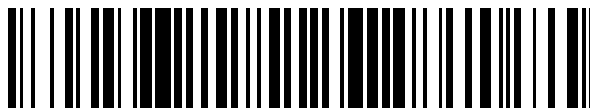


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 305**

21 Número de solicitud: 201731396

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

11.12.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

11.06.2019

Fecha de concesión:

20.11.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

27.11.2019

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN BIOMÉDICA GALICIA SUR (70.0%)
Hospital Alvaro Cunqueiro B1 Técnico planta 2
Estrada Clara Campoamor, 341
36312 VIGO (Pontevedra) ES y
UNIVERSIDADE DE VIGO (30.0%)**

72 Inventor/es:

**ORTOLANO, Saida;
BESADA PEREIRA, Pedro y
TERAN MOLDES, Carmen**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **USO DE CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL**

57 Resumen:

Uso de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal. La invención se refiere al uso de análogos de la galactosa de la fórmula (I) que tienen la capacidad de estabilizar la estructura de la enzima α -GalA, para tratar enfermedades lisosomales de depósito y, en una realización preferida, para tratar la enfermedad de Fabry. Es también objeto de la presente invención las composiciones farmacológicas que comprenden una cantidad efectiva de al menos uno de los análogos de la galactosa descritos en el presente documento para tratar enfermedades lisosomales de depósito y, en una realización preferida, para tratar la enfermedad de Fabry.

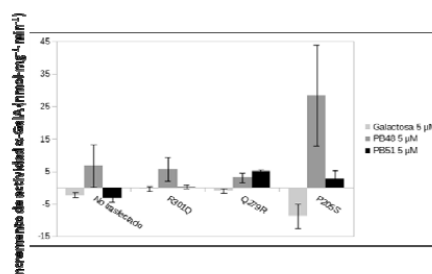


Fig. 1.A

ES 2 716 305 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

USO DE CHAPERONAS FARMACOLÓGICAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE DEPÓSITO LISOSOMAL

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 Esta invención se enmarca dentro del sector farmacéutico y químico. De forma más específica, el presente documento se refiere al nuevo uso de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Son conocidas en el estado de la técnica las enfermedades metabólicas denominadas enfermedades de almacenamiento o de depósito lisosomal. La principal causa de estas enfermedades, es que una enzima responsable de metabolizar un determinado sustrato, presenta alguna mutación en el gen que la transcribe, reduciendo e incluso anulando su actividad metabólica, ocasionando la acumulación de su sustrato.

20

Un ejemplo muy conocido de este tipo de enfermedades es la Enfermedad de Fabry (EF) que es una patología hereditaria ligada al cromosoma X y causada por un déficit de α - galactosidasa A (α -GalA), una enzima hidrolítica expresada en los lisosomas y codificada por el gen GLA (posición Xq22). Este déficit ocasiona un mal plegamiento de la enzima
25 provocando la acumulación de sustratos no metabolizados como la globotriaosilceramida (Gb3) y otros glucoesfingolípidos estructuralmente relacionados, como la globotriaosilesfingosina (LysoGb3). Dichos depósitos de sustratos no metabolizados en el endotelio vascular y en otras células de diferentes órganos provocan manifestaciones sistémicas progresivas, como por ejemplo fallo renal, cardiomiopatía e ictus juvenil, que
30 aumentan el riesgo de mortalidad precoz. Los depósitos afectan también la calidad de vida de los pacientes al ser causantes de otras manifestaciones clínicas como dolor neuropático crónico, trastornos gastrointestinales, por mencionar algunos.

Esta enfermedad se considera una enfermedad rara ya que presenta una incidencia de
35 aproximadamente 1:7000 nacidos vivos, aunque los expertos indican que el número de

potenciales afectados está en crecimiento, según se observa en los datos aportados por los estudios de cribado neonatal que se están realizando de forma rutinaria en diferentes países.

5 El tratamiento actual para la EF consiste en la terapia de sustitución enzimática (TSE), basado en la administración intravenosa de α -GalA humana recombinante (agalsidasa alfa y agalsidasa beta). La TSE facilita la eliminación de depósito del endotelio vascular y ralentiza la progresión de la enfermedad, además de mejorar algunos aspectos de la calidad de vida de los pacientes como la disminución de las crisis de dolor.

10 En este campo terapéutico existen las solicitudes de patente WO9811206A2 y US2004071686 (A1) que describen el tratamiento de una enfermedad caracterizada por deficiencia de α -GalA, y particularmente la enfermedad de Fabry, mediante la administración de alfa-galactosidasa humana A purificada que se obtiene a partir del uso de líneas
15 células genéticamente modificadas para sobreexpresar y secretar alfa-galactosidasa A recombinante humana.

No obstante, los tratamientos de sustitución enzimáticas actualmente autorizados presentan una serie de limitaciones entre las que se encuentran:

- 20 1.- Su administración es muy incómoda para los pacientes ya que es intravenosa, se debe realizar cada 2 semanas (ya que la semivida del fármaco en el organismo es baja) y tiene una duración de 40-60 min.
- 2.- No presentan una distribución homogénea en el organismo del paciente,
- 3.- No atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), siendo inactivos contra los síntomas
25 del sistema nervioso central.
- 4 Hay riesgo de inactivación del fármaco por la respuesta del sistema inmune adaptativo.
- 5.- Estos fármacos de origen biológico tienen, además, un alto coste de producción durante el proceso debido al elevado riesgo de contaminación, lo que puede dar lugar a notables pérdidas económicas.

30 También existen otras alternativas terapéuticas, como la terapia génica, in vivo o ex vivo que se encuentran en desarrollo. A estas terapias también se unen el uso de unas moléculas terapéuticas conocidas en el estado de la técnica con la definición de chaperonas farmacológicas (CFs), de las cuales algunas de dichas chaperonas farmacológicas ya están
35 aprobadas por la Agencia Europea del Medicamento (European Medicines Agency, EMA).

En este campo terapéutico el grupo de investigación del Dr. Fan sintetizó la primera CF para la terapia de la EF denominada 1-deoxigalactonojirimicina (DGJ), que es un inhibidor competitivo de α -GalA. Este iminoazúcar es el compuesto activo del Clorhidrato deoxigalactonojirimicina (Galafold®, Amicus Therapeutics), un fármaco que ha dado buenos resultados en ensayos clínicos de fase III (NCT01458119; NCT00925301, <https://clinicaltrials.gov>) y en julio de 2016 ha obtenido la aprobación de la EMA para su comercialización. Dicho estudio está relacionado con las patente EP2143420 B1 que describe el método para aumentar la actividad de la α Gal A lisosomal ($\pm$) en células de mamífero y para el tratamiento de la enfermedad de Fabry por administración de DGJ y compuestos relacionados, y la solicitud de patente EP2874648A1 que describe la administración de las composiciones farmacológicas que comprenden este fármaco. Se ha comprobado que DGJ es efectivo en bajas concentraciones para aquellas mutaciones responsables de la enfermedad que provocan un mal plegamiento de la enzima α -GalA que a su vez impide su transporte desde el retículo endoplasmático, provocando la acumulación de la enzima mutada en dicho orgánulo. Esta acumulación de α -GalA mutada causa su agregación y posterior degradación, impidiendo que dicha enzima llegue a los lisosomas que es donde debe actuar. Por lo tanto, el mecanismo de acción de este fármaco se centra en unirse a la enzima mutada para impedir su agregación dentro del retículo endoplasmático y posterior degradación, permitiendo así que la α -GalA mutada llegue a los lisosomas. No obstante, este fármaco presenta una gran limitación y es que no es eficaz para todas las mutaciones responsables de la enfermedad de Fabry, y así se puede confirmar en el listado de mutaciones que pueden tratarse con DGJ publicado por la Agencia Europea del Medicamento (ficha técnica del producto para el Galafold de la EMA (Anexo I), versión Española (WC500208434)). El hecho de que DGJ no sea eficaz para todas las mutaciones responsables de la enfermedad de Fabry, hace necesario buscar otros tratamientos capaces de tratar el mayor número posible de mutaciones del gen GLA responsable de esta enfermedad, haciendo especial hincapié en aquellas mutaciones de dicho gen responsables de fenotipos de la enfermedad de las que no se dispone de un tratamiento oral eficaz.

Existe, por lo tanto, la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que permitan el tratamiento de enfermedades lisosomales de depósito causadas por la disminución y, en algunos casos, inactividad de las enzimas implicadas en metabolizar los sustratos presentes en el interior de los lisosomas, por un incorrecto plegamiento de estas proteínas, donde dichas enfermedades no presentan todavía un tratamiento adecuado y efectivo, e incluso en

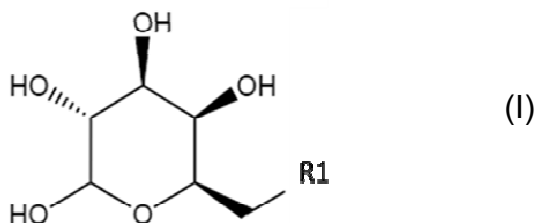
algunos casos no tienen tratamiento.

En otras palabras, sería deseable disponer de tratamientos eficaces y con un amplio espectro de acción, que se basen en aumentar la eficacia de la enzima mutada α -GalA responsables de las enfermedades lisosomales de depósito.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es el uso de análogos de la galactosa de la fórmula (I) que tienen la capacidad de estabilizar la estructura, favoreciendo el correcto plegamiento de la enzima α -galactosidasa A (α -GalA). Este hecho hace que a determinadas concentraciones, tal y como se expone en el presente documento, los análogos de la fórmula (I) estabilicen la estructura de la enzima α -galactosidasa A, incrementando la actividad enzimática de dicha enzima.

En un primer aspecto, la presente solicitud de patente hace referencia al uso los análogos de la galactosa que presentan la siguiente fórmula:



donde R1 se selecciona del grupo que consiste en una azida (N_3), un nitrilo (CN), un amino (NH_2), un ureido ($NHCONH_2$), un aminometil ($NHCH_3$), un metilamino (CH_2NH_2), un metilureido ($CH_2NHCONH_2$) y un halógeno. A su vez, el halógeno puede ser I, Br, Cl y F.

En el contexto de la presente invención, estos análogos de la galactosa de la fórmula (I) también reciben el nombre de chaperonas farmacológicas ya que estas moléculas presentan un mecanismo de acción que recuerda a las chaperonas biológicas y están diseñadas para estabilizar la estructura de determinadas proteínas diana. En este ámbito de protección, dichas chaperonas se unen a la proteína diana, estabilizando su estructura tridimensional, permitiendo así que dicha enzima mutada adquiera su plegamiento correcto y pueda realizar

su función biológica.

En el caso particular de la presente invención, los análogos de la galactosa de la fórmula (I), que en el presente documento se describen, tienen como objetivo estabilizar la α -galactosidasa A.

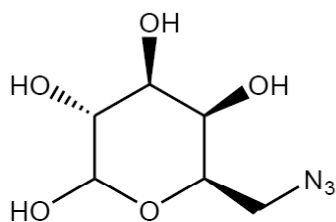
Las chaperonas farmacológicas que se describen en este documento tienen la capacidad de aumentar la actividad enzimática de la enzima α -galactosidasa A (α -GalA), donde dicha enzima comprende a su vez al menos una mutación que afecta su plegamiento.

En el contexto de la presente invención, el déficit de la enzima α -GalA puede ser provocado por al menos una mutación, de entre las más de 600 mutaciones que se conocen en el gen GLA, y que son las responsables de un mal plegamiento de la α -GalA. Sirva como ejemplos ilustrativos las mutaciones p.R301Q, p.Q279R, p.P205S, p.L131Q para demostrar la eficacia de los análogos de galactosa de la fórmula (I), pero en ningún caso como una exclusión a otras mutaciones del gen GLA que provocan la disminución o inactividad de la enzima α -GalA, por incorrecto plegamiento. En el presente documento, como se describe más adelante, cuando se administran los análogos de galactosa de la fórmula (I) en cultivos celulares que presentan alguna de las mutaciones mencionadas, se puede observar un significativo incremento en la actividad de la enzima α -GalA.

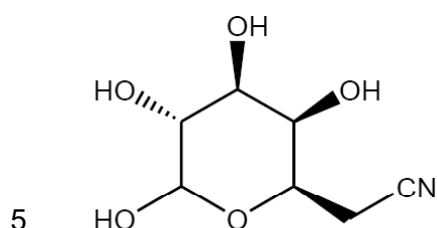
Por lo tanto, los análogos de la galactosa que se describen en el presente documento tienen la capacidad de unirse a la enzima α -GalA mutada, independientemente de que la mutación se encuentre o no en el sitio activo, y estabilizan su estructura, permitiendo así su correcto plegamiento.

Es por tanto objeto de la invención el uso médico de los análogos de la galactosa de la fórmula (I), y en una realización preferida, el uso de PB48 y PB51. Estos compuestos pueden unirse al sitio activo de la α -GalA y estabilizar su estructura para incrementar en consecuencia su actividad enzimática.

El análogo PB48 presenta la siguiente fórmula:



El análogo PB51 presenta la siguiente fórmula:



Dichos análogos PB48 y PB51 de la galactosa pueden unirse al sitio activo de la α -GalA interaccionando con residuos de ácido aspártico (D170, D231, D92, D93) y ácido glutámico (E203).

10 Cabe destacar que los análogos de la fórmula (I) que se describen en la presente invención generalmente se obtienen como una mezcla al equilibrio de los isómeros alfa y beta. Por este motivo, compuestos análogos de la galactosa de la fórmula (I), preferentemente, PB48, PB51 o combinación de ellos, son capaces de tratar enfermedades lisosomales de depósito.

15 Es por tanto, objeto de la presente invención el uso de al menos uno de los análogos de la galactosa descritos en el presente documento para tratar enfermedades lisosomales de depósito.

20 En una realización preferida, los análogos de la galactosa PB48 y/o PB51 son capaces de intervenir actuando sobre el plegamiento de la α -GalA para tratar la enfermedad de Fabry.

25 En una realización preferida, es objeto de la presente invención el uso de al menos uno de los análogos de la galactosa descritos en el presente documento para tratar la enfermedad de Fabry.

Los análogos de galactosa de fórmula (I), que se describen en este documento, se pueden sintetizar siguiendo y / o adaptando procedimientos descritos en los siguientes documentos

bibliográficos:

- N. B. Hamadi, M. Msaddek, Synthesis and reactivity of N-sugar-maleimides: an Access to novel highly substituted enantiopure pyrazolines, Tetrahedron: Asymmetry, 2012, 23, 1689-1693.
- 5 • M. Koketsu, B. Kuberan, R. J. Linhardt, Stereoselective synthesis of the α -glycoside of a KDO "C"-disaccharide, Organic Letters, 2000, 21, 3361-3363.
- J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Synthesis of 6,7-dideoxy-7-isothiocyanatoheptoses: stable fully unprotected monosaccharide isothiocyanates, Carbohydrate Research, 2000, 323, 218-225.
- 10 • R. W. Binkley, M. G. Ambrose, D. G. Hehemann, Synthesis of Deoxyhalogeno Sugars. Displacement of the (Trifluoromethanesulfonyl)oxy (Triflyl) Group by Halide Ion, Journal of Organic Chemistry, 1980, 45, 4387-4391.

En el presente documento se describen una serie de ensayos a modo ilustrativo donde se mide la actividad enzimática de α -GalA para valorar la eficacia de las moléculas objeto de la presente invención. Dicha actividad enzimática de α -GalA se ha medido en lisados celulares adaptando el método fluorimétrico descrito por Chamoles et al (Clin Chim Acta 308, 195-196). En síntesis, el ensayo se realizó en tampón fosfato-citrato 0.15M a pH 4.2, usando 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranoside 4mM (4-MU, #44039, Glycosynth) como sustrato y en presencia de N-acetil-D-galactosamina 50mM. La actividad específica de la enzima se referencia a una curva estándar de fluorescencia/concentración de sustrato.

Es también objeto de la presente invención las composiciones farmacológicas que comprenden una cantidad efectiva, comprendida en particular entre 50 mg y 200 mg cada dos días, y en una realización preferida, siendo dicha cantidad entre 145 mg y 155 mg cada dos días, y en una realización aun más preferida siendo dicha cantidad de 150 mg cada dos días, de los análogos de la galactosa de la fórmula (I) descritos en el presente documento.

En base a lo expuesto anteriormente, es objeto de la presente invención las composiciones farmacológicas anteriores para tratar enfermedades lisosomales de depósito.

Además, en una realización preferida, es también objeto de la presente invención las composiciones farmacológicas anteriores para tratar la enfermedad de Fabry.

En el contexto de la presente invención, se entiende por cantidad efectiva, la cantidad

mínima necesaria para poder observar un efecto terapéutico en los pacientes que sufren una enfermedad lisosomal de depósito.

En una realización preferida de la invención, se entiende por cantidad efectiva, la cantidad mínima necesaria para poder observar un efecto terapéutico en los pacientes que padecen enfermedad de Fabry.

Los análogos de galactosa de fórmula (I) que se describen en este documento presentan una serie de ventajas con respecto a los tratamientos convencionales para las enfermedades lisosomales de depósito:

1.- En comparación con las terapias TSE, los análogos de la galactosa descritos en el presente documento se biodistribuyen de forma homogénea ya que al tratarse de moléculas de pequeño tamaño, son capaces de atravesar membranas biológicas, pudiendo incluir la barrera hematoencefálica. Por el contrario, en la terapias de TSE, lo que se le administra al paciente es la α -GalA recombinante. Dicha enzima recombinante entra en las células transportada por el receptor Mannosio-6-fosfato, por lo que dicha enzima recombinante no alcanza los tejidos que no expresen este receptor.

2. Los análogos de la galactosa de fórmula (I) tienen la capacidad de unirse con enzimas α -GalA mutadas, responsables de la enfermedad de Fabry que no es posible tratar con las chaperonas farmacológicas actualmente en uso ampliando el espectro terapéutico de los pacientes que pueden optar a tratamiento oral. Sirva como ejemplo de los tratamientos actuales, que las células que presentan la mutación Q279R o L131Q, por mencionar algunos, presentan un incremento en la actividad de la α -GalA mutada, cuando son tratadas con los análogos de galactosa de la fórmula (I), mientras que dicha actividad enzimática no presenta el mismo incremento o incluso actividad cuando son tratadas con las chaperonas farmacológicas que están aprobadas y se usan actualmente en la clínica.

3.- Coste de producción mucho más bajo, ya que al ser las chaperonas farmacológicas unos compuestos químicos, sus costes de producción y riesgo de contaminación, con sus consecuentes pérdidas económicas, son significativamente más bajos que los costes de producción de los tratamientos de sustitución enzimática, cuyos fármacos son biológicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1.A y 1.B. Valoración de los incrementos de la actividad enzimática de α -GalA en una línea celular humana (293T) transfectada con plásmidos que expresan diferentes

mutantes de la α -GalA: p.R301Q, p.Q279R, p.P205S, tratadas con galactosa, PB48 y PB51. En la figura 1.A, se representa el incremento de la actividad enzimática de α -GalA para los 3 tratamientos indicados a una concentración de 5 μ M. En el caso de la figura 1.B, los 3 tratamientos empleados están a una concentración de 10 μ M. En ambas figuras, se observan 3 columnas para cada una de las mutaciones, que representan los tratamientos a los que ha sido sometida la línea celular humana (293T) transfectada con plásmidos que expresan diferentes mutantes de la α -GalA. La columna de la izquierda (la más cercana al eje de coordenadas vertical), representa la línea celular tratada con galactosa. La columna central representa la línea celular tratada con PB48. En la columna de la derecha (la más alejada al eje de coordenadas vertical) representa la línea celular tratada con PB51. Los incrementos de actividad han sido calculados sustrayendo a cada valor el valor de actividad obtenido para el no tratado transfectado con el plásmido correspondiente.

Figura 2. Valoración de la actividad enzimática de α -GalA en células extraídas de tres pacientes hemicigotos con Enfermedad de Fabry que expresan la mutación p.Q279R de la α -GalA. Dichas células se trataron con PB48 a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y 10 μ M y con DGJ a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M y 10 μ M.

Figura 3. Valoración de la actividad enzimática de α -GalA en células extraídas de un paciente hemicigoto que expresa la mutación p.Q279R de la α -GalA. Dichas células se trataron con PB51 a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y 10 μ M y con DGJ a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M y 10 μ M.

Figura 4. Valoración de la actividad enzimática de α -GalA en paciente hemicigota con la mutación p.Q279R, una paciente heterocigota con la mutación p.Q279R e individuos sanos, tratados con PB48 a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, PB51 a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, DGJ a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, y galactosa a una concentración de 5 μ M. Para cada uno de los tratamientos se observan 3 columnas, que representan los grupos celulares que han sido sometidos a cada uno de los tratamientos. La columna de la izquierda (la más cercana al eje de coordenadas vertical), representa los leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de un paciente hemicigoto para la mutación Q279R (grupo de células hemicigoto). La columna central representa los leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de una paciente heterocigota. En la columna de la derecha (la más alejada al eje de coordenadas vertical) representa los leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de dos voluntarios sanos, un varón y una mujer (control). En

el eje vertical se representa la actividad de α -GalA, normalizada al control no tratado.

Figura.5. Valoración de la actividad enzimática de α -GalA con la mutación p.L131Q en células extraídas (de un paciente hemicigoto y una paciente heterocigota) tratadas con PB48 a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y 10 μ M o con DGJ a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M y 10 μ M. Para cada uno de los tratamientos se observan 2 columnas, que representan los grupos celulares que han sido sometidos a cada uno de los tratamientos. La columna de la izquierda (la más cercana al eje de coordenadas vertical), representa los leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de un paciente hemicigoto para la mutación L131Q. En la columna de la derecha (la más alejada al eje de coordenadas vertical) representa los leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de una paciente heterocigota para la mutación L131Q.

EJEMPLOS

A continuación procedemos a exponer, a modo de ejemplo y sin carácter limitante, ciertos resultados de ensayos de eficacia de la invención donde se valoró la actividad enzimática de α -GalA después del tratamiento con chaperonas farmacológicas de fórmula (I) descritas en el presente documento.

Experimento 1:

Se testaron los análogos PB48 y PB51 en concentraciones de 5 y 10 μ M, en comparación con la galactosa, en una línea celular humana (293T) transfectada con distintos plásmidos que expresan diferentes mutantes de la α -GalA: p.R301Q, p.Q279R, p.P205S.

Como se puede observar en la figuras 1.A y 1.B, PB48 y PB51 producen un incremento positivo en la actividad enzimática de la distintas α -GalA mutantes, destacando el incremento de actividad de dicha enzima α -GalA en las células tratadas con PB48.

Experimento 2:

Se hicieron estudios similares en leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de 3 pacientes hemicigotos para la mutación p.Q279R. En este estudio se valoró la actividad de la α -GalA en células tratadas con PB48 a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y 10 μ M y con DGJ a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M y 10 μ M. Tal y como se puede observar en la figura 2, el PB48 incrementa significativamente la actividad de α -Gal A a concentraciones de

2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y es más activo que el DGJ en células de pacientes hemicigotos para la mutación p.Q297R.

Por otro lado, se valoró también la actividad de la α -GalA en células de un paciente hemicigoto con la mutación p.Q279R tratadas con PB51 a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y 10 μ M y con DGJ a concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M y 10 μ M, véase figura 3.

Tal y como se puede observar en la figura 3, el PB51 presenta un incremento de actividad de la enzima mayor que el DGJ. El tratamiento con PB51 a la concentración de 2,5 μ M determina además un incremento de actividad con respecto a las células no tratadas.

Por lo tanto, estos resultados demuestran que los análogos que se describen en el presente documento, y en particular PB48, son una alternativa muy adecuada para pacientes que padecen la enfermedad de Fabry, y que no pueden ser tratados con DGJ, ya que un tratamiento basado en DGJ no presenta el incremento necesario de la actividad de α -GalA mutada para tratar la enfermedad, cuando la mutación del gen GLA es Q279R.

Experimento 3:

Se realizaron estudios sobre la actividad de la α -GalA en leucocitos extraídos de sangre periférica procedente de un paciente hemicigoto para la mutación Q279R (grupo de células hemicigoto), una paciente heterocigota y dos voluntarios sanos (un varón y una mujer, indicado como control). En este estudio se valoró la actividad de la α -GalA en células tratadas con PB48 a concentraciones de 5 μ M, y 10 μ M, otro grupo celular tratado con PB51 a concentraciones de 5 μ M, y 10 μ M y con DGJ a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M. Con el fin de comparar los resultados obtenidos en los tratamientos con los análogos de galactosa que se describen en el presente documento, se hicieron valoraciones sobre la actividad de la α -GalA para el mismo grupo de células, que fueron tratadas con galactosa a concentraciones de 5 μ M, y un grupo celular sin tratamiento.

Tal y como se puede comprobar en la figura 4, el PB48 provoca a la concentración de 5 μ M un incremento mayor de actividad enzimática con respecto al DGJ en las células de paciente hemicigoto y un incremento significativo de actividad con respecto a las células no tratadas. Los valores de la actividad de α -GalA han sido normalizados al control no tratado, es decir, el valor de actividad enzimática de α -GalA de las muestras que han sido sometidas a cada uno de los tratamientos farmacológicos (PB48, DGJ o Gal) ha sido dividido por el valor de

actividad de α -GalA obtenido para la respectiva muestra control no tratada (valor de actividad de α -GalA obtenido para las células de cada paciente que no han recibido tratamiento).

- 5 Por otra parte se ha observado que el DGJ (5 μ M) es más efectivo que el PB48 (5 μ M) como estabilizador de la proteína cuando se prueba en leucocitos de la paciente heterocigota LSD21. Esto lleva a la conclusión de que DGJ (5 μ M) puede ser una chaperona más eficiente para la α -Gal A *forma nativa (wild type)*, mientras que el PB48 a la misma concentración es más eficiente que el DGJ cuando está presente exclusivamente la forma mutada de la
10 enzima.

Los datos obtenidos en controles sanos con la misma concentración (5 μ M) avalan esta conclusión.

15 Experimento 4:

Se testaron los compuestos PB48 y DGJ en células de un paciente hemicigoto y una paciente heterocigota con la mutación p.L131Q de la α -GalA y que también expresan el alelo en *forma nativa (wild type)* de la enzima, que produce el fenotipo clásico de la enfermedad de Fabry.

- 20 Tal y como se observa en la figura 5, la actividad enzimática de la α -GalA es significativamente superior en células del paciente hemicigoto que han sido tratadas con PB48 a la concentración de 5 μ M en comparación con las células no tratada y en células que han sido tratadas con DGJ. Por otro lado, se puede comprobar que la actividad
25 enzimática de la α -GalA es superior en células de la paciente heterocigota tratadas con DGJ.

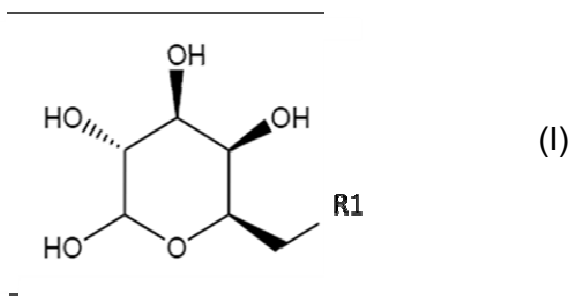
Experimento 5:

- Se testaron los análogos PB48, PB51 en concentraciones de 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M,
30 en comparación con DGJ y galactosa, en una línea celular humana (293T) no transfectada-

REIVINDICACIONES

1.- Uso de un análogo de galactosa representado por la siguiente fórmula:

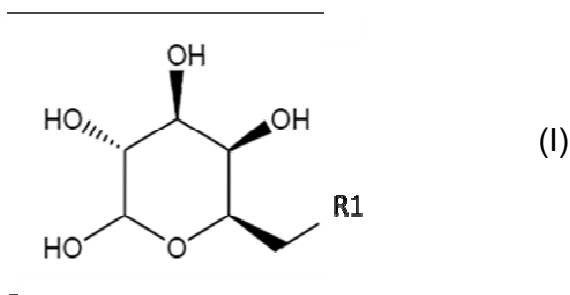
5



donde R1 se selecciona del grupo que consiste en N₃, CN, NH₂, NHCONH₂, NHCH₃, CH₂NH₂, CH₂NHCONH₂ y halógeno, para estabilizar la estructura de la enzima α-galactosidasa A.

10

2.- Análogo de galactosa representado por la siguiente fórmula:



donde R1 se selecciona del grupo que consiste en N₃, CN, NH₂, NHCONH₂, NHCH₃, CH₂NH₂, CH₂NHCONH₂ y halógeno, para su uso como medicamento.

15

3.- Análogo de galactosa según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento de enfermedades de deposito lisosomal.

20

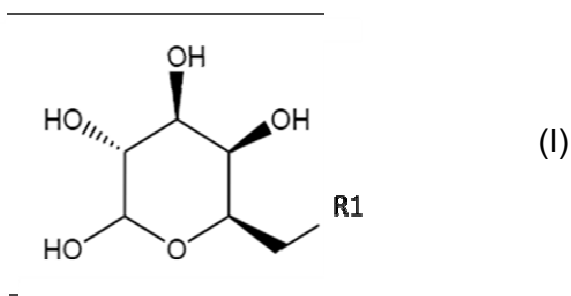
4.- Análogo de galactosa según la reivindicación 2, donde la enzima es α-galactosidasa A para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

5.- Análogo de galactosa según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, donde R1 se

selecciona del grupo que consiste en N_3 y CN.

6.- Composición farmacológica que comprende al menos un análogo de galactosa representado por la siguiente fórmula:

5



donde R1 se selecciona del grupo que consiste en N_3 , CN, NH_2 , $NHCONH_2$, $NHCH_3$, CH_2NH_2 , $CH_2NHCONH_2$ y halógeno.

10 7.- Composición farmacológica según la reivindicación 6, para el tratamiento de enfermedades de depósito lisosomal.

8.- Composición farmacológica según la reivindicación 7, donde la enzima es α -galactosidasa A para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

15

9.- Composición farmacológica según una cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, donde R1 se selecciona del grupo que consiste en N_3 y CN.

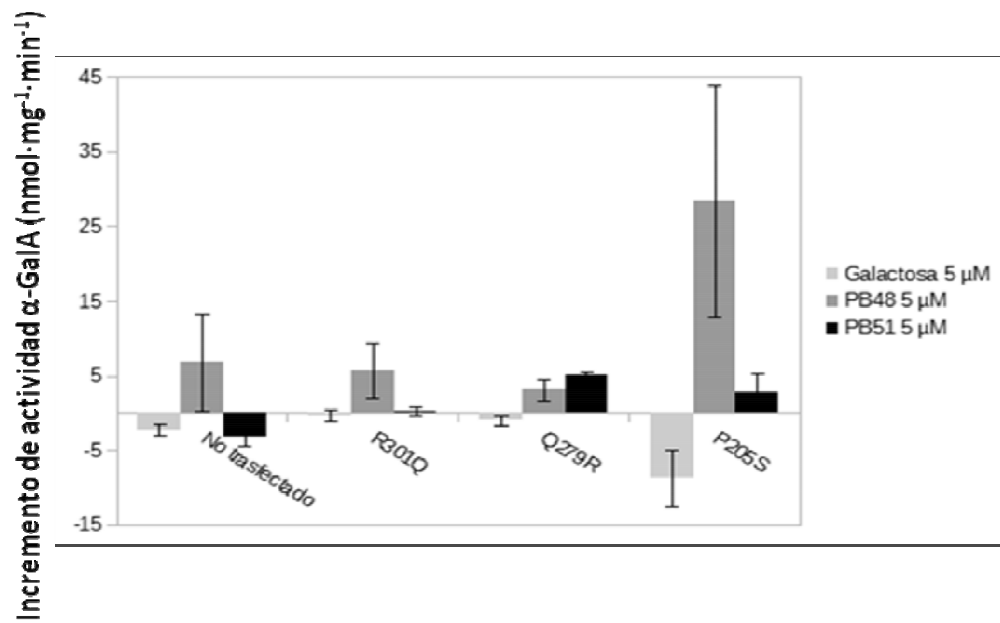


Fig. 1.A

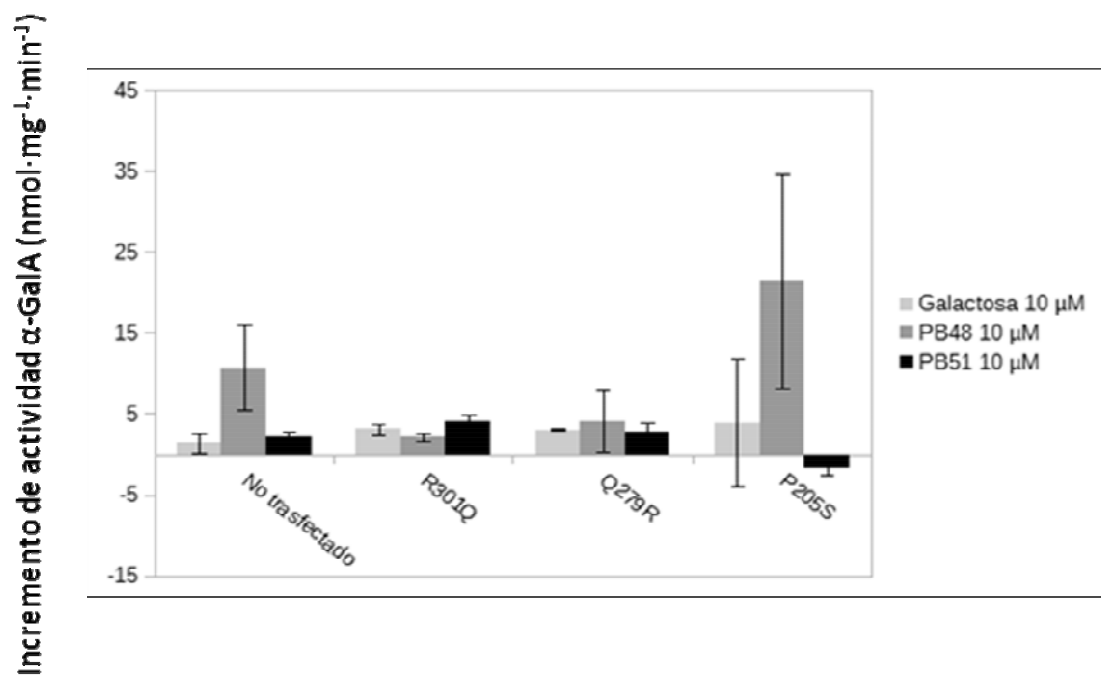


Fig. 1.B

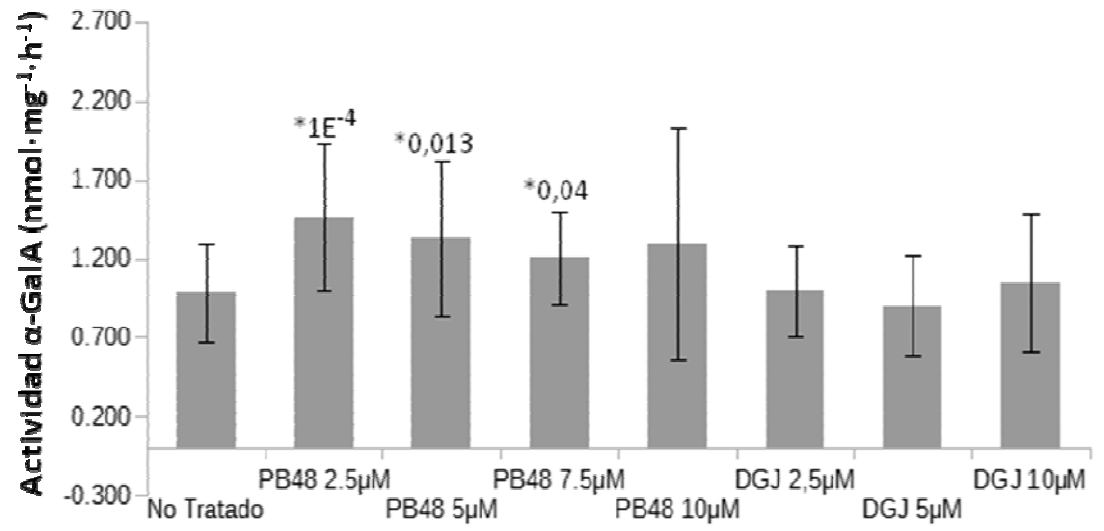


Figura 2

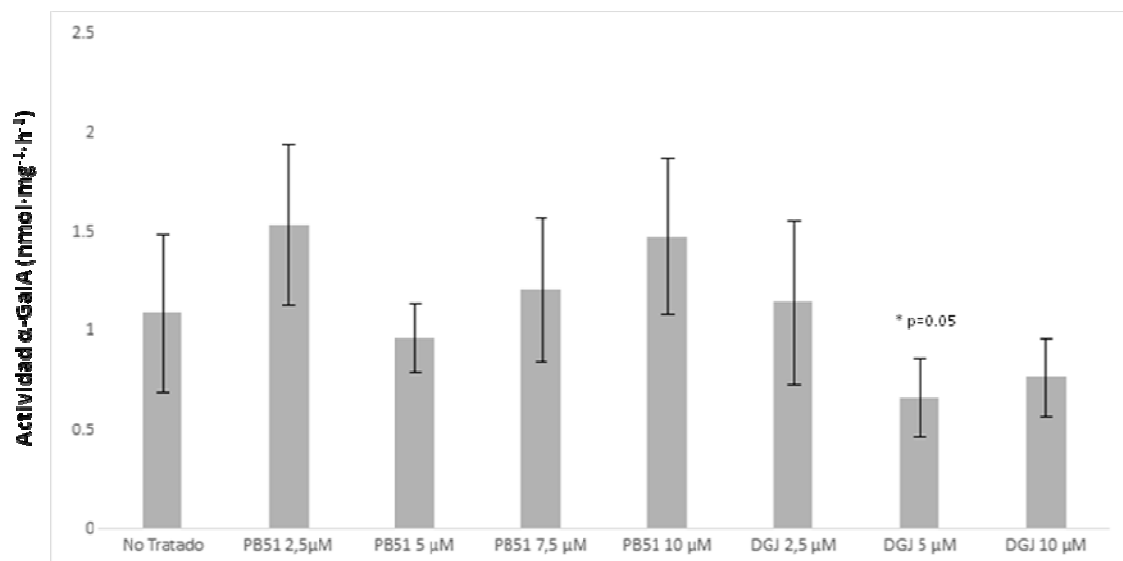


Figura 3

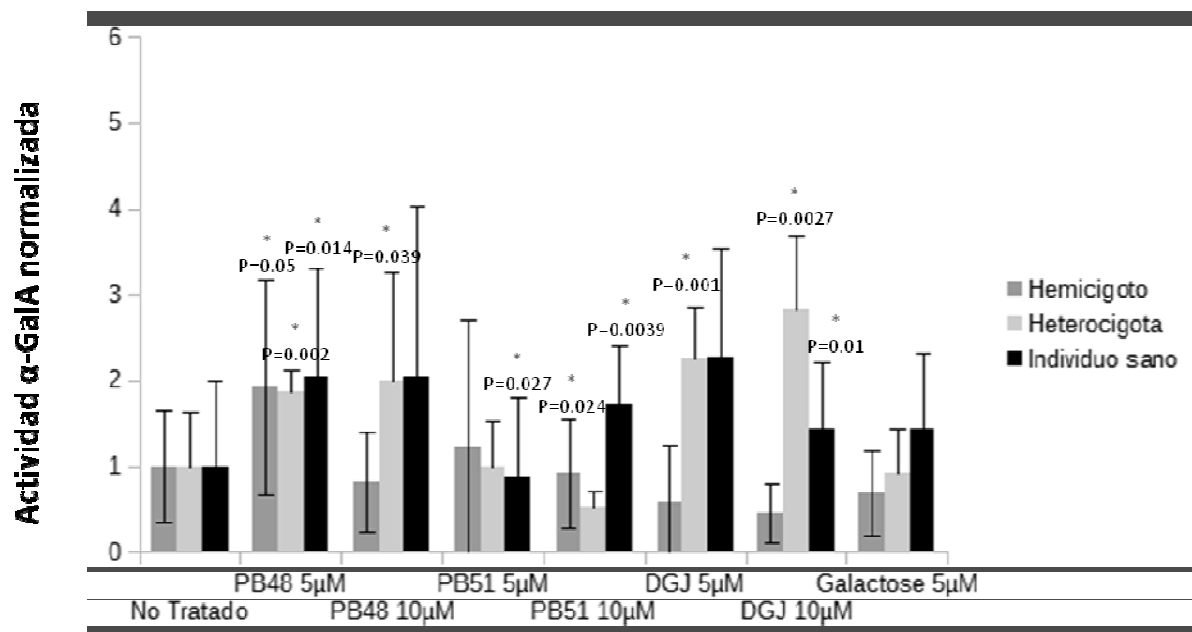


Figura 4

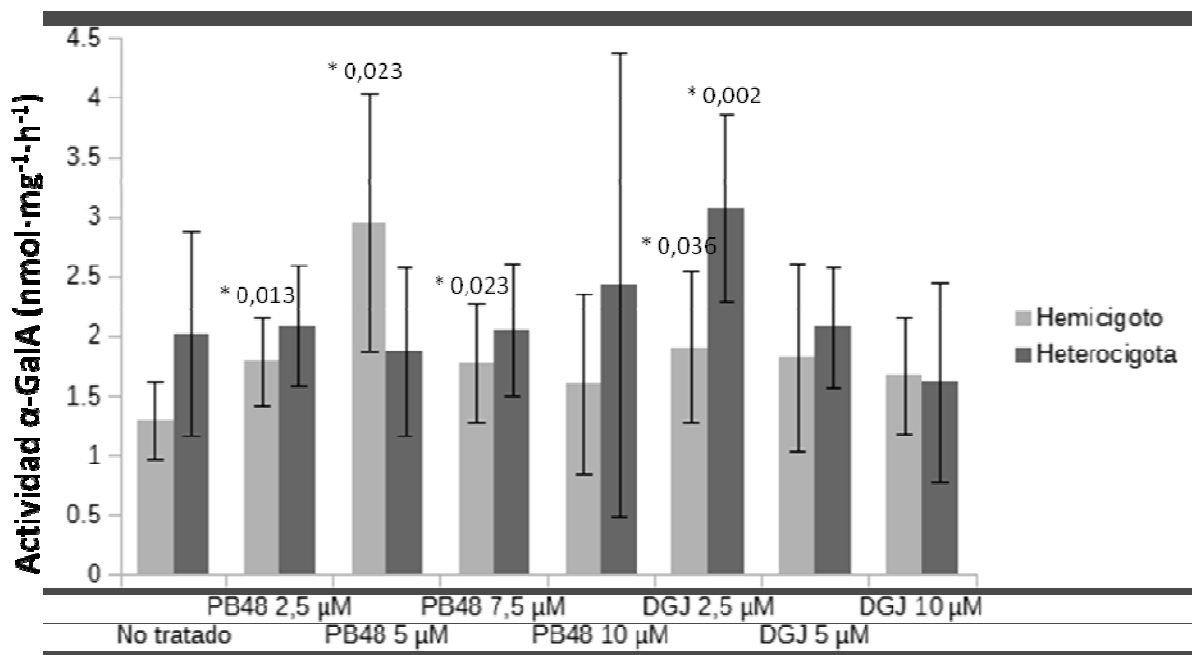


Figura 5