

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 361**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2012 E 17206796 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020 EP 3318881**

54 Título: **Método para llevar a cabo el seguimiento de la enfermedad de Gaucher**

30 Prioridad:

**06.06.2011 EP 11004597**

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

**20.04.2021**

73 Titular/es:

**CENTOGENE GMBH (100.0%)  
Am Strande 7  
18055 Rostock, DE**

72 Inventor/es:

**ROLFS, ARNDT y  
MASCHER, HERMANN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 820 361 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**

Método para llevar a cabo el seguimiento de la enfermedad de Gaucher

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para determinar la evolución de la enfermedad de Gaucher en un sujeto.

**5 Antecedentes de la invención**

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico, también denominadas en esta memoria como trastornos de almacenamiento lisosómico o TAL, son un grupo de trastornos metabólicos hereditarios raros que son el resultado de defectos en la función lisosómica. Los TAL se producen cuando un orgánulo específico en las células del cuerpo – el lisosoma – funciona mal. Algunas de las enfermedades de almacenamiento lisosómico más importantes son la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry.

Los TAL están provocados por disfunción lisosómica normalmente como consecuencia de la deficiencia de una única enzima necesaria para el metabolismo de los lípidos, las glicoproteínas o los denominados mucopolisacáridos. De forma individual, los TAL se dan con frecuencias de aproximadamente 1:10.000 a 1:250.000, sin embargo, como grupo la incidencia es aproximadamente 1:5.000. La mayoría de estos trastornos son trastornos autosómicos hereditarios recesivos; sin embargo, unos pocos, como la enfermedad de Fabry y el síndrome de Hunter (MPS II) son trastornos hereditarios ligados al cromosoma X.

Como sucede con otras enfermedades genéticas, los individuos típicamente heredan las enfermedades de almacenamiento lisosómico de sus padres. Aunque cada trastorno es el resultado de diferentes mutaciones genéticas que se traducen en una deficiencia en la actividad enzimática, todos comparten una característica bioquímica común – casi todos los trastornos lisosómicos se originan por la acumulación anormal de sustancias dentro del lisosoma.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico afectan principalmente a niños y a menudo mueren a una edad temprana e impredecible, muchos a los pocos meses o años del nacimiento. Muchos otros niños mueren de esta enfermedad después de años de padecer diversos síntomas de su trastorno particular.

Los síntomas de la enfermedad de almacenamiento lisosómico varían, dependiendo del trastorno particular y otras variables como la edad de inicio, y pueden ser de suaves a graves. Pueden incluir retraso del desarrollo, trastornos del movimiento, convulsiones, demencia, sordera y/o ceguera. Algunas personas con enfermedad de almacenamiento lisosómico tienen hígado agrandado (hepatomegalia) y bazo agrandado (esplenomegalia), problemas pulmonares y cardíacos, y huesos que se desarrollan de forma anormal.

No hay curas etiológicas para las enfermedades de almacenamiento lisosómico y el tratamiento es principalmente sintomático, aunque se han usado el trasplante de médula ósea y la terapia enzimática sustitutiva (TSE) para algunas indicaciones con buen resultado. Además, se están realizando trasplantes de sangre del cordón umbilical en centros especializados para cierto número de estas enfermedades. Además, se está evaluando actualmente la terapia de reducción de sustrato (TRS), un método usado para disminuir la acumulación del material de almacenamiento, para algunas de estas enfermedades. Además, para algunos de estos trastornos, se está examinando la terapia con chaperonaa, una técnica usada para estabilizar las enzimas defectuosas producidas por los pacientes, . La terapia génica constituye una opción más para el tratamiento de estas enfermedades.

Hasta la fecha, el diagnóstico definitivo de la enfermedad de Gaucher solo puede hacerse a través de pruebas biomédicas que miden de forma directa el defecto de la enzima beta-glucosidasa junto con la confirmación genética. Ya que numerosas mutaciones diferentes pueden ser la causa de una enfermedad de almacenamiento lisosómico particular, la secuenciación de todo el gen de la beta-glucosidasa se aplica en la enfermedad de Gaucher para confirmar el diagnóstico.

A pesar de los intentos de aplicar métodos diagnósticos basados en anomalías bioquímicas asociadas tales como altos niveles de fosfatasa alcalina, enzima convertidora de angiotensina (ECA) e inmunoglobulina, o, en caso de la enfermedad de Gaucher, por análisis celular que muestra el citoplasma en forma de “papel arrugado” y los macrófagos cargados de glicolípidos, hay una necesidad no satisfecha de un ensayo bioquímico sencillo que muestre la detección altamente específica y altamente sensible de dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico en una fase temprana, que haga el seguimiento de la progresión de la enfermedad y que haga un seguimiento precoz de la eficacia de las terapias aplicadas.

Por lo tanto, la identificación de biomarcadores para la detección precoz y diagnóstico de la enfermedad de Gaucher es una gran promesa para mejorar el pronóstico clínico de los pacientes. Es especialmente importante para pacientes con síntomas vagos o asintomáticos o para detectar pacientes que no responden a una terapia.

Un biomarcador debería ser técnicamente viable en muchas manos, fácil de medir; útil, con una magnitud relativa consistente entre los experimentales/pacientes y los controles, o tratados y no tratados; fiable, preciso y seguro clínicamente, y clasificable como fuertemente predictivo o pronosticable.

En la enfermedad de Gaucher se encontró que algunas enzimas lisosómicas, usadas como biomarcadores indirectos, estaban elevadas, incluyendo la fosfatasa ácida resistente al tartrato, hexosaminidasa y una quitinasa humana, quitotriosidasa. Por consiguiente, hay intentos de monitorizar la reducción de las células de almacenamiento en tejidos mediante la medida de dichos marcadores suplenes de las células de Gaucher como quitotriosidasa y CCL18 (C.E. Hollak et al., Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, J. Clin. Invest. 93 (1994) 1288-1292; R.G. Boot et al., Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, Blood 103 (2004) 33-39). Sin embargo, junto a otras desventajas en el uso de quitotriosidasa como un biomarcador para la enfermedad de Gaucher, dicha enzima se acumula independientemente de una relación directa con la patología de la enfermedad de Gaucher. Además, hasta el 35% de las etnicidades dadas demuestran un defecto de la codificación genética para la quitotriosidasa que da por resultado una actividad de quitotriosidasa reducida de forma artificial o no medible.

El uso de moléculas de almacenamiento primario como biomarcador se evaluó para la glucosilceramida (Gb1) en plasma de los pacientes con enfermedad de Gaucher y se comparó con el nivel de Gb1 en individuos sanos (Groener et al. Biochim Biophys Acta. 2008 En-Feb; 1781(1-2):72-8. Epub 5 de diciembre de 2007; Plasma glucosylceramide and ceramide in type 1 Gaucher disease patients: correlations with disease severity and response to therapeutic intervention; Groener JE et al.). Sin embargo, aunque la Gb1 medida en dicho estudio estaba aumentada en el plasma de dichos pacientes, dicho aumento de Gb1 no fue destacado y por tanto la especificidad y la sensibilidad del método fueron bajas mostrando que la Gb1 no es aplicable como un biomarcador para la enfermedad de Gaucher.

Ya en 1989 Rosengren et al. (Lysosulfatide (galactosylsphingosine-3-O-sulfate) from metachromatic leukodystrophy and normal human brain, Rosengren B, Fredman P, Månsson JE, Svennerholm L.; J Neurochem. Abril de 1989; 52(4):1035-41) mostró que en las lipodosis no solo el catabolismo del esfingolípido principal sino también de su liso-compuesto está afectado. Sin embargo, dicho estudio concluyó que los liso-compuestos no juegan un papel clave en los mecanismos patogénicos en las esfingolipodosis. Por consiguiente, dichos liso-compuestos no serían biomarcadores adecuados para el diagnóstico de las esfingolipodosis tales como la enfermedad de Gaucher.

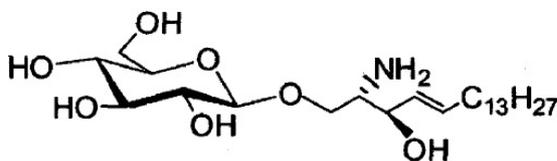
Veliodi A et al. (J. Inherit. Metabl. Dis. 28 (2005) 585-592) dan a conocer la evaluación de tres marcadores bioquímicos en el seguimiento de la enfermedad de Gaucher.

Es importante mencionar que hasta hoy no está disponible el uso de un biomarcador altamente específico y altamente sensible ni un método para el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher aparte de los métodos descritos anteriormente, que muestran un límite de detección, sensibilidad y/o especificidad insatisfactorios, y por tanto está probado que no son adecuados para su aplicación clínica.

A la luz de lo anterior, el problema que subyace en la presente invención es proporcionar un método para determinar la evolución de la enfermedad de Gaucher en un sujeto.

Estos y otros problemas se resuelven mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las realizaciones preferidas pueden extraerse de las reivindicaciones dependientes.

Más específicamente, el problema subyacente a la presente invención se resuelve por un método para determinar la evolución de la enfermedad de Gaucher en un sujeto que comprende la etapa de determinar en varios puntos de tiempo un nivel de un biomarcador presente en una muestra del sujeto, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de sangre completa y una muestra de sangre completa recogida sobre una tarjeta de filtro de sangre seca, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre de fórmula (I)



(I),

y donde el nivel del biomarcador es indicativo de la gravedad de la enfermedad en el sujeto.

En una realización, el sujeto previamente ha sido tratado o diagnosticado de enfermedad de Gaucher.

En una realización, el nivel del biomarcador presente en la muestra del sujeto se determina periódicamente.

En una realización, el nivel del biomarcador presente en la muestra del sujeto se determina cada 3 meses o cada 6 meses.

En una realización, la liso-Gb1 libre es liso-Gb1 como está presente en el sujeto y no el resultado de manipular la muestra del sujeto.

En una realización, la muestra de sangre es una muestra de sangre completa o una muestra de filtro con sangre seca.

- En una realización, el biomarcador se detecta por medio de inmunoensayo, análisis espectrométrico de masas, matriz de biochip, ácidos nucleicos funcionales y/o un derivado fluorescente de liso-Gb1 libre.
- En una realización, el biomarcador se detecta por medio de análisis espectrométrico de masas.
- 5 En una realización, el análisis espectrométrico de masas se selecciona del grupo que consiste en SELDI, MALDI, MALDI-Q TOF, MS/MS, TOF-TOF y ESI-O-TOF.
- En una realización, el análisis espectrométrico de masas usa MS/MS.
- En una realización, el método comprende además precipitación de proteína y/o HPLC.
- En una realización, el método comprende además precipitación de proteína, HPLC y MS/MS.
- En una realización, el sujeto es un ser humano.
- 10 En una realización, la etapa de determinar el biomarcador en una muestra comprende someter la muestra a una etapa de precipitación de proteína, precipitar proteína de la muestra, en donde precipitar proteína de la muestra proporciona un sobrenadante de la muestra, someter al sobrenadante de la muestra a HPLC y MS/MS y determinar la cantidad del biomarcador y/o el al menos un biomarcador adicional que está/están presente(s) en el sobrenadante de la muestra.
- 15 En una realización, la enfermedad de Gaucher se selecciona del grupo que comprende el tipo I no neuronopático, el tipo II neuronopático crónico y el tipo III neuronopático agudo.
- En una realización, el método tiene un límite de detección de 0,2 ng/ml.
- En una realización, el sujeto se ha tratado o diagnosticado anteriormente de enfermedad de Gaucher.
- En una realización, el sujeto no se ha tratado anteriormente o en donde el sujeto no se ha diagnosticado anteriormente para la enfermedad de Gaucher.
- 20 En una realización, el método comprende además una etapa de
- b) decidir si aplicar, mantener, reducir, elevar o no aplicar una terapia basada en el diagnóstico de si el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher.
- En una realización, el método comprende además una etapa de
- 25 c) detectar el biomarcador en una muestra del sujeto se haya aplicado, mantenido, reducido, elevado o no aplicado una terapia en una etapa de b).
- En una realización, el método comprende además una etapa de
- d) determinar un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto después de aplicar, mantener, reducir, elevar o no aplicar una terapia en una etapa de b).
- En una realización, el método comprende además las etapas de
- 30 e) determinar si el nivel del biomarcador determinado en la etapa a) es menor que el nivel del biomarcador determinado en la etapa d);
- En una realización, el método comprende además la etapa de
- f) decidir si aplicar, mantener, reducir, elevar o no aplicar una terapia basada en la etapa de e).
- En una realización, el método comprende además detectar al menos un biomarcador adicional en la muestra del sujeto.
- 35 En una realización, el método comprende además determinar el nivel del al menos un biomarcador adicional en la muestra del sujeto.
- En una realización, el al menos un biomarcador adicional se selecciona del grupo que comprende quitotriosidasa y CCL18.
- En una realización, el al menos un biomarcador adicional es quitotriosidasa.
- En una realización, el al menos un biomarcador adicional es CCL18.
- 40 En una realización, el método comprende además detectar quitotriosidasa y CCL18.
- En una realización, el biomarcador y/o el al menos un biomarcador adicional se detecta por medio de inmunoensayo, análisis espectrométrico de masas, matriz de biochip, ácidos nucleicos funcionales y/o un derivado fluorescente de liso-Gb1 libre.

Los autores de esta invención han encontrado sorprendentemente que la liso-Gb1 libre constituye un biomarcador que permite un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto, más específicamente diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto con alta especificidad y sensibilidad usando dicha liso-Gb1 libre como el biomarcador.

5 Los autores de esta invención también han encontrado sorprendentemente que la liso-Gb1 libre, que puede detectarse por los métodos de la presente invención, está circulando en la sangre de un sujeto en una concentración de aproximadamente 1/1000 de Gb1 total. Además, los autores de esta invención han encontrado sorprendentemente que, a diferencia de la Gb1 total, la liso-Gb1 libre que está presente en la sangre de un sujeto es útil en un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto que comprende una etapa de detección de un biomarcador en  
10 una muestra del sujeto, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre. Los autores de esta invención también han encontrado sorprendentemente que el nivel de liso-Gb1 libre determinado en la muestra de un sujeto por los métodos de la presente invención permite diagnosticar la enfermedad de Gaucher con alta sensibilidad y alta especificidad.

En la medida de lo posible la presente invención se aleja de las enseñanzas del estado de la técnica en que el método de la presente invención comprende determinar el nivel de un liso-compuesto usando dicho liso-compuesto como un biomarcador para el diagnóstico de unas esfingolipidosis. Más específicamente, los autores de esta invención han encontrado sorprendentemente que determinar el nivel de liso-Gb1 libre en una muestra de un sujeto permite el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher con alta sensibilidad y alta especificidad.  
15

También es el mérito de los autores de esta invención el haber reconocido que una fracción de Gb1 total que se acumula en la enfermedad de Gaucher, está presente como una molécula en una forma liso libre de la misma, liso-Gb1 libre, y está circulando en la sangre de un sujeto en dicha forma liso libre en vez de Gb1.  
20

El término “trastorno de almacenamiento lisosómico”, también referido como “enfermedad de almacenamiento lisosómico” o “TAL”, como se usa en esta memoria, preferiblemente se refiere a las enfermedades genéticas y trastornos metabólicos que resultan de defectos en la función lisosómica. Los trastornos de almacenamiento lisosómico están provocados por disfunción lisosómica normalmente como una consecuencia de la deficiencia de una única enzima necesaria para el metabolismo de lípidos, glicoproteínas o los denominados mucopolisacáridos. Como otras enfermedades genéticas, los individuos heredan enfermedades de almacenamiento lisosómico de sus padres. Aunque cada trastorno resulta de diferentes mutaciones genéticas que se traducen en una deficiencia en la actividad enzimática, todos comparten una característica bioquímica común – todos los trastornos lisosómicos se originan a partir de una acumulación anormal de sustancias dentro del lisosoma.  
25

El término “enfermedad de Gaucher” como se usa en esta memoria, se refiere preferiblemente a una enfermedad de almacenamiento lisosómico (TAL), más específicamente una esfingolipidosis que se caracteriza por la deposición de glucocerebrósido en células del sistema macrófago-monocito. La enfermedad de Gaucher es la más común de las enfermedades de almacenamiento lisosómico (James, William D.; Berger, Timothy G.; et al. (2006). *Andrews’s Diseases of the Skin: clinical Dermatology*. Saunders Elsevier. ISBN 0-7216-2921-0). Está provocada por una deficiencia hereditaria de la enzima glucocerebrosidasa. Dicha deficiencia resulta de la(s) mutación(ones) recesiva(s) en el gen que codifica(n) la glucocerebrosidasa, una hidrolasa lisosómica específica (también conocida como beta-glucosidasa, EC 3.2.1.45, PDB IOGS) localizada en el cromosoma 1 (1q21) y que afecta tanto a hombres como a mujeres. Diferentes mutaciones en la beta-glucosidasa determinan la actividad restante de la enzima, y, en gran medida, el fenotipo.  
30  
35

La glucocerebrosidasa también se denomina en esta memoria como  $\beta$ -glucocerebrosidasa, beta-glucosidasa, ácido beta-glucosidasa, glucosilceramidasa o D-glucosil-N-acilesfingosina glucohidrolasa.  
40

La enzima es una proteína larga de 497 aminoácidos, de 55,6 KD, que tiene actividad glucosilceramidasa, es decir, la enzima cataliza la ruptura de una sustancia grasa denominada glucocerebrósido mediante escisión, es decir, hidrólisis, de una unión beta-glucosídica de glucocerebrósido, que es un intermedio en el metabolismo de los glicolípidos. El glucocerebrósido, también denominado en esta memoria como glucosilceramida o Gb1, es un constituyente de la membrana celular de las células sanguíneas rojas y blancas. Cuando la enzima es defectuosa, la sustancia se acumula, particularmente en células de la línea celular mononuclear. Esto es porque los macrófagos que limpian estas células son incapaces de eliminar el producto de desecho, que se acumula en fibrillas, y se vuelven en las denominadas células de Gaucher, que aparecen en el microscopio óptico por parecerse a papel arrugado. El material graso puede acumularse en el bazo, hígado, riñones, pulmones, cerebro y médula ósea.  
45  
50

La enfermedad de Gaucher tiene tres subtipos clínicos comunes.

- Tipo I no neuronopático, también denominado en esta memoria como tipo I, es la forma más común de la enfermedad, que se da en aproximadamente 1 de 50.000 nacimientos. Se da más a menudo entre personas de herencia judía ashkenazita. Los síntomas pueden empezar pronto en la vida o en la edad adulta e incluyen hígado agrandado y bazo extremadamente agrandado (junto con hepatosplenomegalia); el bazo puede romperse y provocar complicaciones adicionales. La debilidad esquelética y la enfermedad ósea puede ser extensa. El agrandamiento del bazo y la sustitución de la médula ósea provocan anemia, trombocitopenia y leucopenia. El cerebro no está afectado patológicamente, pero puede haber disfunción pulmonar y, rara vez, renal. Los sujetos  
55

enfermos en este grupo normalmente se hacen magulladuras fácilmente (debido a bajos niveles en plaquetas) y experimentan fatiga debido a los bajos números en células sanguíneas rojas. Dependiendo del comienzo de la enfermedad y la gravedad, los pacientes de tipo I pueden vivir bien en la edad adulta. Muchos sujetos enfermos tienen una forma suave de la enfermedad y pueden no mostrar ningún síntoma.

- Tipo II neuronopático crónico, también denominado en esta memoria como tipo II, puede comenzar en cualquier momento en la infancia o incluso en la edad adulta, y se da aproximadamente en 1 de 100.000 nacimientos. Se caracteriza por síntomas neurológicos lentamente progresivos aunque más suaves en comparación con la versión aguda o tipo III. Los síntomas principales incluyen un bazo y/o hígado agrandados, convulsiones, pobre coordinación, irregularidades esqueléticas, trastornos del movimiento de los ojos, trastornos sanguíneos que incluyen anemia y problemas respiratorios. Los pacientes normalmente viven en la adolescencia temprana y la edad adulta.
- El tipo III neuronopático agudo, también denominado en esta memoria como tipo III, comienza típicamente dentro de los 6 meses de vida y tiene una tasa de incidencia de aproximadamente 1 de 100.000 nacimientos. Los síntomas incluyen un hígado y bazo agrandados, daño cerebral extenso y progresivo, trastornos del movimiento de los ojos, espasticidad, convulsiones, rigidez de las extremidades, y una pobre capacidad para succionar y tragar. Los niños afectados normalmente mueren sobre los 2 años.

Estos subtipos han sido algo criticados por no tener en cuenta el espectro total de los síntomas observables. También hay variaciones heterocigóticas compuestas que aumentan considerablemente la complejidad de la predicción de la evolución de la enfermedad.

En el tipo II y III de la enfermedad de Gaucher, el glucocerebrósido se acumula en el cerebro debido al recambio de lípidos complejos durante el desarrollo cerebral y la formación de la vaina de mielina de los nervios.

Los síntomas pueden incluir bazo e hígado agrandados, disfunción hepática, trastornos esqueléticos y lesiones óseas que pueden ser dolorosas, complicaciones neurológicas graves, hinchazón de los nodos linfáticos y (ocasionalmente) articulaciones adyacentes, abdomen distendido, una tinción pardusca de la piel, anemia, bajas plaquetas en sangre y depósitos de grasa amarilla en el blanco de los ojos (esclerótica). Las personas afectadas de forma más seria pueden además ser más susceptibles a la infección.

Terapia: el tratamiento enzimático sustitutivo también denominado en esta memoria como TSE, es la terapia de elección. Sin embargo, el trasplante exitoso de médula ósea podría curar las manifestaciones no neurológicas de la enfermedad, porque introduce una población de monocitos con beta-glucosidasa activa. Es importante mencionar que este procedimiento conlleva un riesgo significativo y se realiza rara vez en pacientes con enfermedad de Gaucher. La cirugía para extirpar el bazo (esplenectomía) puede necesitarse muy rara vez si el paciente está exageradamente anémico o cuando el órgano agrandado afecta a la comodidad del paciente. La transfusión de sangre puede beneficiar a algunos pacientes anémicos. Otros pacientes pueden necesitar cirugía de sustitución de articulaciones para mejorar la movilidad y la calidad de vida. Otras opciones de tratamiento incluyen antibióticos para infecciones, antiepilépticos para las convulsiones, bisfosfonatos para lesiones óseas y trasplantes de hígado.

La TSE está basado en la administración intravenosa crónica de una glucocerebrosidasa recombinante (imiglucerasa, Genzyme; velaglucerasa, Shire; taliglucerasa, Protalix) (G.A. Grabowski et al., Enzyme therapy in type I Gaucher's disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources, *Ann. Intern. Med.* 122 (1995) 33-39). Para los pacientes del tipo I y la mayoría del tipo II, la TSE con glucocerebrosidasa recombinante intravenosa (tal como, por ejemplo, imiglucerasa) puede reducir significativamente el tamaño del hígado y el bazo, reducir las anomalías esqueléticas e invertir otras manifestaciones.

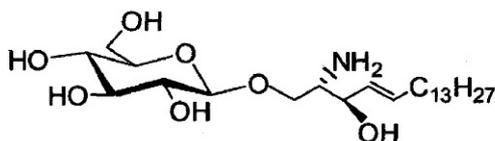
Más recientemente la terapia de reducción de sustrato también denominada en esta memoria como TRS, se ha desarrollado como un tratamiento alternativo para la enfermedad de Gaucher (F.M. Platt et al. N-butyl-deoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycosphingolipid biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 8362-8365). La inhibición parcial de la síntesis de glicosfingolípidos con N-butil-desoxinojirimicina (miglustat, Actelion) se emplea en un esfuerzo para equilibrar la capacidad catabólica reducida en los pacientes con enfermedad de Gaucher. El TRS puede probar el ser efectivo en parar el tipo II, ya que puede cruzar a través de la barrera sanguínea en el cerebro. No hay actualmente un tratamiento efectivo para el daño cerebral grave que puede darse en pacientes con tipos II y III de la enfermedad de Gaucher.

Tanto la TSE como la TRS dan generalmente por resultado marcadas mejoras clínicas tales como la reducción en la hepatosplenomegalia, correcciones en las anomalías hematológicas, estabilización o mejora en el deterioro esquelético.

El glucocerebrósido, también denominado en esta memoria como glucosilceramida o Gb1, indica cualquier cerebrósido en que el grupo funcional monosacárido es glucosa.

Se entenderá por un experto en la técnica que el término "liso-Gb1" como se usa en esta memoria, preferiblemente en conexión con el método reivindicado, significa preferiblemente que la molécula está presente en su forma amino

libre. Más precisamente, la liso-Gb1 como se usa en esta memoria, difiere preferiblemente del Gb1 en que ningún resto ácido graso está unido al grupo amino primario del resto esfingosina de la molécula. Además, la liso-Gb1 se denomina también en esta memoria como glucosilesfingosina o liso-glucocerebrósido y tiene la fórmula:



(I),

5 Se entenderá por un experto en la técnica que el término “liso-Gb1 libre” como se usa en esta memoria se refiere preferiblemente a liso-Gb1 que está presente como tal en una muestra del sujeto, tal como sangre, y preferiblemente, no es el resultado de una manipulación de la muestra de dicho sujeto. Dicha manipulación de una muestra puede ser la descrita por Groener et al. (Groener et al. Plasma glucosylceramide and ceramide in type 1 Gaucher disease patients: Correlations with disease severity and response to therapeutic intervention. Biochimica et Biophysica Acta 1781 (2908) 72 ~ 78, 2007). De acuerdo con esto, la liso-Gb1 libre que está presente como tal en la sangre de un sujeto del que se toma la muestra, es más particularmente no una liso-Gb1 que se genera mediante tratamiento químico, bioquímico o físico de la muestra contenida en la sangre y la muestra, respectivamente, preferiblemente fuera del cuerpo del paciente. Se entenderá también por un experto en la técnica que la liso-Gb1 libre como se usa en esta memoria, está presente preferiblemente además de Gb1 y es un compuesto producido por las actividades metabólicas del paciente. Por consiguiente, Gb1, que es la molécula que se acumula en conexión con la enfermedad de Gaucher que está presente en la muestra del sujeto se ha comparado con la molécula en una forma liso libre, es decir, liso-Gb1 libre, presente en la sangre del sujeto con al menos un resto de ácido graso unido al grupo amino primario del resto de esfingosina de liso-Gb1.

El término “muestra” como se usa preferiblemente en esta memoria significa una cantidad limitada de un material del sujeto, en donde dicho material del sujeto es parte de o se ha tomado de un sujeto y/o el cuerpo de un sujeto y en donde dicho material se selecciona del grupo que comprende fluidos corporales tales como sangre, un producto sanguíneo, orina, saliva, fluido cerebroespinal y linfa, además de heces o cualquier clase de tejido y o material celular que es parte de un sujeto y/o el cuerpo de un sujeto. Se sabrá por un experto en la técnica, que la presencia y/o un nivel de un biomarcador de la invención en dicha muestra pretende ser similar a y representar la presencia y/o el nivel del biomarcador en una cantidad mayor de la del material del sujeto. De forma más precisa y como un ejemplo ilustrativo no limitante, un nivel de un biomarcador de la invención determinado en una muestra de algún ml de sangre de un sujeto también representa un nivel de dicho biomarcador en la sangre del cuerpo del sujeto. Además, en una realización del método de la invención para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto, una muestra del sujeto comprende dicho material del sujeto en una forma, por ejemplo procesada, fija y/o conservada de manera que dicha muestra es adecuada para usar en el método de la invención, por lo que dicho procesado, fijación y/o conservación no genera preferiblemente liso-Gb1. El material del sujeto en la muestra puede así diluirse, por ejemplo con un disolvente adecuado para el método de la invención tal como metanol y/o agua, puede secarse, por ejemplo en una tarjeta de filtro, puede resolverse después de haberse secado tal como, por ejemplo con un disolvente adecuado para el método de la invención tal como metanol y/o agua, o puede añadirse una sustancia, en donde dicha sustancia evita que la sangre se coagule tal como por ejemplo EDTA o heparina. Se entenderá además por un experto en la técnica que el método de la invención comprende que dicho material del sujeto se separe en los componentes individuales de dicho material del sujeto y/o componentes sencillos de dicho material del sujeto se extraen de dicho material del sujeto, por ejemplo la sangre se separa en plasma o suero y los componentes celulares de la sangre o proteína se precipita de la muestra. Se entenderá inmediatamente que después de dicho procesado, fijación y/o conservación la muestra se somete a los métodos de la invención para detectar y/o determinar el nivel de un biomarcador contenido en dicha muestra por los que dicho procesado, fijación y/o conservación preferiblemente no genera liso-Gb1.

En una realización del método de la presente invención en donde la sangre completa se recoge en una tarjeta de filtro de sangre seca preferiblemente aproximadamente 3 µl de sangre completa se recoge en un punto de dicha tarjeta de filtro de sangre seca que tiene un diámetro de 3 mm. Un experto en la técnica sabrá que el volumen exacto recogido así puede variar dependiendo del hematocrito del paciente específico.

Los niveles de glucosilceramida y su precursor ceramida se usaron en la técnica anterior para correlacionar su presencia en plasma con la gravedad de la enfermedad de Gaucher tipo I la respuesta a la aplicación de terapia (Groener et al., Plasma glucosylceramide and ceramide in type 1 Gaucher's disease patients: Correlations with disease severity and response to therapeutic intervention. Biochimica et Biophysica Acta 1781 (2908) 72 ~ 78, 2007). Por consiguiente, se encontró que el nivel de Gb1 era diferente aunque los niveles de ceramida no eran diferentes de forma significativa en el plasma de los paciente tratados y no tratados con enfermedad de Gaucher tipo I.

En el estudio presentado por Groener et al. (Groener et al., supra) la relación de Gb1/ceramida se usó para discriminar entre los pacientes con enfermedad de Gaucher y los pacientes sanos. La Gb1 y la ceramida se midieron con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) esencialmente como se describe en Groener et al. (J.E.M. Groener

et al., HPLC for simultaneous quantification of total ceramide, glucosylceramide, and ceramide trihexoside concentrations in plasma, *Clin. Chem.* 53 (2007) 742-747). En conexión con esto es importante entender que la Gb1 presente en el plasma consiste principalmente en un resto de azúcar y un resto de ceramida. El resto de ceramida comprende una esfingosina y un resto de ácido graso. Según el método de la técnica anterior los lípidos se extraen y la ceramida y la glucosilceramida se desacetilan mediante hidrólisis alcalina formando así la forma liso, es decir, liso-Gb1 (T. Taketomi et al., Rapid method of preparation of lysoglycosphingolipids and their confirmation by delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *J. Biochem. (Tokio)* 120 (1996) 573-579). Posteriormente, la liso-Gb1 así producida se marca con un tinte fluorescente mediante derivación con O-ftaldialdehído (OPA) en el grupo amina primaria. Después las bases esfingoides derivadas se separaron por HPLC de fase inversa y se detectaron con un detector de fluorescencia. Por consiguiente dicho método de la técnica anterior es capaz de detectar el Gb1 total que consiste en liso-Gb1 libre y Gb1 y no es capaz de distinguir un nivel de liso-Gb1 libre de un nivel de Gb1 en una muestra de un sujeto. El nivel de dicha Gb1 total después de la escisión de los diversos restos de ácido graso del grupo NH<sub>2</sub> de la Gb1 está normalmente en un intervalo de 5 a 30 µg por mL de plasma o suero. A partir de esto es evidente que en el método de Groener et al. (Groener et al., supra) la Gb1 total que puede prepararse y obtenerse, respectivamente, de una muestra, preferiblemente una muestra de sangre, de un sujeto se usa como un biomarcador más que la liso-Gb1 libre contenida en la sangre y por consiguiente también en la muestra sin realizar una escisión del(de los) resto/restos de ácidos grasos, preferiblemente una escisión realizada por un operador que maneja la muestra. Si acaso, la presente invención está relacionada con la detección de liso-Gb1 libre más que con la Gb1 total como se enseña en la técnica anterior. Es una realización de los métodos de la presente invención que comprende detectar y/o determinar el nivel de liso-Gb1 libre en una muestra de un sujeto que la liso-Gb1 libre y/o el nivel de liso-Gb1 libre se determine por separado de y/o aparte de Gb1 o un nivel de Gb1 que puede estar presente en la sangre de un sujeto. En una realización adicional Gb1 y/o un nivel de Gb1 se detecta/determina además de la detección de y/o la determinación de un nivel de liso-Gb1 libre.

De forma importante, cada amina primaria que circula en el plasma y que es suficientemente lipófila para extraerse a la vez que Gb1 usando un disolvente orgánico según dicho método de la técnica se marca por consiguiente y así es capaz de perturbar la detección de la liso-Gb1 escindida.

Aunque la Gb1 total medida como liso-Gb1 en dicho estudio de la técnica anterior se aumentó en el plasma de dichos pacientes, dicho aumento en la Gb1 total no fue destacado y por consiguiente la especificidad y la sensibilidad del método fueron bajos mostrando que la Gb1 no es adecuada como un biomarcador para la enfermedad de Gaucher.

En conexión con esto es importante anotar que para el conocimiento de los inventores los datos descritos en los Ejemplos en esta memoria en conexión con la presente invención representan el primer análisis sistemático de la especificidad y sensibilidad con respecto a la comparación directa de los biomarcadores para la enfermedad de Gaucher de la técnica anterior, es decir, quitotriosidasa y CCL18, y de la liso-Gb1 libre.

Proporcionar una sensibilidad y/o especificidad de  $\geq 99,0\%$  de liso-Gb1 libre como se determina por los métodos de la presente invención es un biomarcador adecuado de aplicación clínica en conexión con la enfermedad de Gaucher. Si acaso, el biomarcador de la presente invención y los usos del mismo claramente exceden el rendimiento de los biomarcadores conocidos en la técnica anterior, más específicamente, al de quitotriosidasa y CCL18. Se entenderá inmediatamente que además el método aplicado por Groener et al. (Groener et al., supra) es perjudicial en comparación con los métodos de la presente invención en que la especificidad y sensibilidad de dicho método de la técnica anterior es menor y el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher en base a dicho método de la técnica anterior usando Gb1 total en vez de liso-Gb1 libre no es adecuado para la aplicación clínica fiable del mismo, es decir, el método no tiene suficiente sensibilidad y especificidad para diagnosticar la enfermedad de Gaucher mediante una predicción fiable estadísticamente segura.

Quitotriosidasa: Se ha encontrado anteriormente que las células de Gaucher secretan quitotriosidasa y que la quitotriosidasa en el plasma de pacientes sintomáticos con enfermedad de Gaucher está elevada en promedio de varios cientos de veces (Hollak et al. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994; 93:1288-1292). Por lo tanto, la quitotriosidasa en plasma se usa por lo tanto como un marcador suplente para las manifestaciones de la enfermedad de Gaucher y se usa para diagnóstico, determinación temprana del comienzo de la enfermedad, y monitorización de la eficacia terapéutica (Hollak et al. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994; 93:1288-1292; Mistry et al. A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1997; 10:817-838; Cox et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxyjirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet.* 2000; 355:1481-1485; Hollak et al. Clinically relevant therapeutic endpoints in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2001; 24:97-105).

Sin embargo, los niveles de quitotriosidasa en plasma no reflejan un síntoma clínico particular, sino que más bien son un reflejo de la carga corporal total de las células de Gaucher (Aerts et al. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol.* 1997; 10:691-709); además no se refleja la carga de la enfermedad llevada por la patología ósea y el daño cerebral. El nivel de quitotriosidasa no está directamente relacionado con la patofisiología de la enfermedad de Gaucher. Adicionalmente, después del tratamiento el nivel de quitotriosidasa cambia extremadamente lento haciendo a la quitotriosidasa inadecuada para evaluar rápidamente la eficacia del tratamiento al que el paciente se somete o se ha sometido además de una recaída de la enfermedad independiente

de la causa de la enfermedad.

Además, el uso de quitotriosidasa en plasma como un marcador de las células de Gaucher está obstaculizado por el hecho de que los pacientes, incluyendo aquellos con enfermedad de Gaucher, pueden ser deficientes en actividad de la quitotriosidasa debido a una duplicación del par de bases (pb) 24 en el gen de la quitotriosidasa. Obviamente estos individuos no pueden monitorizarse por la medida de la actividad de la quitotriosidasa en plasma (Hollak et al. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest.* 1994; 93:1288-1292; Boot et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem.* 1998; 273:25680-25685). La frecuencia de la duplicación del pb 24 en el gen de la quitotriosidasa depende de la etnia y puede elevarse hasta casi el 35% (Prof. Guilian, Brasil, datos no publicados).

CCL18: Los macrófagos o células de Gaucher cargados con glucosilceramida son la fuente principal de CCL18. El nivel de CCL18 en el plasma de pacientes que tienen la enfermedad de Gaucher está significativamente aumentado (Boot, R.G. et al. 2004. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood* 103:33-39). Por lo tanto, hubo intentos de usar el nivel de CCL18 en el plasma como un marcador suplente para monitorizar el éxito de una terapia aplicada. Sin embargo, también se encontró que los niveles elevados de CCL18 estaban asociados con una variedad de enfermedades, tales como diferentes tipos de cáncer e inflamación de las articulaciones, pulmones y piel. Por ejemplo, la ascitis de pacientes que tienen carcinoma de ovario contiene un nivel significativamente elevado de CCL18 en comparación con pacientes sin carcinoma de ovario (síndrome de Budd-Chiari) (Schutyser, E. et al. 2002. Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma, *J. Biol. Chem.* 277:24584-24593). El CCL18 juega un papel en la supresión tumoral ya que atrae y activa las células inmunes específicas. Además se encuentra que los niños que tienen leucemia linfocítica aguda muestran niveles elevados de CCL18, mientras que los niños que tienen leucemia mieloide aguda no muestran niveles en suero elevados de CCL18 (Struyf, S et al. 2003. ARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.* 163: 2065-2075). De Nuevo los niveles de CCL18 en plasma no reflejan un síntoma clínico particular, sino que más bien son un reflejo de la carga corporal total de las células de Gaucher. Como puede verse a partir de lo anterior la CCL18 muestra una especificidad extremadamente baja para el diagnóstico de la enfermedad de Gaucher y por tanto se aplica principalmente como un marcador suplente "auxiliar" para pacientes deficientes en actividad de quitotriosidasa.

En conexión con el uso de quitotriosidasa y CCL18 se va a anotar que la quitotriosidasa falla en dar positivo en el 10-30% de todos los pacientes, es decir, los pacientes dan negativo aunque sufran de enfermedad de Gaucher y por tanto también se renunciará a la aplicación de una terapia. Además, en estos casos el marcador no puede usarse más como un marcador de seguimiento para monitorizar, por ejemplo TSE. Si se sospecha que el paciente está afectado por el defecto de la quitotriosidasa, se usa CCL18 como un biomarcador para diagnosticar la enfermedad de Gaucher, por lo cual un método que hace uso de CCL18 como un biomarcador muestra especificidad y sensibilidad relativamente bajas, es decir, diagnostica falso positivo o falso negativo en aproximadamente el 25% de todos los pacientes.

El término "estado de la enfermedad de Gaucher" como se usa en esta memoria, se refiere preferiblemente al estado de la enfermedad en el sujeto. Ejemplos de tipos de estados de la enfermedad de Gaucher incluyen, aunque no están limitados a, el riesgo del sujeto de sufrir o desarrollar la enfermedad de Gaucher, la etapa de la enfermedad en un sujeto y la efectividad del tratamiento de la enfermedad. Otros estados y grados de cada estado se conocen en la técnica. En una realización de la presente invención el estado de la enfermedad de Gaucher comprende un estado de la enfermedad de Gaucher grave, suave o sano.

El término "diagnosticar" como se usa en esta memoria, significa preferiblemente determinar la presencia o la ausencia de una enfermedad o trastorno en un sujeto y/o determinar si un sujeto está en riesgo de desarrollar una enfermedad, un trastorno o síntomas relacionados con una enfermedad o trastorno además de predecir un estado de una enfermedad.

El término "detectar" en el contexto de la presente invención significa métodos que incluyen detectar la presencia o ausencia de una sustancia en una muestra y/o cualificar el tipo de dicha sustancia. La detección puede conseguirse mediante métodos conocidos en la técnica y aquellos descritos adicionalmente en esta memoria, que incluyen, aunque no están limitados a, la medida directa de la enzima glucosidasa por ejemplo la secuenciación de la codificación genética para la glucosidasa. Cualquier método adecuado puede usarse para detectar uno o más de los biomarcadores descritos en esta memoria. Estos métodos incluyen, sin limitación, espectrometría de masas (por ejemplo, HPLC-MS/MS), fluorescencia (por ejemplo (inmunoensayo sándwich), HPLC-fluorescencia o HPLC-UV preferiblemente después de derivación de liso-Gb1 libre.

Un biomarcador como se usa en esta memoria, es preferiblemente cualquier compuesto biológico, tal como una proteína o un fragmento de la misma, un péptido, un polipéptido, un proteoglicano, una glicoproteína, una lipoproteína, un carbohidrato, un lípido, un ácido nucleico, un compuesto químico orgánico o inorgánico, un polímero natural y una molécula pequeña, que está presente diferencialmente en una muestra de un sujeto de un estado fenotípico (por ejemplo que tiene una enfermedad) en comparación con otro estado fenotípico (por ejemplo que no tiene la enfermedad) y que puede aislarse de, o medirse en la muestra del sujeto. Además, el biomarcador puede ser la molécula entera intacta, o puede ser una parte de la misma que se detecta preferiblemente por análisis espectrométrico

de masas, un anticuerpo, otra proteína que se une de forma específica al biomarcador, ácidos nucleicos funcionales que se unen de forma específica al biomarcador y/o una marca fluorescente. Un biomarcador se considera además que es informativo si un aspecto medible del biomarcador está asociado con un estado dado del paciente, tal como un estado particular de la enfermedad de Gaucher. Dicho aspecto medible puede incluir, por ejemplo, la presencia, ausencia o el nivel del biomarcador en la muestra del sujeto y/o su presencia como parte de un perfil de biomarcadores. Un aspecto medible puede ser también una relación de dos o más aspectos medibles de los biomarcadores, cuyos biomarcadores pueden ser o no de identidad conocida, por ejemplo. Un perfil de biomarcadores comprende al menos dos de dichos aspectos medibles, donde los aspectos medibles pueden corresponder a las mismas o diferentes clases de biomarcadores tales como, por ejemplo, un ácido nucleico y un carbohidrato. Un perfil de biomarcador puede comprender también al menos tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30 o más aspectos medibles. En una realización, un perfil de biomarcador comprende cientos, o incluso miles, de aspectos medibles. En otra realización, el perfil de biomarcador al menos un aspecto medible de al menos un biomarcador y al menos un aspecto medible de al menos un patrón interno.

En una realización del método según la presente invención se añade un patrón interno a una muestra de un sujeto. Se sabrá que por dicha adición de patrón interno, también denominado en esta memoria como PI, a la muestra, es decir, adición de la muestra, para someterse al método según la presente invención, se conoce la concentración del PI en la muestra y, por ejemplo, determinando el área por debajo del pico, es decir, el área del pico, del patrón interno en, por ejemplo, un cromatograma de HPLC espectrometría de masas puede calcularse por consiguiente la relación entre un área del pico y una concentración de una sustancia, por ejemplo de PI y/o el biomarcador que es en el actual caso liso-Gb1 libre, por ejemplo calculando la relación del área de pico de la liso-Gb1 libre y el área de pico del PI. Un experto en la técnica sabrá además que varias moléculas pueden usarse como un PI. Sin embargo es preferible un PI que tiene una estructura química similar en comparación con la molécula tal como el biomarcador, por ejemplo liso-Gb1 libre. De acuerdo con esto, los autores de esta invención han elegido en una realización liso-Gb2 que difiere de liso-Gb1 en que comprende un resto azúcar adicional y además no está presente como tal en la naturaleza. En una realización preferida la molécula que es el PI puede distinguirse de la liso-Gb1 libre en el método de la presente invención. En una realización preferida adicional el PI se selecciona como una molécula que idealmente no está presente o es rara en la naturaleza. En una realización de la presente invención donde el patrón interno se añade a una muestra de un sujeto, se prefiere que el PI se añada de manera que se disuelva en un disolvente, por ejemplo, etanol, antes de dicha adición a la muestra. En una realización preferida adicional en que el disolvente se selecciona de manera que dicho disolvente es capaz de provocar la precipitación de la proteína, preferiblemente es capaz de provocar la etapa de precipitación de proteína como está sujeto al método de la presente invención.

En algunas realizaciones de la presente invención una precipitación de proteína y/o una etapa de precipitación de proteína es parte del método de la presente invención. Se entenderá que la precipitación como se usa en esta memoria, preferiblemente significa la formación de un sólido en una disolución, es decir, por ejemplo la formación de un precipitado de proteína en una muestra, por ejemplo, suero, de un sujeto. Cuando se da la precipitación, por ejemplo la precipitación de proteína, en una muestra, el sólido formado se denomina el precipitado, o cuando se compacta mediante una centrifuga, un granulado. El líquido que permanece por encima del sólido es en cualquier caso denominado el sobrenadante. La presente invención contempla diferentes métodos de precipitación y/o separación de dicho sobrenadante y dicho precipitado o granulado, que comprende, entre otros, deposición o sedimentación y centrifugado. Un experto en la técnica conocerá métodos adicionales para la precipitación de proteína y/o para la separación de un sobrenadante y un precipitado de proteína, sin embargo dicho experto sabrá que si un método, preferiblemente un método de la invención, se aplica donde se precipitó proteína inutilizará un dispositivo tal como una columna o columna de HPLC usada en conexión con la presente invención la proteína precipitada se separa preferiblemente del disolvente y/o la muestra.

En algunas realizaciones de la presente invención un nivel de un biomarcador de la presente invención, por ejemplo, liso-Gb1 libre, determinado por un método de la presente invención en una muestra se compara con un nivel del mismo u otro biomarcador de la presente invención determinado por un método de la presente invención en otra muestra, por ejemplo del mismo paciente, de otro paciente, de un control y/o de los mismos o diferentes puntos temporales, y/o un nivel límite, y/o un nivel de un control y/o un nivel de un PI. En conexión con esto "que compara" o "en comparación con" como se usa en esta memoria, preferiblemente indica la comparación matemática de los dos o más valores de los niveles del(de los) biomarcador(es). Por consiguiente será inmediatamente evidente si uno de dichos valores es mayor, menor o idéntico si al menos dos de dichos valores se comparan el uno con el otro.

En algunas realizaciones de la presente invención el nivel del biomarcador se determina también en un control. Como se usa en esta memoria, un control es preferiblemente una muestra de un sujeto en donde se conoce el estado de la enfermedad de Gaucher de dicho sujeto. En una realización un control es una muestra de un paciente sano. En una realización adicional una cantidad de dicho biomarcador se añade a dicha muestra de un paciente sano antes de determinar el nivel de dicho biomarcador en dicha muestra de un paciente sano que comprende dicho biomarcador añadido con un método de la presente invención. En una realización adicional el control es una muestra de al menos un sujeto que tiene un estado de enfermedad de Gaucher conocido, comprendiendo dicho estado de la enfermedad de Gaucher conocido el estado de enfermedad de Gaucher grave, suave o sano, por ejemplo un paciente de control. En una realización preferida adicional el control es una muestra de un sujeto que no está tratado para la enfermedad de Gaucher. En una realización aún más preferida el control es una muestra de un único sujeto o una acumulación de muestras de diferentes sujetos y/o muestras tomadas del(de los) sujeto(s) a diferentes puntos temporales.

El término "nivel" o "nivel de un biomarcador" como se usa en esta memoria, preferiblemente significa la concentración de una sustancia, preferiblemente de un biomarcador de la invención y más preferiblemente de liso-Gb1 libre, en una muestra o un sujeto. Se entenderá por un experto que en ciertas realizaciones dicha muestra no está sometida necesariamente a un método de la invención como una muestra no procesada, comprendiendo el método determinar un nivel de dicho biomarcador, es decir dicha muestra puede someterse, por ejemplo a una etapa de precipitación de proteína, separación, por ejemplo centrifugado y/o HPLC y posteriormente someterse a una etapa para determinar el nivel del biomarcador, por ejemplo, usando análisis espectrométrico de masas. Debería anotarse además que cuando el término "un" nivel de un biomarcador se usa en conexión con un nivel del biomarcador de la invención que se va a determinar según la presente invención, se entiende "el" nivel del biomarcador de la presente invención que se va a determinar por los métodos de la presente invención y que está contenido en la muestra sometida al(a los) método(s) de la invención.

El nivel de un biomarcador es diferente entre diferentes estados de la enfermedad de Gaucher, si la media o nivel medio del biomarcador en los diferentes grupos se calcula para ser estadísticamente significativo. Los ensayos habituales para la significancia estadística incluyen, entre otros, prueba t de Student, ANOVA, Wilcoxon, Mann-Whitney, cociente de probabilidades y Kruskal-Wallis. Los biomarcadores, solos o en combinación, proporcionan medidas de riesgo relativo de que un sujeto pertenezca a un estado fenotípico o a otro. Por lo tanto, los biomarcadores de la presente invención son útiles en una realización de la presente invención como marcadores para la enfermedad, efectividad terapéutica de un fármaco o un tratamiento.

El término "determinar el nivel" de un biomarcador como se usa en esta memoria, significa preferiblemente métodos que incluyen cuantificar una cantidad de al menos una sustancia en una muestra de un sujeto y/o cuantificar una cantidad de dicha sustancia contenida en una parte del cuerpo del sujeto, tal como saliva, sangre, linfa, suero, plasma o licor y/o cuantificar una cantidad de dicha sustancia en el sujeto, seleccionándose la sustancia del grupo que comprende un biomarcador.

Se entenderá por un experto en la técnica que detectar y/o determinar el nivel de liso-Gb1 libre en una muestra del sujeto comprende así preferiblemente que la Gb1 presente en la sangre de un sujeto no esté convertida, transformada o derivada químicamente ya que la liso-Gb1 libre no puede detectarse y/o el nivel de la misma no puede determinarse separada de y/o apartada de Gb1. El experto en la técnica sabrá que la Gb1 presente en una muestra de un sujeto que está sometida a una etapa de desacetilación, por ejemplo, por hidrólisis en hidróxido sódico metanólico, dará por resultado la escisión del resto de ácido graso de la Gb1 y por consiguiente dará por resultado de forma indeseable una forma convertida, transformada o derivada químicamente de Gb1 que no puede diferenciarse de la liso-Gb1 libre. Es por consiguiente el mérito de los autores de esta invención reconocer que la liso-Gb1 libre apartada de Gb1 es útil en un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher.

En una realización preferida del método de la presente invención, el método detecta y/o determina el nivel de liso-Gb1 libre en una muestra de un sujeto, en donde la Gb1 presente en la muestra del sujeto no se somete a una etapa que da por resultado la desacetilación de Gb1, preferiblemente no se somete a una etapa que da por resultado la escisión de un resto de ácido graso de la Gb1 contenida en la muestra. En una realización más preferida del método de la presente invención la Gb1 presente en la muestra del sujeto no está convertida, transformada o derivada químicamente. En una realización aún más preferida del método de la presente invención la liso-Gb1 libre presente en la muestra del sujeto se separa de la Gb1 presente en la muestra del sujeto antes de una etapa que daría por resultado la escisión de un resto de ácido graso de la Gb1 y/o antes de una etapa en que la Gb1 se convierte, transforma o deriva químicamente. En una realización aún más preferida se realiza una etapa de detección y/o determinación del nivel de un biomarcador en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre, posterior a la separación usando HPLC mediante la aplicación de análisis espectrométrico de masas.

Un sujeto se considera que es un sujeto sano con respecto a la enfermedad de Gaucher, si el sujeto no experimenta síntomas asociados con la enfermedad de Gaucher. Además en una realización de los métodos de la invención un sujeto se considerará que está sano si no tiene mutación de las partes funcionales del gen cerebrosidasa y/o no tiene mutación del gen cerebrosidasa que da por resultado una reducción de o una deficiencia de la enzima glucocerebrosidasa o la actividad de la misma, dando por resultado síntomas asociados con la enfermedad de Gaucher. Dichas mutaciones se detectarán si una muestra del sujeto se somete a una prueba genética para dichas mutaciones como se describe en esta memoria. En una realización adicional de la presente invención una muestra de un sujeto sano se usa como una muestra de control o como una matriz blanco en los métodos de la presente invención. Una matriz blanco como se indica en esta memoria, es preferiblemente una muestra de un sujeto sano. Sin embargo, se entenderá que dicha matriz blanco puede contener un nivel nativo de liso-Gb1 libre.

En una realización de la presente invención el nivel de un biomarcador es indicativo de que el sujeto sufre o está en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno. El nivel del biomarcador determinado por el método según la presente invención se compara con un nivel de control del biomarcador.

Más específicamente, comparar el nivel del biomarcador en la muestra del sujeto al nivel de control del biomarcador comprende comparar el nivel del biomarcador en la muestra del sujeto con un nivel límite, en donde si un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto está elevado, aumentado o es mayor en comparación del nivel límite, esto es indicativo de que el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher y/o, en donde si

un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto está disminuido o es menor en comparación con el nivel límite esto es indicativo de que el sujeto no está sufriendo o no está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher. También está en la presente invención que comparar el nivel del biomarcador en la muestra del sujeto con un nivel de control permite determinar la gravedad de la enfermedad de Gaucher, en donde si un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto está elevado, aumentado o es mayor en comparación con el nivel del control esto es indicativo de que el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher de un estado o progresión más grave; y en donde si un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto está disminuido o es menor en comparación con el nivel de control esto es indicativo de que el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher de un estado o progresión menos grave. En una realización adicional de la presente invención que compara el nivel del biomarcador en la muestra del sujeto con el nivel de control comprende comparar un nivel del biomarcador en dicho sujeto con un nivel del biomarcador detectado en una muestra de un control, en donde si un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto está elevado, aumentado o es mayor en comparación con la muestra de control esto es indicativo de que el sujeto está sufriendo y/o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher; y/o un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto está elevado, aumentado o es mayor en comparación con la muestra de control esto es indicativo de que el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher de un estado o progresión más grave. Dicho control se selecciona preferiblemente del grupo que comprende sujetos sanos, sujetos que sufren la enfermedad de Gaucher o están en riesgo de sufrir los síntomas de la enfermedad de Gaucher, sujetos que han dado positivo en una mutación o una combinación de mutaciones del gen cerebrosidasa, en donde la mutación o la combinación de mutaciones del gen cerebrosidasa son indicativas de una perspectiva de que el sujeto desarrolle la enfermedad de Gaucher de un estado o progresión más grave o menos grave. En una realización adicional de la presente invención ese nivel de control se determina en una muestra de un control, en donde se añade opcionalmente liso-Gbl libre a la muestra del control en una cantidad específica antes de determinar el nivel de liso-Gb1 libre en la muestra del control.

Es el mérito de los autores de esta invención que un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto pudiera establecerse en donde el método comprende detectar un biomarcador en una muestra de un sujeto, en donde el biomarcador es liso-Gbl libre, preferiblemente que comprende además determinar un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto, y más preferiblemente que comprende además comparar el nivel del biomarcador en la muestra del sujeto a un nivel límite, que muestra alta sensibilidad, es decir, una sensibilidad de al menos 99,0%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% o 100% y alta especificidad de al menos 99,0%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8%, 99,9% o 100%. El método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto es independiente de un estado de progresión de la enfermedad de Gaucher en el sujeto. Más específicamente, el método permite diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto que tiene un estado temprano de la enfermedad de Gaucher además de en un sujeto que tiene un estado avanzado o desarrollado de la enfermedad de Gaucher.

El poder de un método para diagnosticar correctamente la enfermedad de Gaucher, se mide normalmente como la sensibilidad del método, la especificidad del método o el área bajo una curva característica operada por un receptor (también denominado en esta memoria como "curva COR"). Una curva COR es una representación de la tasa positiva real frente a la tasa positiva falsa para los diferentes niveles límite posibles de un método diagnóstico. Una curva COR muestra la relación entre la sensibilidad y la especificidad. La sensibilidad es el porcentaje de positivos reales que se predicen mediante un ensayo que es positivo, mientras que la especificidad es el porcentaje de negativos reales que se predicen mediante un ensayo que es negativo. Una curva COR proporciona la sensibilidad de un ensayo como una función de 1-especificidad. Cuanto mayor es el área bajo la curva COR más potente es el valor predictivo del ensayo. Por consiguiente, un aumento en la sensibilidad se acompañará con una disminución de la especificidad. Cuanto más cerca siga la curva el eje izquierdo y después el borde superior del espacio COR, más exacto será el ensayo. Por el contrario, cuanto más cerca vaya la curva a la diagonal a 45 grados del gráfico COR, menos exacto será el ensayo. Por lo tanto, el área bajo la COR es una medida de exactitud de ensayo. La exactitud del ensayo depende de cómo de bien el ensayo separa el grupo que se está probando en aquellos con y sin la enfermedad en cuestión. Un área bajo la curva (también denominada en esta memoria como "ABC") de 1 representa un método perfecto, mientras que un área de 0,5 representa un método menos útil. Por consiguiente, los métodos diagnósticos preferidos tienen una ABC mayor de 0,50, más preferido los métodos tienen una ABC mayor que 0,9 y lo más preferido los métodos tienen una ABC mayor que 0,998.

Otras medidas útiles y adecuadas para la utilidad de un método son el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo. Un valor predictivo positivo es el porcentaje de los positivos reales que se prueban como positivo. Un valor predictivo negativo es el porcentaje de negativos reales que se prueban como negativo.

Los métodos para cualificar el estado de la enfermedad de Gaucher en un sujeto que usa biomarcadores de la técnica anterior, por ejemplo, quitotriosidasa y/o CCL18 muestran una sensibilidad y especificidad típicamente de no más del 90%.

Un experto en la técnica sabrá que aunque la especificidad y la sensibilidad de los métodos descritos para la diagnosis de la enfermedad de Gaucher son tan altas como se describen anteriormente y se determinaron como se describe en los Ejemplos en adelante, los casos individuales no pueden excluirse donde un paciente que tiene la enfermedad de Gaucher dará falso negativo o donde un paciente que no tiene la enfermedad de Gaucher dará falso positivo con un método de la invención. Teniendo en cuenta estos casos al mismo tiempo que se determinan la especificidad y la sensibilidad del método según la presente invención, la especificidad y la sensibilidad será menor que los valores

descritos anteriormente. Sin embargo, el experto en la técnica también sabrá que dicha alta especificidad y dicha alta sensibilidad como se ha subrayado anteriormente nunca se ha descrito antes para un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher. Por lo tanto es importante anotar que aunque la sensibilidad y la especificidad del método de la presente invención pueden variar si colectivos de pacientes distintos del presentado en la parte de Ejemplos, por ejemplo variando el número de pacientes, se someten a los métodos de la presente invención, es una creencia firme de los inventores que ningún método conocido en la técnica anterior que usa biomarcadores alcanzará una mayor especificidad y una mayor sensibilidad en comparación con los métodos descritos para la diagnosis de la enfermedad de Gaucher. Esto es especialmente cierto ya que el límite de detección de dichos métodos permite determinar el nivel de liso-Gb1 libre en muchos sujetos sanos. Por consiguiente, un sujeto enfermo que ha dado falso negativo aplicando los métodos de la presente invención ha dado falso negativo por la razón de que un nivel del biomarcador en una muestra de dicho sujeto enfermo que ha dado falso negativo es tan alto como el nivel del biomarcador en una muestra de un sujeto sano. En particular, es importante anotar que dicho sujeto que ha dado falso negativo no ha dado negativo por la razón de que el nivel del biomarcador era demasiado bajo para determinarse por el método de la presente invención.

Un "límite de detección" de una sustancia tal como liso-Gb1 libre, como se usa en esta memoria, es preferiblemente un nivel de la sustancia determinada por un método para determinar un nivel de la sustancia, en donde un nivel menos que o menor que de dicho límite de detección no puede determinarse por dicho método. Por consiguiente está inmediatamente claro que un "nivel límite" y un "límite de detección", como se usa en esta memoria, son preferiblemente no necesariamente idénticos, aunque ambos reflejan un cierto nivel de una sustancia, por ejemplo, de un biomarcador de la presente invención. Se entenderá inmediatamente que en contraste con un nivel límite se seleccionará preferiblemente la selectividad y la sensibilidad del método de manera que sean tan altas como sea posible. En contraste con esto un límite de detección representa un nivel absoluto del biomarcador de la presente invención que refleja el nivel mínimo de biomarcador que puede detectarse con un método para determinar el nivel de dicho biomarcador. Por consiguiente está inmediatamente claro que un límite de detección depende del método para determinar un nivel de una sustancia y de la sustancia cuyo nivel se va a determinar por el método. Un experto entenderá inmediatamente que un alto límite de detección, por ejemplo, mayor que un nivel límite ideal, podría dar por resultado posiblemente una baja sensibilidad del método ya que el porcentaje de positivos reales que se predicen mediante una prueba que es positiva también depende de si un nivel del biomarcador puede determinarse para dichos positivos reales. En otras palabras, si el límite de detección es mayor que un nivel límite ideal, los positivos reales que tienen un nivel del biomarcador ligeramente mayor que el nivel límite no pueden distinguirse de los negativos reales que tienen un nivel del biomarcador más bajo que el nivel límite ya que ningún nivel del biomarcador puede determinarse tanto para positivos reales que tienen un nivel del biomarcador ligeramente superior que el nivel límite como para los negativos que tienen un nivel del biomarcador menor que el nivel límite. Está por consiguiente inmediatamente claro que un bajo límite de detección es una ventaja. Es por lo tanto también el mérito de los inventores mostrar que un límite de detección menor permite a un método diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto que comprende una etapa de determinación de un nivel del biomarcador presente en la muestra con mayor selectividad y sensibilidad. Un "nivel límite ideal" como se usa en esta memoria, es preferiblemente el nivel límite como se describe en esta memoria el método que usa dicho nivel límite ideal tiene la más alta selectividad y sensibilidad.

El método descrito para la diagnosis de la enfermedad de Gaucher puede comprender una etapa de validación de dicho método para diagnosticar una enfermedad o trastorno, preferiblemente la enfermedad de Gaucher, en un sujeto mediante dicho método; una etapa de diagnóstico de la enfermedad o trastorno, preferiblemente la enfermedad de Gaucher, en un sujeto mediante una prueba genética, que comprende secuenciar un gen, preferiblemente secuenciar un gen cuya mutación se sabe por el experto en la técnica que provoca la enfermedad o trastorno, más preferiblemente secuenciar el gen cerebrosidasa en caso de la enfermedad de Gaucher; y comparar los resultados de dicho método y dicha prueba genética. Un sujeto sano como se usa en esta memoria, preferiblemente se considera que está sano con respecto a una enfermedad o trastorno si dicho sujeto no sufre los síntomas asociados con dicha enfermedad o trastorno y si el resultado de una prueba genética no revela mutaciones de un gen cuya mutación se sabe por un experto en la técnica que provoca la enfermedad o trastorno. Un sujeto sano también se entiende que es un sujeto que da positivo en que no tiene la enfermedad de Gaucher.

El término "cualificar el estado de la enfermedad de Gaucher" en un sujeto como se usa en esta memoria, preferiblemente significa una clasificación de un perfil de biomarcador del sujeto seleccionado del grupo que comprende identificar o detectar la presencia o ausencia de la enfermedad de Gaucher en el sujeto, predecir el comienzo de o el riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher en el sujeto, determinar la evolución de la enfermedad de Gaucher en un sujeto, determinar y/o predecir la gravedad de la enfermedad de Gaucher en un sujeto, determinar si un sujeto sufre un estado temprano de enfermedad de Gaucher o un estado avanzado o desarrollado de la enfermedad de Gaucher o determinar si un nivel de biomarcador en un sujeto ha cambiado significativamente con el tiempo.

El término "gestionar el tratamiento del sujeto" o "gestión del sujeto" como se usa en esta memoria, se refiere preferiblemente al comportamiento del clínico o médico posterior a la determinación del estado de la enfermedad de Gaucher. Por ejemplo, si el resultado del método según la presente invención no es concluyente o hay razones para que la confirmación del estado sea necesaria, el médico puede ordenar nuevas pruebas, tales como probar la función de la glucocerebrosidasa y/o secuenciar el código genético de la glucocerebrosidasa. De forma alternativa, si el estado indica que es apropiado tratar para la enfermedad de Gaucher, el médico puede hacer un programa para que el sujeto

se trate para la enfermedad de Gaucher. Asimismo, si el estado es negativo o si los resultados muestran que el tratamiento ha tenido éxito, no es necesaria gestión adicional. Sin embargo un experto en la técnica sabrá inmediatamente que además de la terapia génica cualquier terapia aplicada, por ejemplo TSE y/o TRS tiene que aplicarse toda la vida a un paciente con enfermedad de Gaucher. Además es una realización de la presente invención que la gestión del tratamiento del sujeto comprenda la valoración de una dosis de un fármaco aplicado como un tratamiento para la enfermedad de Gaucher, por ejemplo, unidades de enzima recombinante aplicada en TSE, administradas a un paciente. En algunas realizaciones de los métodos de la presente invención en donde un nivel de un biomarcador presente en una muestra de un sujeto se determina en varios puntos en el tiempo, o se compara con otros niveles del biomarcador, un nivel límite y/o un nivel de dicho biomarcador en un control, un experto aplicará o no una terapia, o cambiará una terapia ya aplicada para tratar o no tratar, o continuar tratando la enfermedad de Gaucher.

Está en la presente invención que un experto aplicará una dosis y/o mantendrá una dosis o cambiará una dosis, por ejemplo, aplicará una dosis o una dosis mayor, es decir, elevará una dosis, si dicha comparación del nivel de un biomarcador muestra por ejemplo que el nivel de dicho biomarcador es mayor que por ejemplo, un nivel límite, es decir se diagnostica que el paciente tiene la enfermedad de Gaucher; o que un nivel determinado en el mismo paciente antes en el tiempo es menor o igual, es decir, una terapia aplicada no es suficiente, es decir no da por resultado una disminución en el nivel. Por otro lado el experto aplicará o no aplicará una dosis o mantendrá o reducirá una dosis, por ejemplo no aplicará una dosis o una menor dosis, es decir disminuirá una dosis, si dicha comparación del nivel de un biomarcador muestra por ejemplo que el nivel de dicho biomarcador es menor que por ejemplo, un nivel límite, es decir se diagnostica que el paciente no tiene la enfermedad de Gaucher; o que un nivel determinado en el mismo paciente antes en el tiempo es mayor, es decir una terapia aplicada es suficiente, es decir no da por resultado una disminución del nivel. En una realización de la presente invención un nivel relativamente alto de liso-Gb1 libre basado en dicha comparación es indicativo para aplicar una alta dosis de enzima recombinante aplicada en la TSE y/o un relativamente bajo nivel de liso-Gb1 libre basado en dicha comparación es indicativo para aplicar una baja dosis de enzima recombinante aplicada en la TSE. Sin embargo también se entenderá inmediatamente que un experto considerará el historial de un paciente, es decir un experto que gestiona el tratamiento del sujeto de un paciente que sufre de enfermedad de Gaucher y que está tratado de manera que un nivel de biomarcador es menor que un nivel límite, por ejemplo, no decidirá parar el tratamiento en vez de disminuir una dosis y aumentar el tiempo entre más aplicaciones de los métodos de la presente invención.

La evolución de la enfermedad de Gaucher puede determinarse por el método según la presente invención que se define en las reivindicaciones determinando un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto en diferentes puntos temporales durante la evolución de la enfermedad. Es importante anotar que una única aplicación de un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher descrito aquí permite diagnosticar la enfermedad de Gaucher y puede comprender una etapa de gestión del tratamiento del sujeto en base al diagnóstico de si el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher. Si un sujeto cuya muestra se somete por consiguiente a dicho método da positivo de sufrir o estar en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher un médico experto sabrá como decidir respecto a la gestión del tratamiento del sujeto, es decir como se tratará el sujeto, por ejemplo, aplicando una cierta dosis de enzima en relación con una TSE. Se entenderá inmediatamente que independientemente de la decisión de un médico experto sobre como gestionar el tratamiento del sujeto el médico experto decidirá para al menos una aplicación adicional del método según la presente invención en un punto temporal posterior. Es por consiguiente una realización de la presente invención que los niveles del biomarcador determinados en los diferentes puntos temporales, en donde diferentes puntos temporales significa al menos dos puntos temporales, pueden compararse. Sin desear estar atado por ninguna teoría los autores de esta invención han encontrado que el nivel del biomarcador de la presente invención en muestras de un paciente particular puede correlacionarse con la gravedad de la enfermedad en dicho paciente en el momento temporal en que se toma la muestra del paciente. Se entenderá por consiguiente de forma inmediata que un nivel elevado del biomarcador determinado en la muestra de un punto temporal posterior en comparación con el nivel del biomarcador determinado en la muestra de un punto temporal más temprano es indicativo de un estado más grave del sujeto en el punto temporal posterior en comparación con el estado del sujeto en el punto temporal más temprano. Un nivel disminuido del biomarcador determinado en la muestra de un punto temporal posterior en comparación con el nivel del biomarcador determinado en la muestra de un punto temporal más temprano es indicativo de un estado menos grave del sujeto en el punto temporal posterior en comparación con el estado del sujeto en un punto temporal más temprano. Por consiguiente, la invención que se define en las reivindicaciones proporciona un método para determinar la evolución de la enfermedad de Gaucher en un sujeto, en donde dicho método comprende la etapa de determinar en varios puntos en el tiempo un nivel de un biomarcador presente en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre. En un aspecto adicional la invención afecta a un método para determinar la efectividad de al menos un tratamiento aplicado a un sujeto que ha dado positivo por sufrir o estar en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher que comprende la etapa de determinar en varios puntos en el tiempo un nivel de un biomarcador presente en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre. Se entenderá inmediatamente por un experto en la técnica que el método de la presente invención permiten por tanto seleccionar una terapia /o ajustar las dosis y/o la dosificación de una terapia seleccionada en base a los resultados del método de la invención. Si por ejemplo el sujeto tiene un programa para tratarse de la enfermedad de Gaucher el método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según la presente invención puede aplicarse cada 3 meses y los niveles del biomarcador así determinados se compararán para determinar la efectividad del(de los) tratamiento(s) y/o terapia/terapias aplicada(s) al sujeto. Si el sujeto alcanza un estado, en donde se mantiene un nivel estable del biomarcador en el tiempo la frecuencia de aplicación del método para diagnosticar la enfermedad de

Gaucher en un sujeto según la presente invención puede reducirse a cada 6 meses. Si la dosis de la terapia se cambia, por ejemplo, las unidades de enzima recombinante aplicadas en la TSE se reducen o aumentan, la frecuencia de aplicación del método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según la presente invención puede volverse a ajustar a 3 meses. Comparando los niveles determinados del biomarcador en las muestras del sujeto el médico experto reconocerá si el nivel del biomarcador aumenta, disminuye o si se mantiene un nivel estable del biomarcador en el tiempo. Por consiguiente, el médico experto puede decidir reducir la dosis de la terapia, por ejemplo las unidades de enzima recombinante aplicadas en la TSE; aumentar la dosis de la terapia; o mantener la dosis de la terapia según la comparación de los niveles del biomarcador determinados con el método según la presente invención. Una reducción de aproximadamente el 60% del nivel de liso-Gb1 libre en un periodo de 12 meses es indicativa de una terapia exitosa para la enfermedad de Gaucher, en donde la reducción como se usa en esta memoria, preferiblemente significa que el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método de la presente invención determinado al final de un periodo de tiempo se compara con el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método de la presente invención determinado al comienzo de dicho periodo de tiempo. Por consiguiente el médico experto puede decidir reducir la dosis de la terapia aplicada o mantener la dosificación de la terapia. Si la reducción del nivel de liso-Gb1 libre es significativamente más débil el médico experto puede decidir aumentar la dosificación de la terapia. Es también un mérito de los presentes inventores el haber reconocido que la reducción del nivel de liso-Gb1 libre correlaciona con la efectividad de una terapia. Cuanto más fuerte sea la reducción del nivel de la liso-Gb1 libre en un periodo de tiempo, por ejemplo 12 meses, más exitosa será una terapia, tal como por ejemplo TSE, TRS o una terapia basada en chaperona. Es por consiguiente una realización adicional de la presente invención que el método de la presente invención sea para comparar la efectividad de una terapia o de al menos dos terapias aplicadas a un sujeto.

Un experto en la técnica sabrá por consiguiente que la progresión, es decir la evolución de la enfermedad de Gaucher, además de la efectividad de una terapia en un único sujeto puede monitorizarse mediante determinación frecuente del nivel de liso-Gb1 libre en muestras del sujeto.

En un aspecto adicional la presente invención afecta a un método para determinar la efectividad de al menos un tratamiento aplicado a un sujeto que ha dado positivo en sufrir o estar en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher que comprende la etapa de determinar en varios puntos en el tiempo un nivel de un biomarcador presente en una muestra del sujeto, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre. En conexión con lo que se ha esbozado anteriormente en relación con la gestión del tratamiento del sujeto un experto en la técnica entenderá inmediatamente que la efectividad de un tratamiento o la combinación de al menos dos tratamientos puede compararse aplicando el método de la presente invención. Por consiguiente es posible probar y comparar varios nuevos fármacos, formas de dosificación, dosis o tratamientos para la enfermedad de Gaucher mediante el método de la presente invención.

El método descrito para diagnosticar la enfermedad de Gaucher es independiente de si el sujeto ha sido o no ha sido tratado anteriormente para la enfermedad de Gaucher. Por consiguiente la muestra del sujeto puede ser una muestra de un sujeto que ha sido tratado anteriormente para la enfermedad de Gaucher además de una muestra de un sujeto que no ha sido tratado anteriormente para la enfermedad de Gaucher. Es por consiguiente una realización adicional de la presente invención que el método de la presente invención comprende una etapa de gestión del tratamiento del sujeto y/o determinación de un nivel del biomarcador en la muestra del sujeto después de la gestión del sujeto. Dicho tratamiento del sujeto puede basarse en el diagnóstico de si el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher; en la detección del biomarcador en una muestra del sujeto después de la gestión del sujeto; o en la determinación del nivel del biomarcador en la muestra del sujeto después de la gestión del sujeto. Sin embargo un experto en la técnica entenderá que una muestra de algunos pacientes que no tienen la enfermedad de Gaucher o de algunos pacientes que están tratados con éxito para la enfermedad de Gaucher mostrará un nivel de liso-Gb1 libre menor que el límite de detección.

Sin desear estar atado por cualquier teoría los autores de esta invención asumen que el nivel de liso-Gb1 libre presente en una muestra de un sujeto correlaciona además con la gravedad de la enfermedad en un sujeto que sufre de enfermedad de Gaucher. En conexión con esto los autores de esta invención encontraron evaluando los resultados proporcionados en esta memoria (por ejemplo mostrados en la Fig. 4 en esta memoria) que aunque, en principio, el nivel de liso-Gb1 libre es diferente en individuos particulares, y más específicamente puede ser diferente en individuos particulares que tienen la(s) misma(s) mutación(ones), que cuanto mayor es un nivel de liso-Gb1 libre, mayor es la gravedad de una evolución de la enfermedad de Gaucher en términos de una media estadística según una puntuación clínica. De este modo el nivel de liso-Gb1 libre correlaciona con la gravedad de la enfermedad de Gaucher en que en los pacientes que dan positivo para distintas mutaciones del gen glucocerebrosidasa que se sabe que provoca generalmente una evolución suave (por ejemplo mutación N370S) o más grave (por ejemplo mutación L444P) de la enfermedad de Gaucher, un nivel de liso-Gb1 libre determinado en dichos pacientes correlacionó estadísticamente con la gravedad relacionada generalmente con dicha mutación.

Por consiguiente la presente descripción afecta a un método para determinar la gravedad de la enfermedad de Gaucher en un sujeto que comprende una etapa de

a) determinar un nivel del biomarcador presente en una muestra del sujeto en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre y una etapa de

b) determinar la gravedad de la enfermedad de Gaucher, por ejemplo, comparando el nivel de liso-Gb1 libre en un

sujeto determinado preferiblemente mediante un método de la presente invención con una puntuación clínica.

En conexión con esto es importante anotar que si se determina un nivel de liso-Gb1 libre en las muestras de los pacientes que sufren de enfermedad de Gaucher que muestran la mutación L444P en la secuenciación del gen cerebrosidasa (homocigoto y heterocigoto compuesto) sometido a un método de la presente descripción un nivel medio de liso-Gb1 libre es mayor que el nivel medio de la liso-Gb1 libre determinado en muestras de los pacientes que sufren de enfermedad de Gaucher que muestran la mutación N370S en la secuenciación del gen cerebrosidasa, aplicando el mismo método (Fig. 4). La mutación L444P se conoce por provocar una evolución más grave de la enfermedad de Gaucher – esto es especialmente cierto en el caso de que el sujeto sea homocigoto como dicha mutación. En correspondencia con eso se determina un nivel medio más alto de liso-Gb1 libre en el homocigoto en comparación con la mutación N370S homocigótica (194 ng/ml y 159 ng/ml, respectivamente, véase la Fig. 4). Además los pacientes que tienen una mutación L444P heterocigoto compuesto tienen un nivel de liso-Gb1 libre significativamente menor que los homocigotos (89 ng/ml y 45,4 ng/ml, respectivamente). Un experto en la técnica conocerá valores clínicos para categorizar la gravedad de la enfermedad de Gaucher o los síntomas o una totalidad de síntomas de la misma. Es por consiguiente una realización del método de la presente invención que la evolución de la enfermedad de Gaucher en un paciente se prediga y más particularmente la gravedad de la enfermedad de Gaucher se determine en base al nivel del biomarcador determinado según el método de la presente invención.

Es una realización de la presente invención definida en las reivindicaciones que los niveles de quitotriosidasa determinados en pacientes que no tienen una mutación del gen quitotriosidasa, en particular que no tienen una duplicación de pb 24 como se describe en esta memoria, sirvan como una base para correlacionar la gravedad de la enfermedad de Gaucher en que un nivel medio de quitotriosidasa determinado en una muestra de dichos pacientes como se describe en esta memoria se correlaciona con una gravedad de la enfermedad de Gaucher. Por consiguiente, por ejemplo un nivel de quitotriosidasa por debajo de 200 nmolMU/h/ml se correlaciona con un estado de la enfermedad de Gaucher de un paciente que no sufre de enfermedad de Gaucher. En conexión con esto es importante anotar que un paciente tratado para la enfermedad de Gaucher puede mostrar también un nivel de quitotriosidasa por debajo de 200 nmolMU/h/ml. Un nivel de más de 2000 nmolMU/h/ml se correlaciona con un estado “avanzado” o “grave” de la enfermedad de Gaucher y un nivel de quitotriosidasa de 200 a 2000 nmolMU/h/ml se correlaciona con un estado “suave” de la enfermedad de Gaucher.

En conexión con esto es importante anotar que un nivel de quitotriosidasa de 200 a 1000 nmolMU/h/ml puede encontrarse también en una muestra de un sujeto que sufre de otra TAL tal como enfermedad de Niemann-Pick tipo C o la enfermedad de Krabbe, dejando así inadecuado el uso de la quitotriosidasa para diagnosticar la enfermedad de Gaucher. Por lo tanto, las consideraciones esbozadas anteriormente en conexión con el uso de un nivel de quitotriosidasa para la correlación con la gravedad de la enfermedad de Gaucher se aplican típicamente solo para pacientes en donde la presencia o ausencia de enfermedad de Gaucher y/u otros TAL conocidos por mostrar niveles elevados de quitotriosidasa esté probada por análisis mutacional.

Si un nivel de liso-Gb1 libre se determina según los métodos de la presente invención en dichos pacientes que no tienen una mutación del gen quitotriosidasa, en particular que no tienen una duplicación del pb 24 como se describe en esta memoria, dicho nivel de liso-Gb1 libre determinado en una muestra de cada uno de dichos pacientes se correlaciona con el nivel de quitotriosidasa de dichos pacientes y/o el grado de gravedad de la enfermedad de Gaucher y/o el estado de la enfermedad de Gaucher de dicho paciente. Por consiguiente un grado de gravedad de la enfermedad de Gaucher y/o el estado de la enfermedad de Gaucher, que comprende sano, suave y grave se determina y más preferiblemente se correlaciona con los niveles de quitotriosidasa y/o intervalos de niveles de quitotriosidasa como se esboza anteriormente.

Un experto en la técnica sabrá que un nivel del biomarcador de la presente invención determinado en una muestra de un sujeto en donde dicho nivel del biomarcador se correlaciona con la gravedad de la enfermedad de Gaucher como se describe anteriormente, será indicativo para aplicar una cierta terapia y/o dosis o dosificación de dicha terapia. Por ejemplo, si el nivel del biomarcador determinado según los métodos de la invención se correlaciona con estado de la enfermedad de Gaucher “grave” o “avanzado” se programará para el sujeto el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y el método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según la presente invención puede aplicarse cada 3 meses y los niveles del biomarcador así determinado se compararán para determinar la efectividad del(de los) tratamiento(s) y/o terapia/terapias aplicada(s) al sujeto. Si el sujeto alcanza un estado, en donde el nivel del biomarcador se correlaciona con una enfermedad de Gaucher “suave” o en donde se mantiene un nivel estable del biomarcador en el tiempo la frecuencia de la aplicación del método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según la presente invención puede reducirse a cada 6 meses.

En otro aspecto, la presente descripción está relacionada con un método para determinar la efectividad de una composición para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. Dicho método puede comprender las etapas de determinación de un nivel de liso-Gb1 libre en un sujeto que tiene la enfermedad de Gaucher; administración a dicho sujeto de dicho compuesto en una cantidad suficiente para determinar la efectividad de dicho compuesto; nueva determinación del nivel de liso-Gb1 libre en dicho sujeto; comparación del nivel de liso-Gb1 libre determinado antes y después de administrar dicha composición, en donde un menor nivel de liso-Gb1 libre determinado después de administrar dicha composición en comparación con el nivel de liso-Gb1 libre determinado después de administrar dicha composición indica la efectividad de dicho compuesto para tratar la enfermedad de Gaucher.

Lo anterior se ilustra ahora adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos a partir de las que pueden tomarse características, realizaciones y ventajas adicionales.

Más específicamente,

La Fig. 1A es un diagrama de cajas que indica los niveles de liso-Gb1 libre en ng/ml en plasma;

5 La Fig. 1B es un diagrama de cajas que indica los niveles de liso-Gb1 libre en ng/ml de plasma agrupados por género de los sujetos;

La Fig. 2A es un gráfico que muestra las curvas características operadas por un receptor (COR) de la liso-Gb1 libre y la quitotriosidasa;

La Fig. 2B es un gráfico que muestra las curvas características operadas por un receptor (COR) de liso-Gb1 libre y CCL18;

10 La Fig. 3A es un diagrama que muestra la liso-Gb1 libre en ng/ml en plasma como una función en el tiempo para un total de 20 pacientes con enfermedad de Gaucher alemanes;

La Fig. 3B es un diagrama que muestra la liso-Gb1 libre en ng/ml en plasma como una función en el tiempo para un total de 24 pacientes con enfermedad de Gaucher no tratados (10 pacientes alemanes, 14 pacientes israelíes);

15 La Fig. 3C es un diagrama que muestra la liso-Gb1 libre en ng/ml en plasma como una función en el tiempo para un total de 9 pacientes con enfermedad de Gaucher israelíes antes y después del comienzo de la terapia;

La Fig. 3D es un diagrama que muestra los valores basados en la regresión de liso-Gb1 libre en ng/ml en plasma como una función en el tiempo para los pacientes con enfermedad de Gaucher israelíes y alemanes antes y después del comienzo de la terapia;

La Fig. 4 es una tabla que muestra el nivel medio de liso-Gb1 libre para dos mutaciones frecuentes;

20 La Fig. 5A es un cromatograma de HPLC con espectrometría de masas que representa la intensidad del pico de liso-Gb1 libre y el PI de un sujeto sano;

La Fig. 5B es un cromatograma de HPLC con espectrometría de masas que representa la intensidad del pico de liso-Gb1 libre y el PI de un paciente con enfermedad de Gaucher;

25 La Fig. 5C es un cromatograma de HPLC con espectrometría de masas que representa la intensidad del pico de liso-Gb1 libre y PI de un paciente con enfermedad de Gaucher.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1A es un diagrama de cajas que indica los niveles de liso-Gb1 libre; el eje y demuestra los niveles convertidos en logaritmos de liso-Gb1 libre en ng/ml determinados en plasma de los pacientes por el método según la presente invención, en donde el eje x representa grupos de pacientes, que se han agrupado como se describe en el Ejemplo 2. El diagrama de cajas representa el percentil 25 y 75 de cada grupo de pacientes mediante el fondo y la parte superior de la caja, respectivamente; la banda cerca de la mitad de la caja representa el percentil 50 (es decir la media) de cada grupo. Los bigotes representan una desviación estándar por encima y por debajo de la media de los datos. Cualquier dato no incluido entre los bigotes se muestra como un valor atípico con un pequeño círculo o estrella. La línea horizontal representa el nivel límite de 5 ng/ml.

30 La Fig. 1B es un diagrama de cajas que indica los niveles de liso-Gb1 libre como se representa en la Fig. 1A agrupados adicionalmente por el género de los sujetos; el eje y representa los niveles logaritmizados de liso-Gb1 libre en ng/ml determinados en el plasma de los pacientes por el método según la presente invención, en donde el eje x representa grupos de pacientes, que se han agrupado como se describe en el Ejemplo 2 y además por el género de los pacientes. El diagrama de cajas representa el percentil 25 y 75 de cada grupo de pacientes por el fondo y la parte superior de la caja, respectivamente, la banda cerca del medio de la caja representa el percentil 50 (por ejemplo la media) de cada grupo. Los bigotes representan una desviación estándar por encima y por debajo de la media de los datos. Cualquier dato no incluido entre los bigotes se muestra como un valor atípico con un pequeño círculo o estrella. La línea horizontal representa el nivel límite de 5 ng/ml.

45 La Fig. 2A es un gráfico que muestra las curvas características operadas por un receptor (COR) de liso-Gb1 libre y quitotriosidasa; el eje x representa "1-especificidad" y el eje y representa la sensibilidad. La liso-Gb1 libre demuestra un 100% de sensibilidad y 100% de especificidad, en donde la quitotriosidasa tiene como mucho una sensibilidad de 0,9591 o 95,91%, respectivamente.

50 La Fig. 2B es un gráfico que muestra las curvas características operadas por un receptor (COR) de liso-Gb1 libre y CCL18; el eje x representa "1-especificidad" y el eje y representa la sensibilidad. La liso-Gb1 libre demuestra una sensibilidad de 100% y una especificidad de 100%, en donde CCL18 tiene como mucho una sensibilidad de 0,8658 y 86,58%, respectivamente.

La Fig. 3A el eje y representa los niveles de liso-Gb1 libre como una función en el tiempo determinados por el método según la presente invención en ng/ml de plasma de 20 pacientes con enfermedad de Gaucher alemanes que se sometieron a terapia, más precisamente TSE, durante la evolución del estudio. Cada curva y cada número de paciente, respectivamente, representa los niveles determinados en plasma recogidos del mismo paciente en diferentes puntos temporales como se indica en el eje x. El eje x representa los puntos temporales de la recogida de plasma, en donde el punto temporal cero indica la primera medida bajo terapia para cada paciente. Para el análisis del cambio del nivel de liso-Gb1 libre en el tiempo en pacientes con enfermedad de Gaucher como se describe en el Ejemplo 3 no se usaron datos agregados por aquellos pacientes para los que se ha analizado más de una muestra de sangre.

La Fig. 3B es un diagrama que muestra la liso-Gb1 libre como una función en el tiempo determinada por el método según la presente invención en ng/ml de plasma de un total de 24 pacientes con enfermedad de Gaucher no tratados (10 pacientes alemanes, 14 pacientes israelíes). No tratado como se usa en esta memoria, significa preferiblemente que no se ha aplicado ningún tratamiento, por ejemplo, terapia enzimática sustitutiva, con respecto a la enfermedad de Gaucher. Para el análisis del cambio del nivel de liso-Gb1 libre en el tiempo en los pacientes con enfermedad de Gaucher como se describe en el Ejemplo 3 no se usaron datos agregados para aquellos pacientes para los que se ha analizado más de una muestra de sangre.

La Fig. 3C es un diagrama que muestra la liso-Gb1 libre como una función en el tiempo determinándose la liso-Gb1 libre mediante el método según la presente invención en ng/ml de plasma de un total de 9 pacientes con enfermedad de Gaucher israelíes durante el tiempo antes y después del comienzo de la terapia. El eje x indica el tiempo en meses, en donde "0" indica el primer punto en el tiempo después de comenzar la terapia. La curva marcada con "total" representa los valores basados en la regresión de liso-Gb1 libre.

La Fig. 3D es un diagrama que muestra los valores basados en la regresión de liso-Gb1 libre como una función en el tiempo determinados por el método según la presente invención en ng/ml de plasma de unos pacientes con enfermedad de Gaucher israelíes y alemanes durante el tiempo antes y después del comienzo de la terapia. El eje x indica el tiempo en meses, en donde "0" indica el primer punto en el tiempo después del comienzo de la terapia. La curva marcada con "total" representa los valores basados en la regresión de liso-Gb1 libre.

La Fig. 4 es una tabla que muestra el nivel medio de liso-Gb1 libre en pacientes que han dado positivo para una de dos mutaciones frecuentes del gen glucocerebrosidasa, especialmente N370S y L444P, en el homocigoto además de en la situación heterocigótica compuesta, en donde la heterocigoticidad compuesta es la condición de tener dos alelos recesivos heterogéneos en una posición particular que puede provocar enfermedad genética en un estado heterocigoto. Un experto en la técnica sabrá que los pacientes que tienen una mutación L444P del gen glucocerebrosidasa también encaran un pronóstico más dañino, que es particularmente cierto en la situación homocigótica. Por consiguiente, es una realización de la presente invención que el método según la presente invención comprenda determinar la gravedad de la enfermedad de Gaucher. Dicha determinación de la gravedad de la enfermedad de Gaucher comprende determinar un nivel del biomarcador, preferiblemente liso-Gb1 libre, presente en la muestra del sujeto y/o comparando dicho nivel de dicho biomarcador determinado en muestras de sujetos que tienen diferentes mutaciones del gen glucocerebrosidasa y/o que no tienen mutación del gen glucocerebrosidasa. Los autores de esta invención han encontrado que en una muestra de un paciente que ha dado positivo por tener una mutación L444P homocigótica del gen cerebrosidasa el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método según la presente invención es aproximadamente 194 ng/ml y está elevado en comparación con el nivel de liso-Gb1 libre determinado en una muestra de un paciente que ha dado positivo por tener una mutación N370S homocigótica del gen cerebrosidasa, en donde el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método según la presente invención es aproximadamente 159 ng/ml). Los inventores también han encontrado que en una muestra de un paciente que ha dado positivo por tener una mutación L444P heterocigótica compuesta el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método según la presente invención es 89 ng/ml y es significativamente menor en comparación con el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método según la presente invención en una muestra de un paciente que ha dado positivo por tener una mutación L444P homocigótica en donde el nivel de liso-Gb1 libre determinado por el método según la presente invención es aproximadamente 45,4 ng/ml. Sin desear estar atado por la teoría los autores de esta invención creen que el nivel de liso-Gb1 libre en una muestra de un sujeto determinado por un método de la presente invención es indicativo de la gravedad de la enfermedad de Gaucher. Es por consiguiente una realización adicional de la presente invención que el método de la presente invención es para determinar la efectividad de al menos un tratamiento aplicado a un sujeto que ha dado positivo por sufrir y/o estar en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher. Los números representados en corchetes indican los intervalos de concentración medida en el respectivo grupo de pacientes. RIC significa rango intercuartílico. Todos los pacientes que se sometieron a una terapia para la enfermedad de Gaucher se sometieron a TSE.

La Fig. 5A es un cromatograma de HPLC-espectrometría de masas que representa la intensidad del pico en cps de liso-Gb1 libre y PI de una muestra de un sujeto sano como una función sobre el tiempo de retención en minutos. El tiempo de retención de una sustancia como se usa en esta memoria, preferiblemente se representa en el eje x y es el tiempo transcurrido entre el tiempo de inyección de un soluto, por ejemplo un biomarcador según la presente invención y/o un patrón interno, y el tiempo de elución del pico máximo de dicho soluto. Un experto en la técnica sabrá que el tiempo de retención de una sustancia según los métodos descritos en esta memoria es una característica única de dicho soluto y puede usarse con propósitos de identificación. La disolución de trabajo del patrón interno que comprende liso-Gb2 como un patrón interno se añadió a la muestra como se describe en el Ejemplo 1. Es importante entender

que mediante dicha adición de PI a la muestra, es decir adición de la muestra, para someterse al método según la presente invención, la concentración de PI en la muestra se conoce y mediante la determinación del área bajo el pico, es decir el área del pico, del patrón interno en dicho cromatograma de HPLC con espectrometría de masas puede así calcularse la relación entre un área del pico y una concentración de una sustancia, por ejemplo de PI y/o un biomarcador. De forma más precisa, un experto en la técnica sabrá que un área del pico de una sustancia representada en un cromatograma de HPLC-espectrometría de masas, tal como el cromatograma de HPLC-espectrometría de masas representado en la Fig. 5A, Fig. 5B o Fig. 5C, representa una medida para una cantidad de dicha sustancia sometida a un análisis de HPLC-espectrometría de masas. Además, un experto en la técnica será capaz de calcular la cantidad de la sustancia en una muestra de un sujeto sometido a un análisis de HPLC-espectrometría de masas, por ejemplo, la cantidad de liso-Gb1 libre en una muestra sometida al método de la presente invención, usando una relación del área del pico de liso-Gb1 libre, cuya cantidad se va a determinar por dicho método y el área del pico del PI, por ejemplo liso-Gb2 libre; además de las curvas de calibrado generadas con dicho método y dicha liso-Gb1 libre y/o PI. Por consiguiente, esto permite posteriormente determinar un nivel de liso-Gb1 libre.

La Fig. 5B es un cromatograma de HPLC-espectrometría de masas que representa la intensidad del pico de liso-Gb1 libre y PI de una muestra de un paciente con enfermedad de Gaucher, en donde se determinó un nivel de 17,1 ng/ml de liso-Gb1 libre según el método de la presente invención como se describe esencialmente en el Ejemplo 1. Comparando dicho nivel del biomarcador en la muestra del sujeto con un nivel límite de 5 ng/ml, que se ha seleccionado de manera que una sensibilidad para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según los métodos de la presente invención es 100% y que una especificidad para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según los métodos de la presente invención es 100%, un nivel elevado del biomarcador en la muestra del sujeto en comparación con el nivel límite es indicativo de que el sujeto sufre de enfermedad de Gaucher.

La Fig. 5C es un cromatograma de HPLC-espectrometría de masas que representa la intensidad del pico de liso-Gb1 libre y del PI de una muestra de un paciente con enfermedad de Gaucher, en donde se determinó un nivel de 319 ng/ml de liso-Gb1 libre según el método de la presente invención como se describe esencialmente en el Ejemplo 1. Comparando dicho nivel del biomarcador en la muestra del sujeto con un nivel límite de 5 ng/ml, que se ha seleccionado de manera que la sensibilidad para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según los métodos de la presente invención es 100% y que una especificidad para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en un sujeto según los métodos de la presente invención es 100%, un nivel elevado del biomarcador en la muestra del sujeto en comparación con el nivel límite es indicativo de que el sujeto está sufriendo la enfermedad de Gaucher.

### Ejemplos

En los Ejemplos descritos a continuación se usó plasma humano como una muestra de un sujeto. Sin embargo un experto en la técnica sabrá que dependiendo de tipo de muestra usada de un sujeto, por ejemplo que comprende saliva, licor, plasma, suero, sangre completa, sangre en una tarjeta de filtro de sangre seca u otro producto sanguíneo, el método de la presente invención tiene que ajustarse al tipo de muestra y además tiene que determinarse un nivel límite para cada tipo de muestra según el método descrito en los siguientes ejemplos. Los autores de esta invención han encontrado que usar una muestra de suero humano en el método como se describe a continuación en vez de una muestra de plasma humano llevará a idénticos resultados según una detección de y un nivel así determinado de liso-Gb1 libre, si la muestra de suero humano y la muestra de plasma humano derivan del mismo sujeto, y se tomaron en el mismo punto temporal; y en donde las muestras se midieron en paralelo; y, más particularmente, llevarán al mismo nivel límite. Sin desear estar atado y en forma de ejemplos ilustrativos, mediante el uso de saliva de un paciente humano puede ajustarse un método en dependencia de un valor de pH de la muestra; o puede determinarse que un nivel límite es 20 ng/ml si se usa sangre completa o sangre recogida en una tarjeta de filtro de sangre seca como una muestra de un sujeto.

Ejemplo 1: Método para la detección de liso-Gb1 libre en suero humano

#### Equipo

Para detectar liso-Gb1 libre en una muestra de plasma de un sujeto se usó el siguiente equipo.

Aparato / pieza de equipo	Tipo / productor
Bomba de HPLC	Serie 200, Perkin Elmer, EE.UU.
Inyector de muestra	Serie 200, Perkin Elmer, EE.UU.
Horno de columna	Serie 200, Perkin Elmer, EE.UU.
Detector selectivo de masa	API 4000 Q TRAP, AB SCIEX, EE.UU./Canadá
Agitador de vórtice multi-tubo DVX-2500	Henry Troemner LLC, EE.UU.
Mezclador de vórtice	Vortex Genie 2; Scientific Industries, EE.UU.
Centrífuga	Megafuge 1.0; Heraeus, Alemania
Multipeta(s), pipeta(s)	Eppendorf, Alemania
Baño de agua	SW21-C, Julabo, Alemania

## Reactivos

Para detectar la liso-Gb1 libre en una muestra de plasma de un sujeto se usaron los siguientes reactivos.

Hasta el punto en que los valores dependen de la temperatura (por ejemplo, el valor de pH) dichos valores se determinaron a una temperatura de 25°C.

Reactivo	Pureza
Acetonitrilo (ACN)	Grado HPLC o grado gradiente
Acetona	99,5%
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Grado HPLC
Etanol (EtOH)	p.a., 96%
Ácido fórmico (FA)	p.a., 98-100%
Metanol (MeOH)	Gradiente (LiChrosolv)
Ácido trifluoroacético (TFA)	Pureza > 98%
Agua	ASTM-I

5

La abreviatura “p.a.” como se usa en esta memoria significa “pro análisis”.

El término “pureza” como se usa en esta memoria, significa preferiblemente un grado comercial de un compuesto químico que tiene una pureza del valor especificado anteriormente.

10 ASTM-I como se usa en esta memoria se refiere a una pureza estándar de grado de agua alcanzada por métodos de purificación que comprenden ósmosis inversa y oxidación ultravioleta (UV).

Preparación de los patrones de calibrado

Se preparó una disolución estándar de liso-Gb1 disolviendo 1,70 mg de liso-Gb1 (como se distribuye por Matreya) en 5 mL de MeOH.

15 Posteriormente se preparó la disolución V1-A-534 como una mezcla de 12 µL de disolución estándar de liso-Gb1 y 5 mL de DMSO/MeOH (1:1, v:v) como se representa a continuación:

Marca de disolución resultante	Conc. Exp. [µg/mL]	Volumen de disolución [µL]	Disolución	Volumen de disolvente [mL]	Disolvente
V1-A-534	0,79968	12	liso-Gb1 estándar	5	DMSO/MeOH (1:1, v/v)

Posteriormente se prepararon los patrones de calibrado añadiendo disolución V1-A-534 o patrones de calibrado más concentrados en el disolvente MeOH/agua (1:1, v/v).

Un esquema de adición detallado se representará a continuación.

Marca de disolución resultante	Concentración [ng/mL]	Volumen de disolución [µL]	Disolución	Volumen de disolvente [mL]	Disolvente	Volumen [ml]
Std9A-534	102,12	366	V1-A-534	2,5	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,866
Std8A-534	40,970	162	V1-A-534	3	MeOH/agua (1:1, v:v)	3,162
Std7A-534	15,321	353	Std9A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,353
Std6A-534	6,1464	353	Std8A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,353
Std5A-534	2,5906	135	Std8A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,135
Std4A-534	1,0577	53	Std8A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,053
Std3A-534	0,41004	55	Std7A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,055
Std2A-534	0,15868	53	Std6A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,053
Std1A-534	0,050049	39,4	Std5A-534	2	MeOH/agua (1:1, v:v)	2,0394

Para el calibrado, se usaron los patrones de calibrado que tienen siete niveles de concentración entre 0,400 y 100 ng/mL, especialmente los Patrones de Calibrado Std3A-534, Std4A-534, Std5A-534, Std6A-534, Std7A-534, Std8A-534 y Std9A-534.

Preparación de muestras de control

- 5 Las muestras de control se prepararon añadiendo disolución V1-A-534 o una muestra de control de mayor concentración en una matriz blanco.

Un esquema de adición detallado se representará a continuación.

Marca de la disolución resultante	Concentración [ng/mL]	Volumen de la disolución [µL]	Disolución	Volumen de la matriz blanco [mL]	Volumen [ml]
QC-A1-534	1,0013	173,6	QC-C1-534	8,5	8,6736
QC-B1-534	5,0008	944	QC-C1-534	8,5	9,444
QC-C1-534	50,029	634	V1-A-534	9,5	10,134

Matriz blanco

- 10 Como matriz blanco, se usó el plasma humano de un sujeto sano. Un experto en la técnica sabrá que dicho plasma de un sujeto sano contendrá un nivel nativo de liso-Gb1 libre. Dicho nivel nativo de liso-Gb1 libre es aproximadamente 1,4 ng/ml según los métodos de la presente invención. Por consiguiente es obvio que las muestras de control preparadas por adición de la matriz blanco, comprendiendo la matriz blanco dicho nivel nativo de liso-Gb1 libre, comprende además dicho nivel nativo de liso-Gb1 libre además del nivel de liso-Gb1 libre obtenido por adición con una disolución concentrada o una muestra de control más concentrada. Por consiguiente, el nivel de liso-Gb1 libre en las muestras de control es como sigue:

QC-A1-534	1 ng/mL + concentración nativa en matriz blanco
QC-B1-534	5 ng/mL + concentración nativa en matriz blanco
QC-C1-534	50 ng/mL + concentración nativa en matriz blanco

- 20 Un experto en la técnica sabrá que el plasma humano de un sujeto sano usado como matriz blanco puede comprarse en cualquier fuente comercial conocida por un experto en la técnica. Es importante anotar que si accidentalmente se usa plasma de un sujeto no sano, es decir, de un sujeto que tiene la enfermedad de Gaucher, como la matriz blanco, esto dará por resultado niveles inusualmente altos de liso-Gb1 libre en las muestras de control determinadas por el método según la presente invención y por consiguiente se reconocerá inmediatamente, ya que la tolerancia del método se determina por estar en un intervalo de 15% por encima o por debajo de los niveles estimados de los controles sometidos al método según la presente invención.

Muestras de estudio

- 25 Preparación de patrón interno

La disolución estándar del patrón interno (PI 1) se preparó disolviendo 1,00 mg de liso-Gb2 (como se distribuye por Matreya) en 2 mL de DMSO/MeOH (1/1, vol/vol).

- 30 Posteriormente se preparó la disolución de trabajo de patrón interno como una mezcla de 410 µL de disolución estándar de PI1 y 500 mL de etanol. El etanol puede comprarse en cualquier fuente comercial, en donde el etanol es etanol absoluto que tiene un grado adecuado para los métodos descritos en esta memoria. Un experto en la técnica reconocerá que proteínas contenidas en 50 µl de muestra tienen que precipitar si se añaden 100 µL de dicha disolución de trabajo de patrón interno a la muestra.

Almacenamiento de muestras y disoluciones

- 35 Las muestras de control o muestras de estudio o bien se almacenaron inmediatamente por debajo de -20°C de una vez o se transfirieron alícuotas en nuevos viales de cristal antes del almacenamiento en las mismas condiciones.

Las disoluciones concentradas (disoluciones estándar, V1-A-534, etc.) además de disoluciones estándar de patrón interno se congelaron por debajo de -20°C a la espera de la siguiente adición.

Las disoluciones de trabajo de patrón interno se almacenaron entre 2°C y 8°C hasta el uso.

- 40 Los autores de esta invención han encontrado que la liso-Gb1 libre es estable en las disoluciones mencionadas anteriormente. De forma más precisa, se encontró que el nivel de liso-Gb1 libre de una muestra de plasma y/o suero de un paciente con enfermedad de Gaucher determinado por los métodos según la presente invención eran idénticos,

5 si el nivel de liso-Gb1 libre se determinaba en dichas muestras antes y después del almacenamiento a 37°C durante 2 días. Por consiguiente, las disoluciones y muestras de la presente invención pueden transportarse en un número de formas bien conocidas por un experto en la técnica, en donde se prefiere el uso de una cadena fría para el transporte de material del paciente aunque no necesariamente se necesita. Un experto en la técnica también conocerá métodos y sus respectivas condiciones para el apropiado almacenamiento de disoluciones y muestras, en donde, por ejemplo, dichas disoluciones y muestras pueden almacenarse durante varias semanas.

Preparación de la muestra para el análisis

Todas las muestras usadas en una carga analítica se preparan para el análisis como sigue:

10 Las muestras congeladas se descongelaron a aproximadamente de 20 a 25°C en un baño de agua tomado en condiciones ambiente. Después de descongelar se mezclaron las muestras.

Se transfirieron 50 µL de la muestra en un vial de muestra.

Se añadieron 100 µL de disolución de trabajo de patrón interno (en EtOH) a la muestra.

La mezcla así obtenida se mezcló posteriormente usando un dispositivo de vórtice multi-tubo DVX-2500 a 2500 rpm durante aproximadamente 30 segundos.

15 La mezcla así obtenida se centrifugó por separación de fases a 4000 rpm durante 2 minutos.

Transferencia de un volumen del sobrenadante adecuado a los propósitos de inyección (aproximadamente 100 µL) en viales de automuestreador apropiados (cónicos).

Métodos

Parámetros cromatográficos y de automuestreador

20 Las muestras preparadas para el análisis como se describe anteriormente se sometieron posteriormente al método descrito a continuación:

Parámetro	Intervalo programado / descripción
Disolvente <b>A</b> de fase móvil	FA 50 mM en agua
Disolvente <b>B</b> de fase móvil	FA 50 mM en ACN/acetona (1:1; vol/vol)
Marcha cromatográfica	0,0-4,0 min gradiente lineal: 5% de B → 66% de B 4,1-5,1 min isocrático: 100% de B 5,1-5,9 min isocrático: 5% de B
Flujo	0,9 mL/min
Volumen de inyección	5 µL
Lavado del inyector	TFA al 0,1% en MeOH al 70%
Columna + precolumna	ACE 3 C8, 50 x 2,1 mm de DI + Guarda de seguridad C8
Temperatura de la columna	60°C
Tiempo de retención	Aprox. 3,4 a 3,6 min: liso-Gb1 y liso-Gb2 (PI)

La columna ACE 3 C8 (columna ACE C8 núm. ACE-112-0502) usada en esta memoria se ha comprado en Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen.

25 Se apreciará por un experto en la técnica que los parámetros donde se indica un intervalo “±” representan parámetros que pueden ajustarse entre secuencias. Una secuencia como se usa en esta memoria, preferiblemente es una carga de números definidos de muestras, preferiblemente 250 como máximo analizados secuencialmente, en donde los parámetros que comprenden flujo y temperatura permanecen inalterados. Los ajustes y calibrados realizados entre secuencias se conocen por los expertos en la técnica y comprenden el intercambio de la columna.

30 Estos ajustes dentro de los límites especificados son cambios menores y se graban en los datos sin procesar del estudio en la estación de medida.

Detección

Las muestras así preparadas se sometieron posteriormente al método de detección cuyos parámetros se describen a continuación:

35

<u>Modo de ionización de MS:</u>	Ionización por electrospray (IES)
<u>Polaridad de MS:</u>	Positivo
<u>Modo de detección de MS:</u>	Monitorización de reacción múltiple (MRM)
Temperatura del vaporizador:	500°C ± 50°C
Voltaje de ionización:	5,5 kV
Gas de disociación activada por colisión (DAC):	Bajo
Gas 1:	Presión = 310,26 kPa (45 psi)
Gas 2:	Presión = 413,68 kPa (60 psi)
Gas de cortina:	Presión = 275,79 kPa (40 psi)
Posición lateral:	5 unidades
Posición vertical:	4 unidades
Resolución del cuadrupolo	Unidad → unidad
<u>Transiciones</u>	462,4 → 282,2 m/z liso-Gb1
	624,5 → 282,2 m/z liso-Gb2 (Patrón Interno)
PD (potencial de desagrupado)	40 V
PSC (potencial de salida de la célula de colisión)	8 V

Un experto en la técnica conocerá que métodos para detectar liso-Gbl libre y/o determinar el nivel de liso-Gbl libre en una muestra de un sujeto usando el análisis espectrométrico de masas pueden también emplear otras transiciones y fragmentos que permitan la detección específica de y/o cuantificación de liso-Gbl libre en dicha muestra de un sujeto.

5 Evaluación y cálculo de resultados

Para evaluar y para calcular los resultados obtenidos con los métodos especificados anteriormente se aplicaron los siguientes protocolos.

Procedimiento de redondeo

10 Los datos de concentración alimentados y recuperados del sistema de datos cromatográficos (SDC) se redondearon a cinco dígitos significativos. Se realizaron cálculos adicionales en la hoja de cálculo para la exactitud computacional completa y posteriormente se redondearon a los dígitos significativos/sitios decimales a presentar. Por tanto, pueden darse desviaciones de los resultados intermedios provocados por el redondeo. La exactitud y los coeficientes de variación (CV) se presentarán con uno y dos sitios decimales, respectivamente.

15 Nota en referencia al procedimiento de redondeo: el último dígito presentado se redondearía al alza si el dígito posterior fuera igual o mayor que "5".

Regresión y estadísticas

20 En base a los patrones de calibrado se establecieron los ajustes de la curva de calibrado usando el software de procesado de datos por medio de relaciones de áreas de los picos (el área del pico de la liso-sustancia libre contenida en la muestra del sujeto/área del pico del patrón interno). Las concentraciones de la liso-sustancia libre se evaluaron usando un método de patrón interno. Un modelo de regresión cuadrática ( $y = ax^2 + bx + c$ ) que usa el factor de ponderación 1/concentración se usará para calcular la concentración de cada analito en cada carga a evaluar. Las concentraciones se calcularon por medio de la siguiente fórmula:

$$concentración = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(c - relación\ del\ área\ del\ pico)}}{2a}$$

25 En base a los valores medio en ella, los resultados de precisión (en términos de CV) y las exactitudes (fórmula mostrada a continuación) se calcularán usando el programa "Lotus 123".

$$exactitud\ (\%) = \frac{concentración\ calculada}{concentración\ esperada} \cdot 100$$

Los modelos estadísticos apropiados se describen en, por ejemplo:

Green, J.R., Statistical Treatment of Experimental Data (Elsevier, Nueva York, 1977), página 210 ff.

30 Lothar Sachs, Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden (Springer, Berlín, Heidelberg, Nueva York, Tokio 1984).

Software

La adquisición de datos, el procesado de datos, las estadísticas y cálculos se realizaron usando el software Analyst® 1.4.2 o superior (AB SCIEX, EE.UU./Canadá) además de Lotus 1-2-3 97 o superior (Lotus Corp, EE.UU.).

Manuales	
Manual	Arbeiten mit SmartSuite 97 (Lotus Development Corp., 1997)
Documentación de software usada	Documentación del Software Analyst® (AB SCIEX, EE.UU./Canadá): Manual del operador y apéndice del manual del operador "New Functionality in Analyst 1.2" y ayuda en red del Sistema Analyst 1.4 (o superior)

Ejemplo 2: Prueba genética y clasificación de los participantes del estudio

Después del consentimiento de los pacientes a la participación en el estudio, los pacientes se sometieron a una prueba genética para las mutaciones del gen glucocerebrosidasa. Por consiguiente, se secuenciaron de 5 a 10 ml de sangre en EDTA según Seeman et al. (Seeman et al., 1995). Se secuenciaron además otros genes que eran apropiados junto al gen glucocerebrosidasa, particularmente en los controles. Además se secuenció el gen quitotriosidasa para la detección de la duplicación del pb 24 como se menciona anteriormente. Dicha prueba genética se controló usando muestras de ensayo de pacientes de control combinados por edad y sexo.

Se ensayaron 253 sujetos.

Según el resultado de la prueba genética descrita anteriormente, los pacientes que participaron en el estudio se clasificaron en los siguientes grupos:

- 1) pacientes que tienen la enfermedad de Gaucher: el patrón de oro para el diagnóstico fue la detección de dos mutaciones patogénicas en el gen glucocerebrosidasa, o bien homocigoto o heterocigoto compuesto (el grupo se nombra en las figuras como "Gaucher");
- 2) pacientes que son vehículos heterocigotos de una mutación en el gen glucocerebrosidasa (típicamente familiares de pacientes afectados) (el grupo se nombra en las figuras como "heterocigoto")
- 3) pacientes con otros trastornos de almacenamiento lisosómico como control (el grupo se nombra en las figuras como "otros TAL"); éste comprende pacientes con deficiencia de esfingomielinasa (Niemann Pick A/B), enfermedad de Krabbe y Niemann Pick C1; todos los diagnósticos se han probado mediante la detección de dos mutaciones patogénicas
- 4) controles combinados por edad y género sanos (el grupo se nombra en las figuras como "control").

La siguiente tabla 1a muestra la clasificación de los pacientes en los grupos descritos anteriormente según los resultados de la prueba genética descrita anteriormente.

Tabla 1a: Sujetos clasificados por los resultados del análisis genético

Grupos (Dgn)	Casos					
	Válido		Perdido		total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Control	140	100,0%	0	0%	140	100,0%
Heterocigoto (vehículo)	13	100,0%	0	0%	13	100,0%
Gaucher	59	100,0%	0	0%	59	100,0%
Otros TAL	20	100,0%	0	0%	20	100,0%

La distribución del género de los 232 pacientes alemanes además de la distribución del género de los 21 pacientes israelíes se representa en la Tabla 1b.

Tabla 1b: 232 sujetos alemanes y 21 israelíes clasificados por género

	Alemanes		Israelíes	
	N	%	N	%
Total	232		21	
<b>Sexo</b>				
Hombre	146	57,0	11	52,4
Mujer	110	43,0	10	47,6

5 La siguiente tabla 1c muestra la distribución de la edad de los 232 pacientes alemanes y la clasificación de dichos pacientes en base a los resultados de la prueba genética descrita anteriormente además del género de dichos pacientes.

Tabla 1c: Características del paciente de 253 sujetos

	Controles sanos		Vehículo heterocigoto		Gaucher		Otros TAL	
<b>N sujetos</b>	140		13		80		20	
<b>N muestras</b>	155		15		287		28	
Edad en años (mediana, rango intercuartílico)	28,5 (4,8-47,3)		35,0 (30,5-58,5)		30,0 (8,0-48,0)		23,5 (4,0-43,5)	
(número de casos)	(n=134)		(n=13)		(n=79)		(n=14)	
	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
n	79	61	8	5	45	35	12	8
Edad (mediana, rango intercuartílico)	25,5 (5,3-47,0)	34,0 (3,8-48,8)	33,5 (26,0-51,8)	39,0 (33,0-69,5)	22,0 (7,5-50,0)	32,5 (12,8-43,3)	21,0 (3,3-30,3)	34 (8,8-45,8)

10 El nivel de liso-Gbl libre en las muestras de los dichos 253 sujetos se determinó según el método descrito en el Ejemplo 1. El nivel de la liso-Gbl libre en las muestras de dichos pacientes dependiendo de la clasificación por análisis genético se muestra en la Fig. 1A. La Fig. 1B muestra el nivel de liso-Gbl libre en muestras de dichos pacientes dependiendo de la clasificación en base a los análisis genéticos y en el género de los pacientes.

15 El tipo de mutación y la distribución de los tipos de mutaciones del gen glucocerebrosidasa en pacientes clasificados como pacientes con enfermedad de Gaucher según los resultados obtenidos en la prueba genética como se describe anteriormente se representan en la Tabla 2 posterior.

Tabla 2: Distribución de mutaciones que se detectan en la población de Gaucher alemana (166 alelos)

Tipo de mutación	n	%
N370S	54	32,5%
L444P	33	19,9%
RecNcil	15	9,0%
G202R	4	2,4%
D409H	3	1,8%
Rec	3	1,8%
G355A	2	1,2%
IVS2+1A>G	2	1,2%
L335V	2	1,2%
L444R	2	1,2%
R120W	2	1,2%
R285H	2	1,2%
RecAP2	2	1,2%
T226I	2	1,2%
T231R	2	1,2%
T491I	2	1,2%
V398L	2	1,2%
A46term	1	0,6%
A495P	1	0,6%
A88P	1	0,6%
C287F	1	0,6%
F216Y	1	0,6%
G82A	1	0,6%
H255Q	1	0,6%
I93F	1	0,6%

Tipo de mutación	n	%
IVS3+1G>A	1	0,6%
L324Q	1	0,6%
N234S	1	0,6%
N409S	1	0,6%
P161R	1	0,6%
P178S	1	0,6%
P29X	1	0,6%
P68fs	1	0,6%
Q326K	1	0,6%
R120Q	1	0,6%
R257ter	1	0,6%
R359Q	1	0,6%
R502C	1	0,6%
R502H	1	0,6%
RecAF3	1	0,6%
RecAF4	1	0,6%
RecAH3	1	0,6%
RecTL	1	0,6%
S13L	1	0,6%
S146L	1	0,6%
S237F	1	0,6%
S364N	1	0,6%
V398L	1	0,6%
W184R	1	0,6%

Medida de la actividad quitotriosidasa

5 La actividad quitotriosidasa se midió como se describe esencialmente en Hollak et al. (Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. J Clin Invest. Marzo de 1994; 93(3):1288-92) incubando 10 µl de EDTA plasma o suero con 100 µl de sustrato fluorogénico 0,022 mM 4-metilumbeliferil-fl-D-NN,N'-triacetilquitotriosa (4 MU-quitotriósido; Sigma Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) como sustrato en tampón de McIlvain (ácido cítrico 0,1 M/fosfato sódico 0,2 M, pH 5,2) a 37°C. En los pacientes con enfermedad de Gaucher, las muestras se diluyeron 50x en agua desmineralizada antes de la incubación. Después de 10 30 min la reacción se paró con 200 µl de tampón de glicina 0,5 M/NaOH (pH 10,5) mediante mezcla a temperatura ambiente. La hidrólisis del sustrato mediante quitotriosidasa produce la molécula fluorescente 4-metilumbeliferona, que se cuantificó con un fluorímetro (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza), excitación a 366 nm y emisión a 446 nm, y se comparó con una curva de calibrado de 4-metilumbeliferona estándar. La actividad quitotriosidasa se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por hora por mililitro de suero incubado.

15 Cuantificación de CCL18

La CCL18 en plasma se cuantificó con un kit de Desarrollo ELISA DuoSet comprado a R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU., de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del método era 5 pg/ml.

Ejemplo 3: Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher usando liso-Gb1 libre como un biomarcador

20 Los protocolos descritos en el Ejemplo 1 anterior se usaron para generar cromatogramas de HPLC-espectrometría de masas de 485 muestras de sangre derivadas de los 253 sujetos. Los cromatogramas de HPLC-espectrometría de masas ejemplares que representan la intensidad del pico de liso-Gb1 libre y PI de tres muestras de dos pacientes con enfermedad de Gaucher y una persona de control sana se representan en la Fig. 5A, Fig. 5B y Fig. 5C.

25 El patrón de oro para la clasificación de los pacientes en el grupo "Gaucher", se basó en la secuenciación del área de codificación entera además de los límites intrón-exón del gen glucocerebrosidasa según la prueba genética como se describe en el Ejemplo 2 que da por resultado la detección o bien una mutación homocigota o una heterocigotidad compuesta.

Los resultados de una determinación de los niveles de quitotriosidasa o CCL18 en las muestras de pacientes estuvieron disponibles en 58 o 44 pacientes con enfermedad de Gaucher, respectivamente. Dichos resultados se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 2.

5 Por comparación del valor diagnóstico de los diferentes biomarcadores y por el cálculo de las correlaciones entre los biomarcadores los datos obtenidos por el método descrito anteriormente se agregaron primero usando el nivel medido más pronto de cada marcador para los pacientes con enfermedad de Gaucher antes de la terapia y el nivel más alto para los que no tienen Gaucher para un paciente particular si está disponible más de una muestra de sangre.

10 Se usaron técnicas estadísticas de muestras emparejadas para la comparación de dos biomarcadores. El método explota la equivalencia matemática del ABC a la estadística U de Mann-Whitney (Delong E.R., Delong D.M., Clarke-Pearson D.L. (1988) Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach, *Biometrics*, 44, 837-45).

15 La exactitud de los niveles de los diferentes biomarcadores (liso-Gbl libre, quitotriosidasa y CCL18) obtenida por el método descrito en el Ejemplo 1 anterior se evaluó para discriminar pacientes con enfermedad de Gaucher de pacientes que no tienen la enfermedad de Gaucher usando el análisis de la curva Característica operada por un receptor (COR) (Metz C.E. (1978) Basic principles of ROC analysis, *Semin Nucl Med*, 8, 283-98; Zweig M.H., Campbell G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, *Clin Chem*, 39, 561-77). La medida de la actividad quitotriosidasa y CCL18 se realizó como se describe en el Ejemplo 2 en esta memoria.

20 Las curvas COR se calcularon usando PASW Statistics 18, versión distribuida 18.0.2 (© SPSS, Inc., 2009, Chicago, IL, www.spss.com). Las comparaciones de las curvas COR y los modelos mixtos lineales se hicieron usando software SAS, versión 9.2 del Sistema SAS para Windows. (© 2008 SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.).

Las curvas COR que comparan la exactitud de los niveles de quitotriosidasa y liso-Gbl libre se muestran en la Fig. 2A y las curvas COR que comparan la exactitud de los niveles de CCL18 y liso-Gbl libre se muestran en la Fig. 2B, respectivamente.

25 Los resultados representados en las curvas COR mostradas en la Fig. 2A y la Fig. 2B también muestran la especificidad y la sensibilidad del método según la presente invención dependiendo de los diferentes niveles límite de la liso-Gbl libre. La Tabla 3 posterior muestra por consiguiente la sensibilidad y la especificidad del método según la presente invención dependiendo de los diferentes niveles límite de la liso-Gb1 libre.

30 Tabla 3: Sensibilidad y especificidad del método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher dependiendo del nivel límite de la liso-Gbl libre en los sujetos alemanes (n=232)

Nivel límite	>2,8 [ng/mL]	>4,1 [ng/mL]	>5 [ng/mL]
Sensibilidad	100,0%	100,0%	100,0%
Especificidad	97,7%	99,4%	100,0%

35 Comparar el nivel del biomarcador en una muestra de un sujeto determinado por el método según la presente invención con un nivel límite, preferiblemente un nivel límite que permite un diagnóstico que tiene alta especificidad y alta sensibilidad permite por tanto diagnosticar la enfermedad de Gaucher en dicho sujeto, en donde un nivel elevado del biomarcador en la muestra del sujeto en comparación con el nivel límite es indicativo de que el sujeto sufre o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher y en donde un nivel menor del biomarcador en la muestra del sujeto en comparación con el nivel límite es indicativo de que el sujeto no sufre o no está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher.

40 El área bajo la curva (ABC) y los límites de confianza al 95% para los diferentes biomarcadores se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4: Sensibilidad y especificidad para diferentes biomarcadores con respecto a diagnosticar Gaucher.

	Quitotriosidasa (n=228/58 Gaucher)	CCL18 (n=210/44 Gaucher)	Liso-Gb1 libre (n=232/59 Gaucher)
Nivel límite	>145 [nmolMU/h/ml]	>166 [ng/ml]	>5 [ng/mL]
Sensibilidad	<b>93,1%</b>	<b>79,5%</b>	<b>100,0%</b>
Especificidad	<b>90,0%</b>	<b>79,5%</b>	<b>100,0%</b>
ABC y LC al 95% en análisis COR	0,96 (0,92-1,00)	0,87 (0,80-0,93)	1,00 (1,00-1,00)

5 Por consiguiente, en la tabla 3 la sensibilidad y la especificidad de los biomarcadores representados usados en un método para diagnosticar la enfermedad de Gaucher en una muestra de un sujeto se comparan usando un nivel límite que tiene el ABC mayor en el respectivo método usando el respectivo biomarcador. Se representa el nivel límite ideal del respectivo método. La medida de la actividad quitotriosidasa y CCL18 se realizó como se describe en el Ejemplo 2 en esta memoria. La liso-Gbl libre se determinó según el método de la presente invención. El nivel límite ideal es 5 ng/ml.

10 Un experto en la técnica sabrá que el método según la presente invención que usa liso-Gbl libre como un biomarcador para diagnosticar la enfermedad de Gaucher es claramente ventajoso sobre los métodos que usan CCL18 y quitotriosidasa. Esto es especialmente cierto ya que al menos el 6% de la población caucásica y hasta el 35% por ejemplo de la población latinoamericana, incluyendo aquellos con enfermedad de Gaucher, son deficientes en actividad quitotriosidasa.

Por consiguiente, los niveles de liso-Gbl libre determinados en una muestra de un sujeto según el método de la solicitud actual mayores que 5,0 ng/mL permiten diagnosticar que el sujeto está sufriendo o está en riesgo de desarrollar la enfermedad de Gaucher con una sensibilidad de y con una especificidad de 100%.

Ejemplo 4: Análisis del cambio de los biomarcadores con el tiempo

15 El método y los pacientes usados en conexión con este Ejemplo son los que se describen en los Ejemplos 1 a 3.

Para analizar como cambió el nivel de los biomarcadores en el tiempo en pacientes que tienen la enfermedad de Gaucher se analizaron datos no agregados para aquellos pacientes para los que se analizó más de una muestra de sangre. Se estableció un punto temporal cero a la primera medida bajo terapia para todos los pacientes.

Los niveles de liso-Gbl libre en el tiempo para pacientes individuales se muestran en la Fig. 3A, Fig. 3B y 3C.

20 Para probar la significancia de una reducción dependiente del tiempo de los niveles de liso-Gbl libre indicativa de una terapia con éxito, los niveles de liso-Gbl libre después del comienzo de una terapia se compararon con los niveles de liso-Gbl libre antes del comienzo de una terapia usando modelos mixtos lineales. Los pacientes no tratados no mostraron una reducción significativa de la liso-Gbl libre en el tiempo.

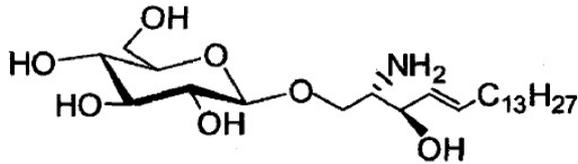
25 Por lo tanto los valores de los niveles de liso-Gbl libre se convirtieron en logaritmos para superar la asimetría en la distribución de los valores. Para tener en cuenta la heterogeneidad entre pacientes en los valores de partida además de en la velocidad de cambio se usaron modelos de intersección y pendiente aleatorios. En todos los modelos la heterogeneidad observada fue estadísticamente significativa. Solo se presentan los valores p para la reducción del tiempo lineal.

30 Los valores para el tiempo y los valores que incorporaron un término cuadrado para el tiempo se centraron para probar una relación curvilínea entre el tiempo y el nivel del marcador para la quitotriosidasa y para CCL18. Para la liso-Gbl libre el término cuadrado no mejoró el modelo y no se incorporó en el modelo final.

35 Como una terapia los pacientes alemanes se han tratado con 40 U/kg de peso corporal en la media, en donde las unidades se refieren a unidades de glucocerebrosidasa recombinante en la TSE. La reducción en liso-Gbl libre es específicamente intensa después del comienzo de la terapia (después de 6 meses  $<0,0001$ ). Pero además la reducción en el tiempo es significativa ( $<0,0001$ ). Hay una reducción de liso-Gbl libre después de 12 meses de tratamiento en un intervalo de 60% en la media.

**REIVINDICACIONES**

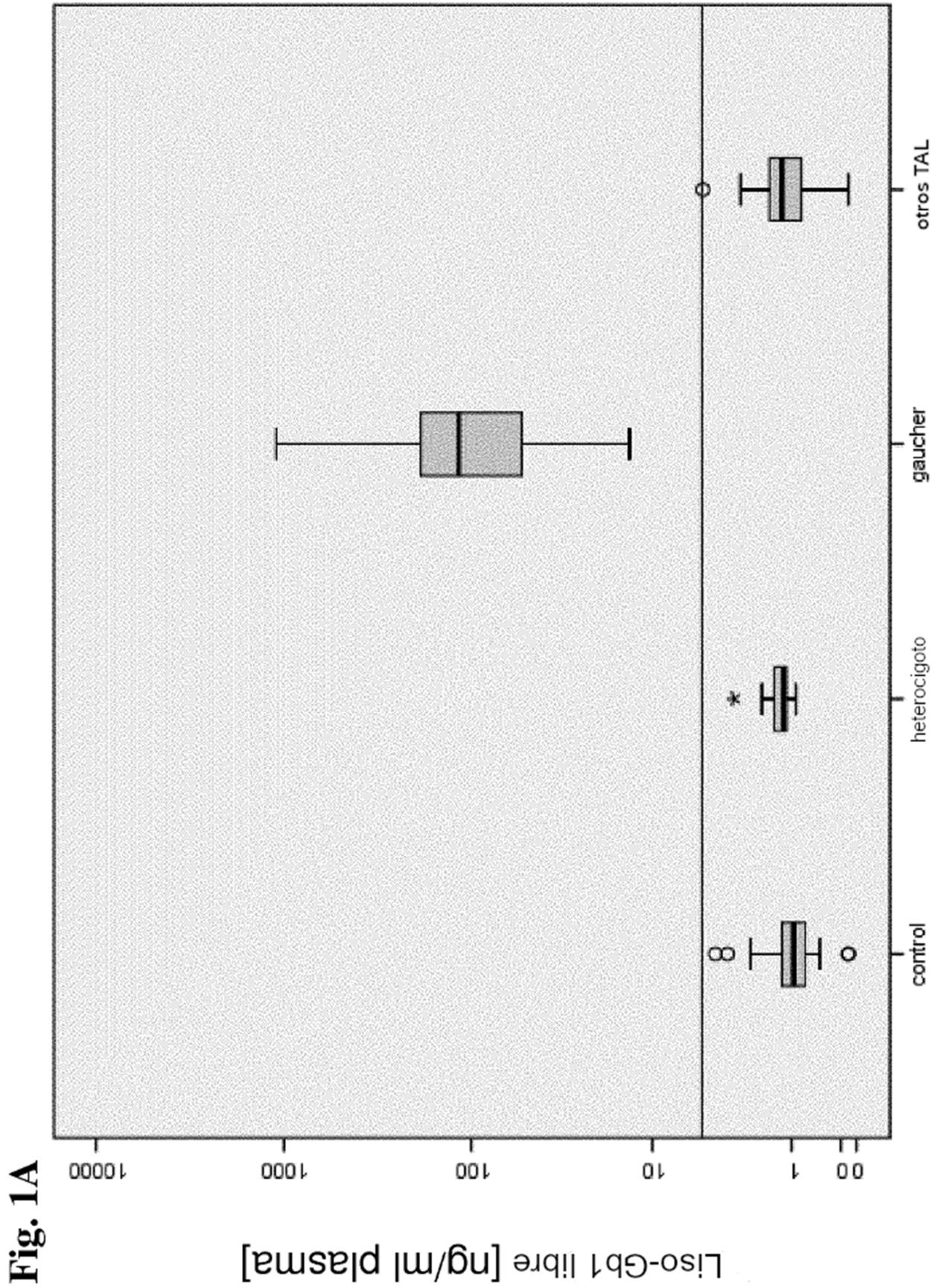
- 5 1. Un método para determinar la evolución de la enfermedad de Gaucher en un sujeto, que comprende la etapa de determinar en varios puntos en el tiempo un nivel de un biomarcador presente en una muestra del sujeto, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, un muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de sangre completa y una muestra de sangre completa recolectada en una tarjeta de filtro de sangre seca, en donde el biomarcador es liso-Gb1 libre, de fórmula (I):



(I),

y en donde el nivel del biomarcador es indicativo de la gravedad de la enfermedad en el sujeto.

- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto ha sido previamente tratado o diagnosticado de la enfermedad de Gaucher.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el nivel del biomarcador presente en la muestra del sujeto se determina periódicamente.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el nivel del biomarcador presente en la muestra del sujeto se determina cada 3 meses o cada 6 meses.
- 15 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde liso-Gb1 libre es liso-Gb1 tal como está presente en el sujeto y no el resultado de manipular la muestra del sujeto.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la muestra de sangre es una muestra de sangre completa o una muestra de filtro de sangre seca.
- 20 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el biomarcador se detecta por medio de inmunoensayo, análisis espectrométrico de masas, matriz de biochip, ácidos nucleicos funcionales y/o un derivado fluorescente de liso-Gb1 libre.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el biomarcador se detecta mediante análisis espectrométrico de masas.



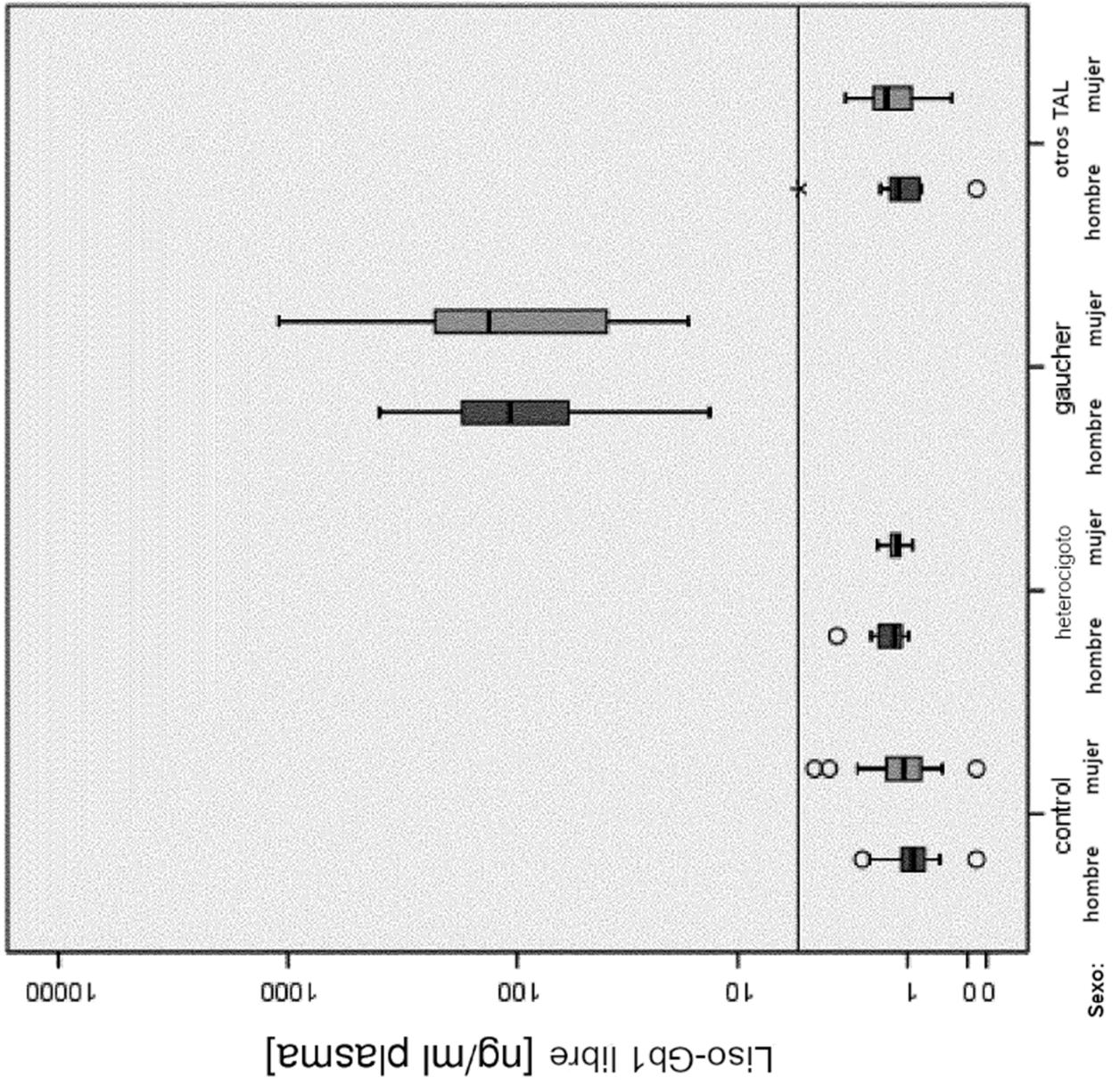
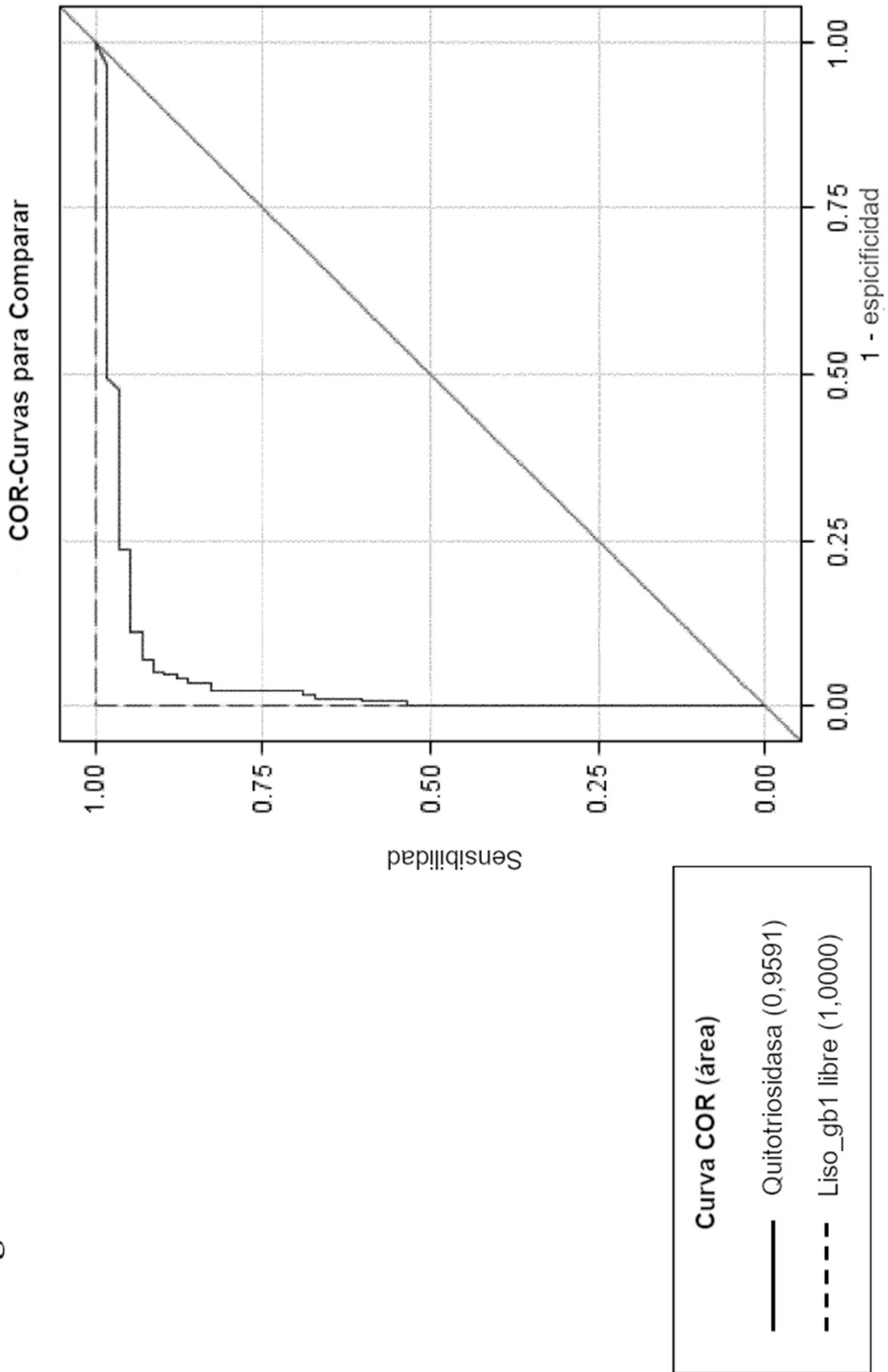
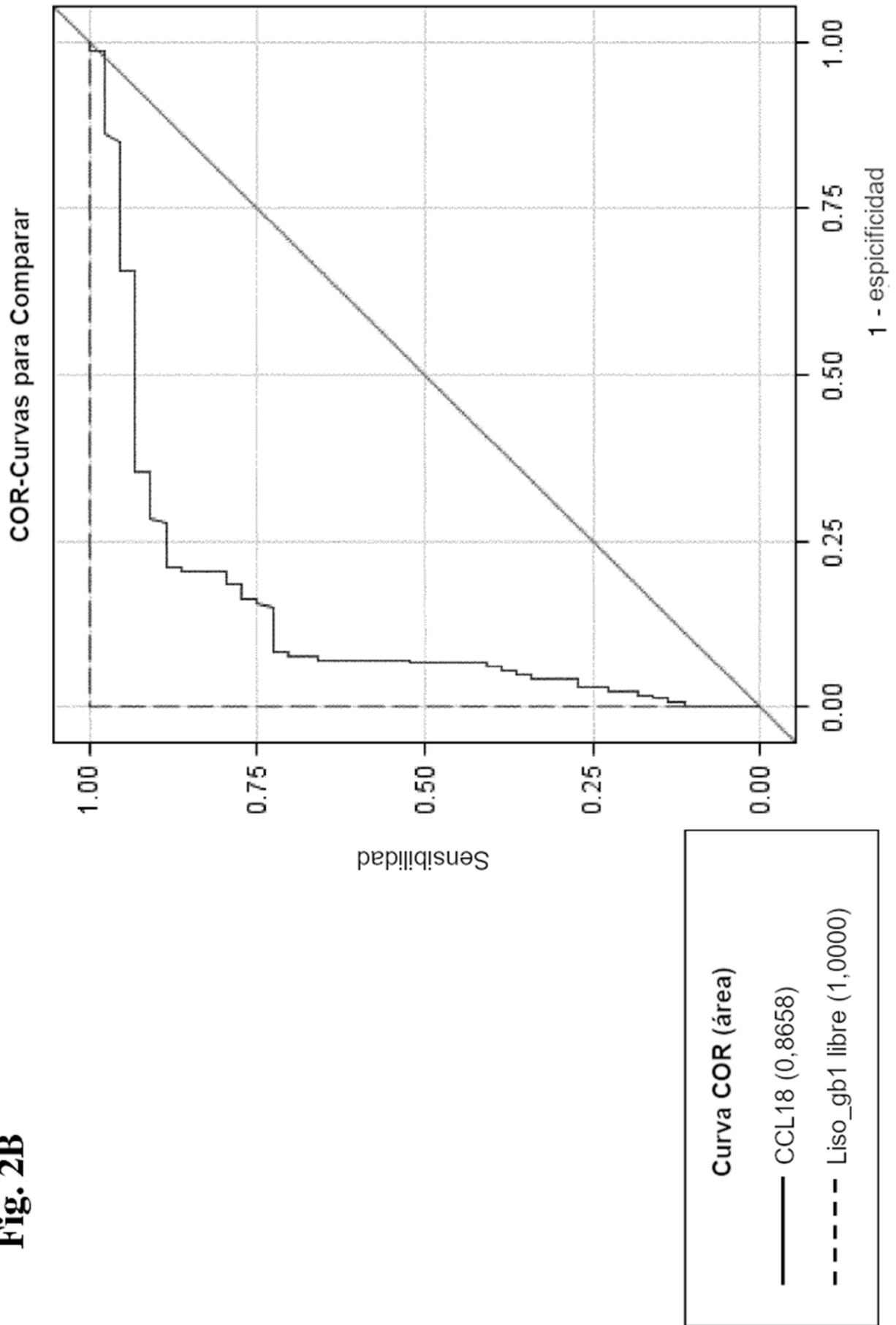


Fig. 1B

**Fig. 2A**



**Fig. 2B**



**Fig. 3A**

Liso Gb1 para pacientes con Gaucher  
 (20 pacientes sin terapia al principio y terapia comenzada más tarde,  
 t0 = primer valor de liso gb1 durante la terapia)

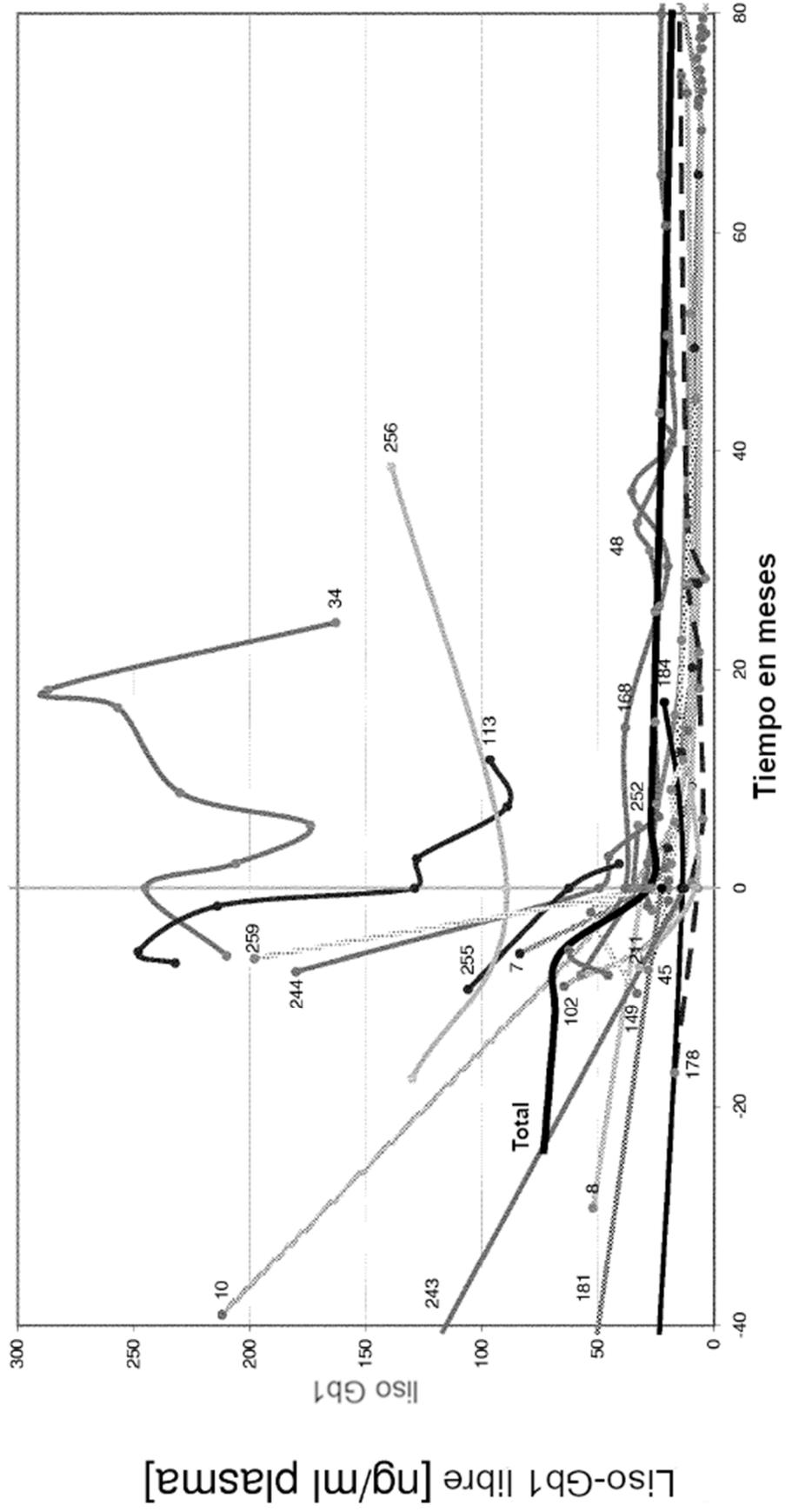
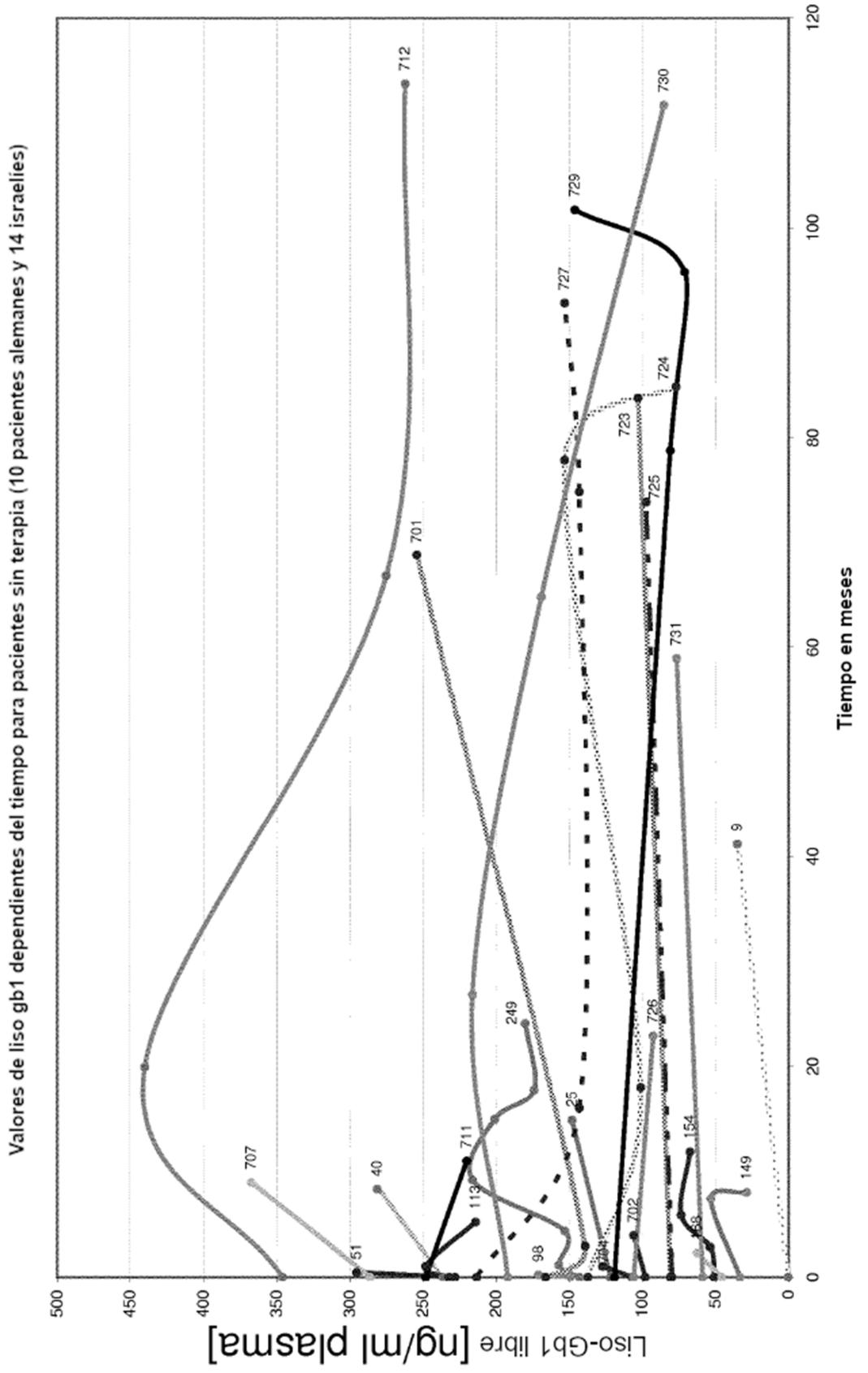


Fig. 3B



**Fig. 3C**

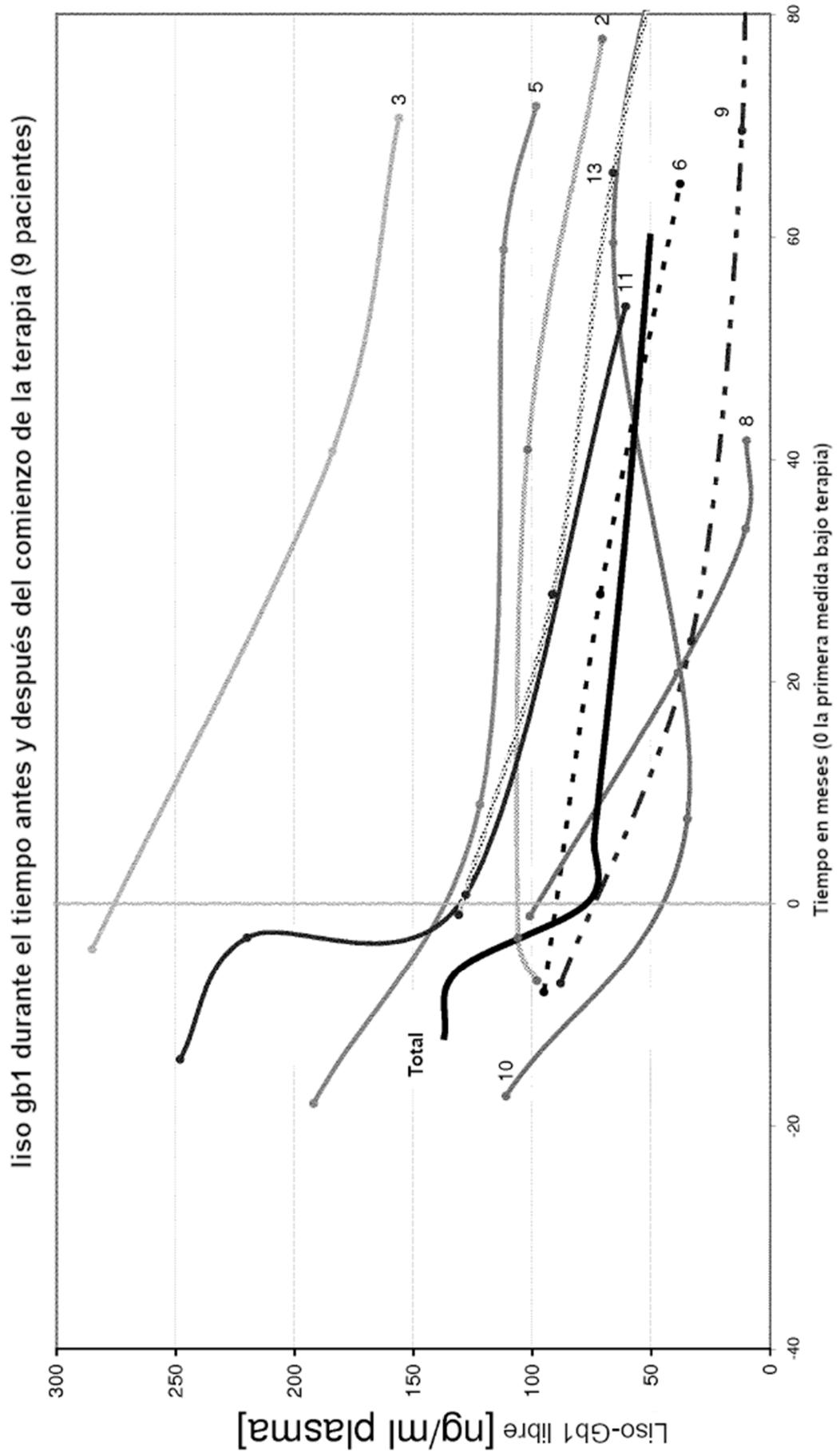
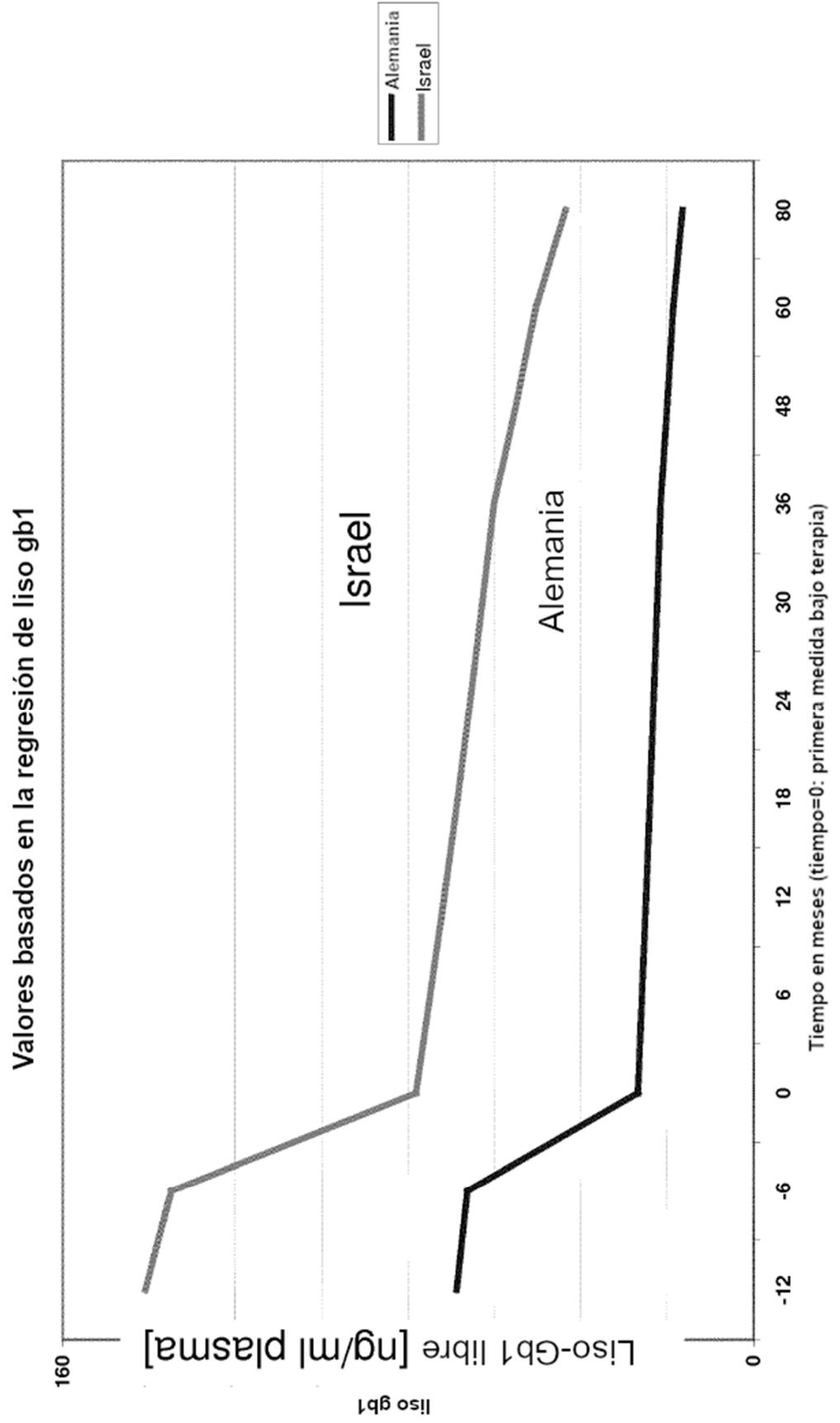


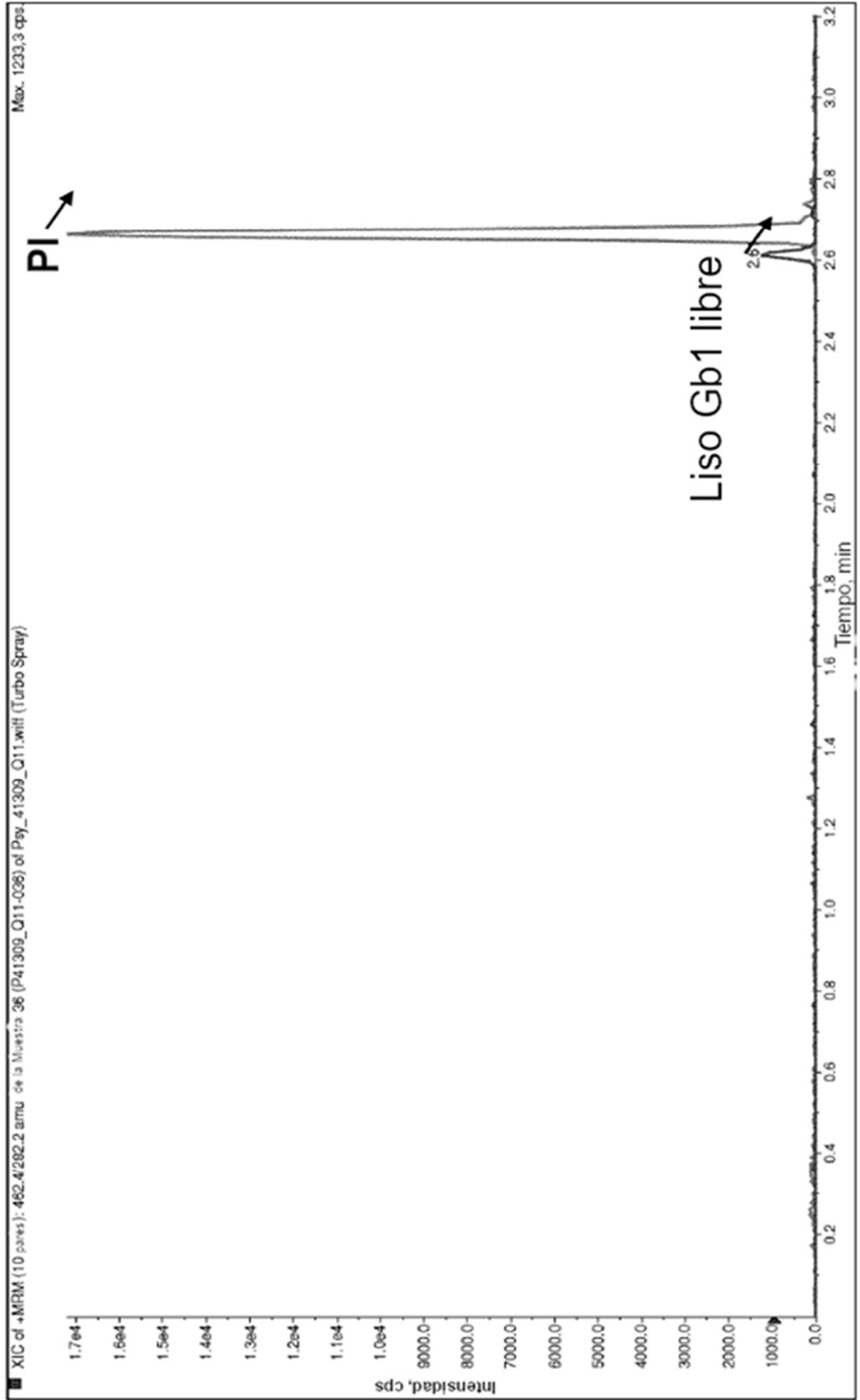
Fig. 3D



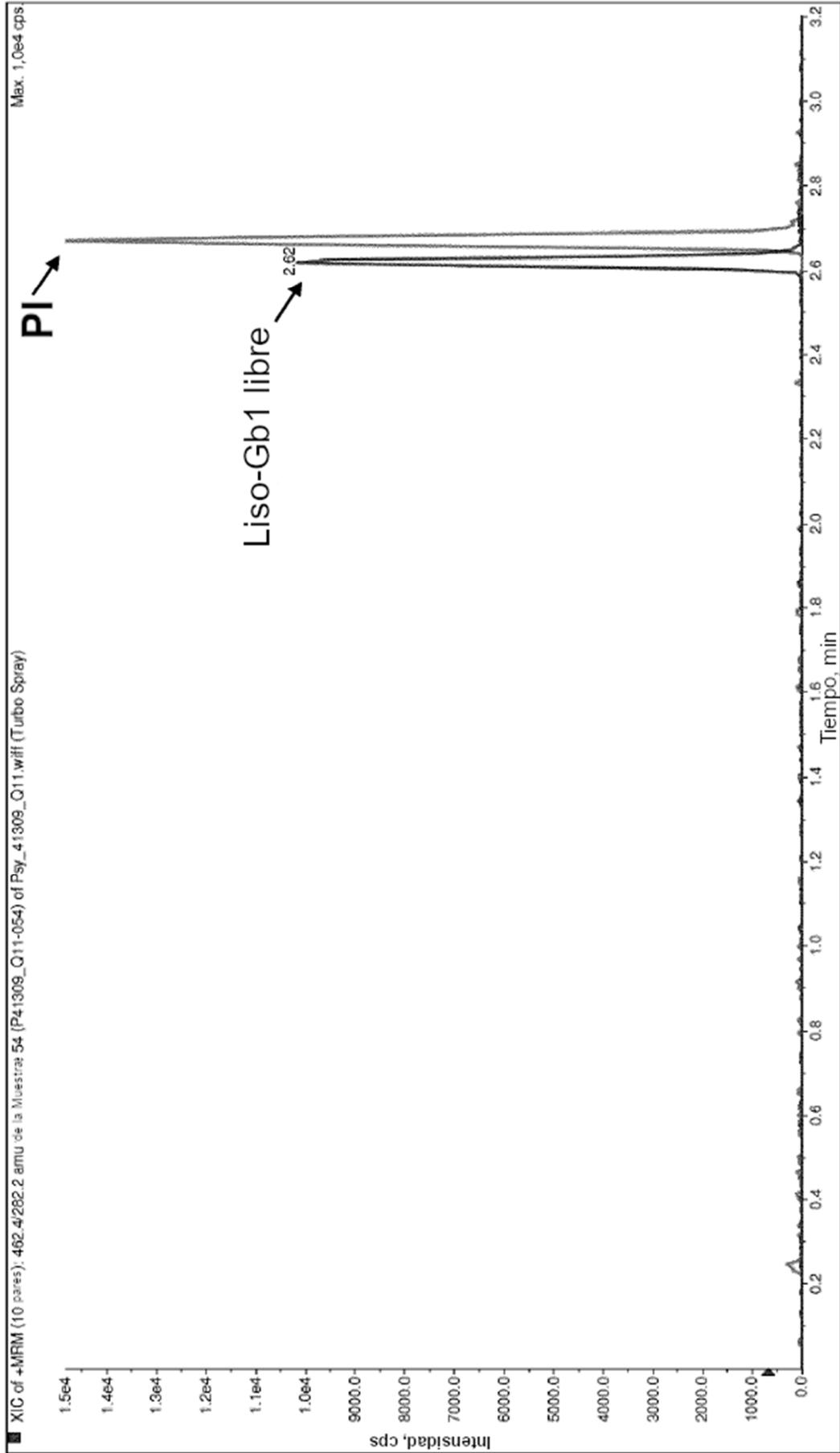
**Fig. 4**

Aminoácido	Homocigoto	Heterocigoto compuesto
Pacientes que da que tienen la mutación N370S	3	48
Media (RIC) de liso gb1 libre (primer valor antes de la terapia)	<b>159 ng/ml</b>	<b>45,4 (16,7-114,8) ng/ml</b>
Pacientes que da que tienen la mutación L444P	9	15
Media (RIC) de liso gb1 libre (primer valor antes de la terapia)	<b>194 (89,4-364,5) ng/ml</b>	<b>89 (41,2-117) ng/ml</b>

**Fig. 5A** *Persona sana, 1,71 ng/mL*



**Fig. 5B** *Paciente con Gaucher, nivel medio 17,1 ng/mL*



**Fig. 5C** *Paciente con Gaucher, nivel alto 319 ng/mL*

