57 PT	V	R301X	4	0	7	NE	NE
Todos NL	NL	V ó M		162	101	128	1,3	
Todos NL	Varón	NL	V	115	101	124	1,2	
Todos NL	Mujer	NL	M	47	84	117	1,4	
	58 NL	M		8	120	161	1,3	
	59 NL	M		3	88	100	1,1	
	60 NL	M		1	95	120	1,3	
	61 NL	M		9	85	104	1,2	
	62 NL	M		8	103	150	1,5	
	63 NL	M		3	107	165	1,5	
	64 NL	M		15	106	145	1,4	
	65 NL	V		8	100	97	1	
	66 NL	V		4	80	141	1,8	
	67 NL	V		1	172	198	1,1	

Número de muestra	Paciente/Normal	Sexo	Mutación	Número de réplicas (n=)	Actividad (% normal)		Relación de potenciación	Grupo
					(- DGJ)	(+ DGJ)		
	68 NL	V		1	271	315	1,2	
	69 NL	V		1	110	140	1,3	
	70 NL	V		1	101	145	1,4	
	71 NL	V		19	106	138	1,3	
	72 NL	V		11	90	131	1,4	
	73 NL	V		4	75	99	1,3	
	74 NL	V		10	105	126	1,2	
	75 NL	V		3	97	100	1	
	76 NL	V		2	93	108	1,2	
	77 NL	V		3	85	116	1,4	
	78 NL	V		3	89	118	1,3	
	79 NL	V		1	127	107	0,8	
	80 NL	V		42	100	117	1,2	
	81 NL	V		1	102	111	1,1	

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

Se determinó que la potenciación óptima de la actividad de α -GAL mutada en el ensayo *in vitro* se logró usando alrededor de 20 μ M de DGJ. Entre los tres genotipos mutantes de α -GAL ensayados para determinar los efectos de la dosificación, 20 μ M de DGJ dio como resultado un incremento en α -GAL hasta al menos 50% del control normal para cada uno (Figura 3).

En la Tabla 1, el grupo potenciable incluyó pacientes cuya actividad de α -GAL fue al menos 50% de los controles normales cuando se cultiva en presencia de DGJ (*por ejemplo*, R112H se potenció hasta 60% de la actividad del control normal). Se incluyen en el grupo potenciable las mutaciones A97V, R301Q, R112H y L300P. Por ejemplo, la actividad de la mutación A97V aumentó de 14 a 75% del normal en presencia de DGJ, un incremento de 6 veces. De forma similar, R301Q aumentó desde 7 a 80% del normal, con 12 veces, y R112H aumentó de 3 a 60%, casi un cambio de 20 veces. Además, la actividad en la mutación L300P aumentó de 2% a 72% de normal, un incremento de 37 veces, que fue el mayor entre las mutaciones potenciables examinadas. L300P fue poco habitual por cuanto parte de la actividad sin DGJ estaba por debajo del umbral mínimo para la detección. Estos resultados demuestran niveles y relaciones de potenciación dependientes de la mutación.

Las transferencias Western mostraron que la intensidad de las bandas aumentó considerablemente mediante el tratamiento con DGJ en células de controles normales y aquellas con la mutación A97V y R301Q, mientras que no se observó incremento para R356W, G132R, y A143P (Figura 3). La proteína parece haberse desplazado hasta un peso molecular aparente inferior, indicando maduración de la enzima mediante paso desde el retículo endoplásmico, a través del aparato de Golgi, al lisosoma. Las transferencias Western muestran que la potenciación de la actividad de α -GAL por DGJ está correlacionada con una mayor cantidad de proteína α -GAL. Todavía no se ha observado ningún caso en el que los niveles de proteína incrementados según se miden mediante transferencias Western no diesen como resultado mayor actividad enzimática.

Discusión

El uso de células T en un sistema de ensayo para potenciar enzimas mediante SPCs ofrece ventajas significativas en la velocidad de ensayo y conveniencia con respecto a otros sistemas de cultivo. Una etapa crítica a la hora de determinar qué pacientes se pueden beneficiar de la terapia con SPC fue el desarrollo de un método rápido y fiable para cribar células derivadas de pacientes para la potenciación de la actividad de α -GAL mediante DGJ. Los resultados demuestran un método para generar rápidamente un cultivo celular de corta vida que permite el ensayo de la potenciación, y también proporcionan un sistema útil para estudios posteriores sobre el mecanismo de acción o para cribar moléculas de chaperonas adicionales. Los leucocitos usados tradicionalmente para el diagnóstico de estado afectado y portador no sobreviven suficientemente para permitir ensayos repetidos si fuese necesario.

Aunque se han ensayado linfoblastos B transformados con el virus de Epstein-Barr (Fan et al., Nat med 1999; 5(1), 112-115) y cultivos de fibroblastos primarios (Fan, *más arriba*; Mayes et al., Clin Chim Acta. 1981; 112(2), 247-251), estos no son convenientes para uso a gran escala para cribar pacientes para estudios clínicos. Los cultivos de fibroblastos primarios requieren una biopsia de punción de la piel invasiva, y generalmente tardan al menos tres a

cuatro semanas para que crezcan suficientes células para el ensayo. Los linfoblastos de células B requieren el proceso de transfección y selección viral de Epstein Barr, que consume tiempo y trabajo, además de tener efectos desconocidos sobre la actividad enzimática.

5 La presente invención proporciona un método para establecer cultivos de células T a partir de sangre reciente de individuos de controles normales y pacientes con la enfermedad de Fabry. Estos cultivos se pueden hacer crecer para uso en un ensayo de potenciación para α -GAL en 7 a 10 días. Estos datos también muestran que la eficacia de la potenciación con DGJ fue evidente después de alrededor de 3 días en el medio de crecimiento de las células T. Los datos generados son una medida reproducible del grado de actividad enzimática potenciada por una SPC para un genotipo específico.

10 Este método se puede usar para otros ensayos de potenciación a base de SPC de otras enfermedades genéticas, incluyendo glucoesfingolipidosis, mucopolisacaridosis, y enfermedad de almacenamiento de glucógeno (Pompe), y se puede extender como un protocolo de investigación y clínico en un amplio intervalo de enfermedades genéticamente definidas, tales como fibrosis quística (CFTR) y cáncer (p53, PTEN), y otras.

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

15 Este ejemplo describe resultados de un estudio de Fase II abierto de DGJ en pacientes con Fabry (n = 11) con 10 mutaciones diferentes de α -GAL, y apoya el uso del ensayo *in vivo*. Los pacientes se seleccionaron para el estudio de Fase II basándose en el incremento en la actividad de α -GAL en el ensayo de células T descrito anteriormente. Los genotipos fueron los siguientes: T41L (2 pacientes); A143T; A97V; M51K; S276G; L300P; G328A; P205T; N215S; y L415P.

20 A algunos pacientes (8) se les administró DGJ según el siguiente programa de dosificación: 25 mg b.i.d. dos semanas; 100 mg b.i.d. semanas 2-4; 250 mg b.i.d. semanas 4-6; y 25 mg b.i.d. semanas 6-12. Tres pacientes recibieron 150 mg de DGJ una vez cada dos días durante todo el estudio. La sangre se extrajo en un tubo Vacutainer CPT de 8 ml al final de cada período de dosificación, y se trató como se describe más abajo.

A. Preparación de peletes de WBC humanos para ensayo

25 Los WBCs se prepararon sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de que no se añade FBS/DMSO al pelete antes de la congelación.

Los datos preliminares se resumen en la siguiente tabla.

B. Preparación de lisados de WBC humanos para ensayo

- 30 • A los microtubos que contienen el pelete de WBC, se añadieron 0,6 ml de tampón de lisis (26 mM de citrato/46 mM de fosfato, pH 5,5)
- Los tubos se sometieron a vórtice hasta que las células se resuspendieron
- Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante alrededor de 15 minutos, pero se agitó la suspensión sometiendo a vórtice cada par de minutos
- 35 • Los tubos se sometieron a ultrasonidos durante 2 minutos, y después se sometieron a vórtice durante alrededor de 10 segundos
- Los lisados se incubaron en hielo hasta que se congelaron, y después se reunieron en un recipiente de polipropileno previamente congelado (en hielo)
- 40 • El recipiente se sometió a vórtice, y los lisados reunidos se dividieron en alícuotas de 0,100 ml en tubos de microcentrifugadora de polipropileno de tapa de rosca de 0,5 ml etiquetados previamente congelados. Los lisados reunidos se mezclaron mientras se toman alícuotas sometiendo a vórtice entre cada 10-20 alícuotas.
- Las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta el uso

C. Ensayo de WBC humanos

- Cada tubo que contiene lisado se descongeló en hielo, se sometió a ultrasonidos durante 2 minutos, y después se sometió a vórtice durante 1 minuto.
- 45 • Se añadieron 50 μ l de cada muestra estándar, de control, o clínica en pocillos apropiados de una placa de poliestireno negra (úsense 50 μ l de 0,5% de BSA en tampón de lisis de WBC para un patrón)
- Se añadieron 50 μ l de 117 mM de GalNAc a todos los pocillos, y la placa se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente;

- Se añadieron 50 μ l de 5 mM de sustrato 4-MU Gal a todos los pocillos, y los pocillos se mezclaron en un agitador de placas durante 30 segundos
 - La placa se cubrió y se incubó durante alrededor de 1 hora a 37°C
 - Se añadieron 100 μ l de tampón de NaOH/glicina 0,2M, pH 10,7, a cada pocillo para detener la reacción
- 5 • La placa se leyó usando un lector de placas fluorescente como se describe en el Ejemplo 1

Resultados

10 Los datos disponibles procedentes de los primeros once pacientes tratados con DGJ durante al menos 12 semanas sugieren que el tratamiento con DGJ conduce a un incremento en la actividad de la deficiencia enzimática en la enfermedad de Fabry en 10 de los 11 pacientes (Figura 4). El paciente con el genotipo L415P no mostró un incremento tras DGJ (a las 6 semanas) (Figura 5). Con el fin de calcular el porcentaje de normal en la tabla, se derivó el nivel de α -GAL que es normal usando el promedio de los niveles de α -GAL en glóbulos blancos de 15 voluntarios sanos procedentes del estudio de Fase I de múltiples dosis. Los 11 pacientes representaron 10 mutaciones genéticas diferentes, y tuvieron niveles de línea base de α -GAL que oscilaron de cero a 30% del normal.

15 Los datos muestran un incremento promedio de 2 veces en la actividad de α -GAL, y hasta 10 veces y 15 veces en algunos pacientes según se mide en glóbulos blancos. La actividad permaneció elevada desde 6-24 semanas, y se seguía contando cuando la dosis se redujo nuevamente hasta 25 mg b.i.d. (datos no mostrados).

Discusión

20 Basándose en estos resultados, parece posible cribar pacientes candidatos para la idoneidad para chaperona usando un ensayo *in vivo* o un ensayo *in vitro* usando células T como se describe en el Ejemplo 1, puesto que 10 de 11 pacientes que demostraron un incremento significativo en la actividad de α -GAL en el ensayo de células T demostraron un incremento tras un tratamiento de 2 semanas con DGJ. La realización de un cribado *in vivo* puede permitir una evaluación más exacta de la respuesta *in vivo* a DGJ y a otro tratamiento con chaperonas, puesto que el ensayo *in vitro* puede no ser completamente predictivo de una respuesta *in vivo* debido a interacciones sistémicas, y puede ser especialmente útil determinar la dosis apropiada. Este incremento drástico en la actividad apareció después de 2 semanas a una dosis baja de sólo 50 mg/día (25 mg b.i.d.) (aunque se contemplan por la presente invención diferentes regímenes de dosificación).

30 Estos métodos se pueden usar para ensayos de potenciación a base de chaperonas para otras enfermedades genéticas, incluyendo glicosfingolipidosis, mucopolisacaridosis y otros trastornos de almacenamiento lisosómico, además de otras enfermedades basadas en la genética, tales como fibrosis quística, en la que la maduración de la proteína se produce en el ER.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, donde la formulación es una forma de dosificación oral que comprende un vehículo y 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales se administra a un paciente con la enfermedad de Fabry en una cantidad de 150 mg cada dos días.
2. La formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales se administra durante al menos 12 semanas.
- 10 3. La formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina comprende hidrocloreto de migalastato.
4. La formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza por que la forma de dosificación oral comprende un comprimido, una cápsula o una solución.
- 15 5. La formulación para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales potencia la actividad α -galactosidasa A.
6. 1-Desoxigalactonojirimicina o una de sus sales para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, que se caracteriza por que la 1-desoxigalactonojirimicina o una de sus sales se administra por vía oral a un paciente con la enfermedad de Fabry en una cantidad de 150 mg cada dos días durante al menos 12 semanas.
- 20 7. 1-Desoxigalactonojirimicina o una de sus sales para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry de acuerdo con la reivindicación 6, que se caracteriza por que la sal de 1-desoxigalactonojirimicina comprende hidrocloreto de migalastato.

Figura 1

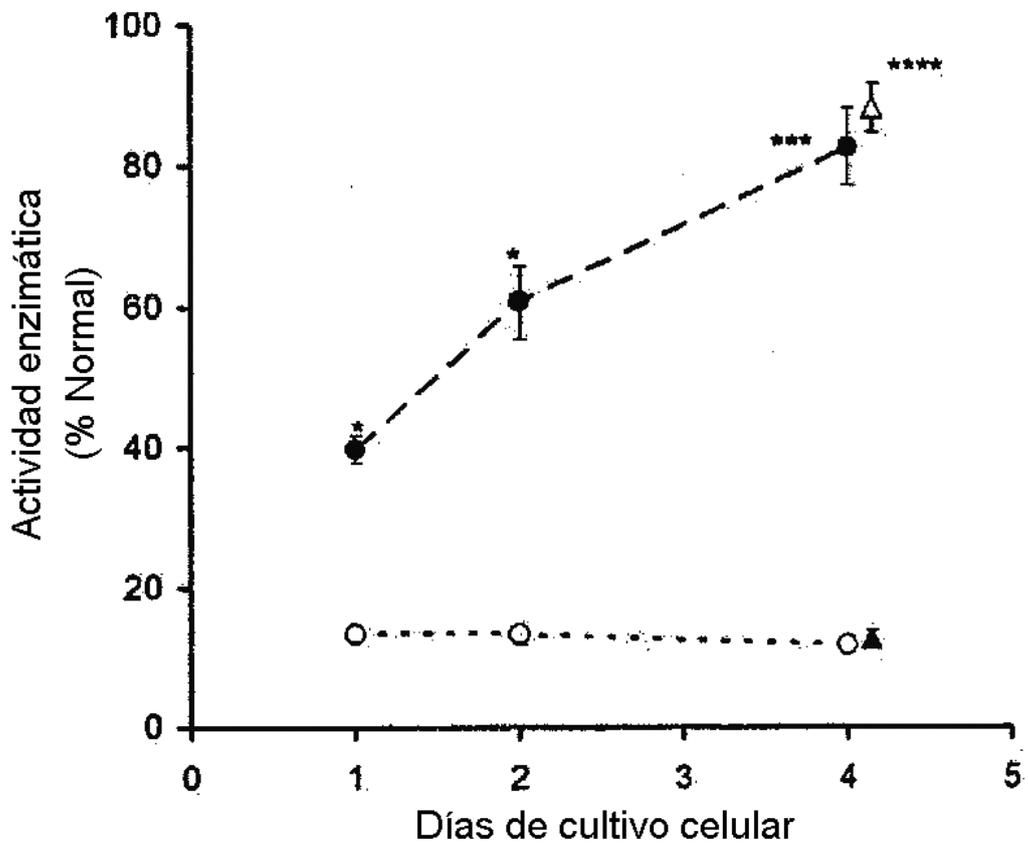


Figura 2A

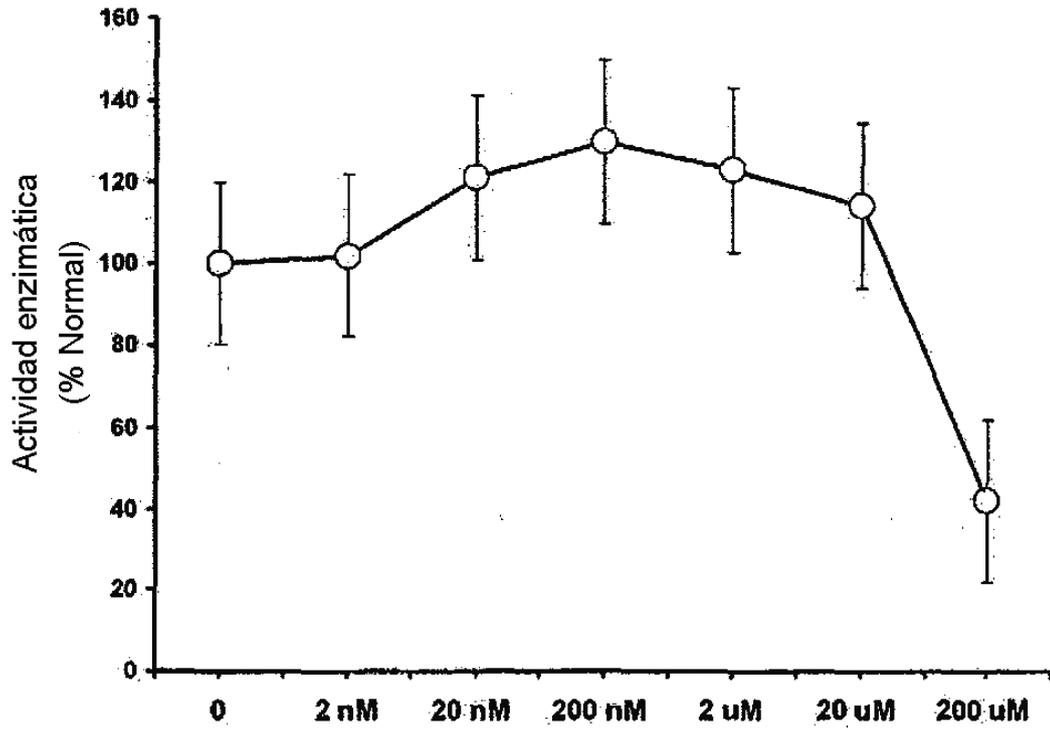


Figura 2B

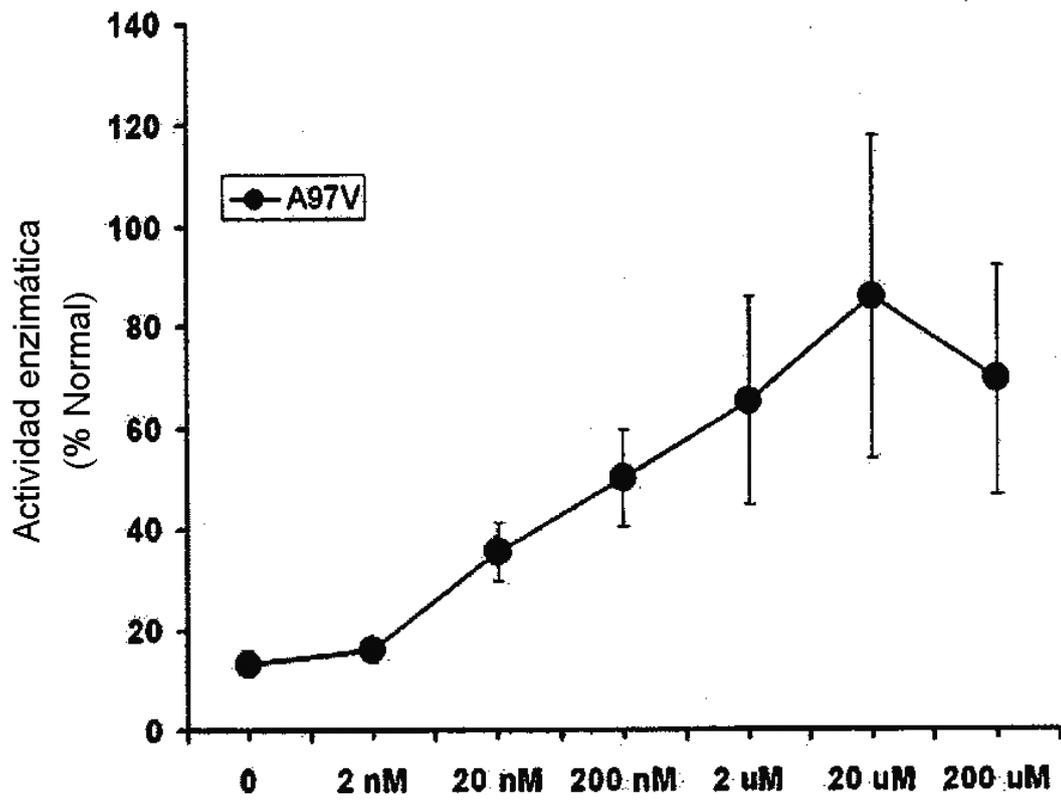


Figura 2C

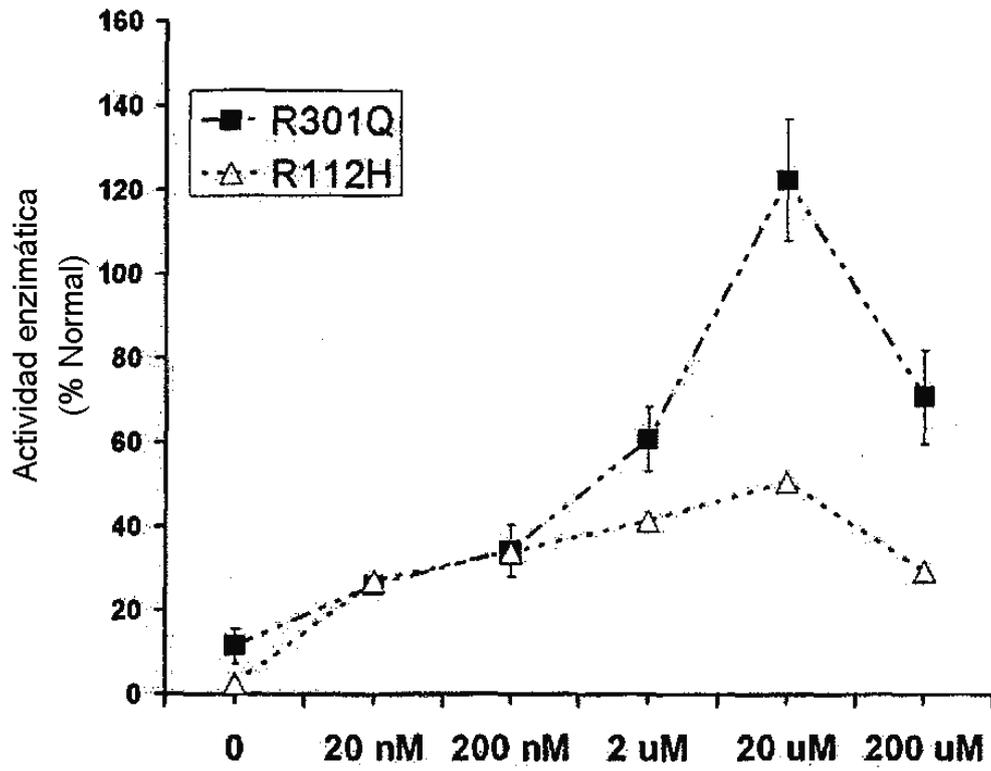


Figura 3

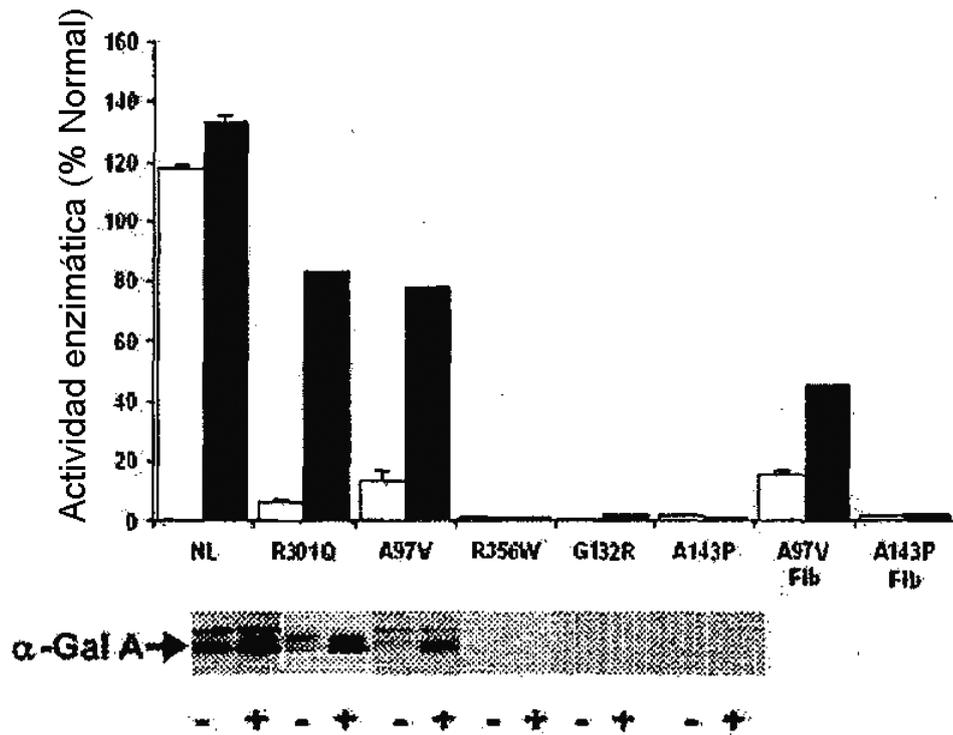


Figura 4

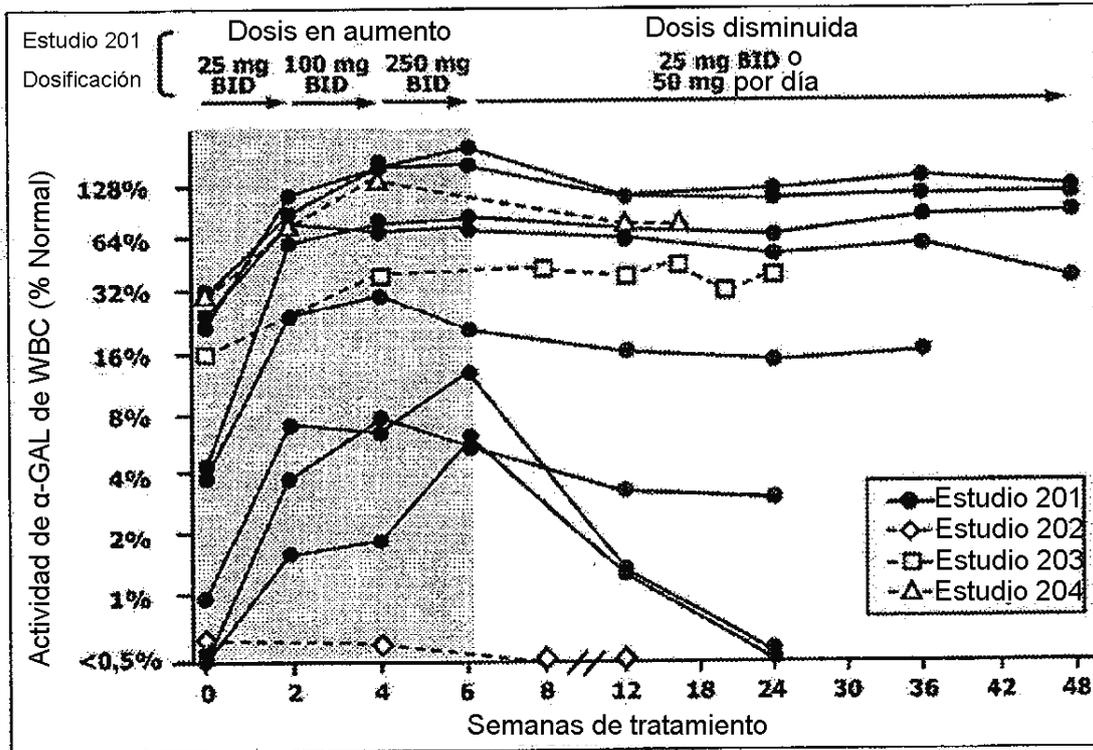


Figura 5

