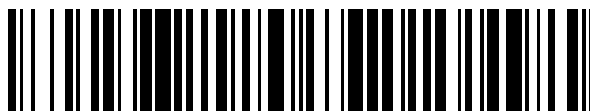


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 369**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2006** **E 06784763 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014** **EP 1888068**

54 Título: **Tratamiento de trastornos del SNC asociados con mutaciones en genes que codifican enzimas lisosómicas**

30 Prioridad:

08.06.2005 US 689120 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2014

73 Titular/es:

AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
1 Cedar Brook Drive
Cranbury, NJ 08512, US

72 Inventor/es:

WUSTMAN, BRANDON

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 485 369 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

Tratamiento de trastornos del SNC asociados con mutaciones en genes que codifican enzimas lisosómicas

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para tratar un individuo que tiene un factor de riesgo, afección o trastorno neurológico asociado con una mutación o mutaciones en una enzima lisosómica tal como β -glucosidasa ácida. Específicamente, al individuo se le administra una chaperona farmacológica específica para la enzima lisosómica que incrementa el tráfico de la proteína desde el ER al lisosoma en células neuronales, y/o incrementa concomitantemente la actividad enzimática en células neuronales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los trastornos del almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades recesivas autosómicas provocadas por la acumulación de glucoesfingolípidos, glucógeno o mucopolisacáridos celulares, debido a enzimas hidrolíticas defectuosas. Los ejemplos de LSDs incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de (Beutler et al., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8ª ed. 2001 Scriver et al., ed. p. 3635-3668, McGraw-Hill, Nueva York), gangliosidosis G_{M1} (*id.* en la p. 3775-3810), fucosidosis (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 1995. Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. and Valle, D., ed p. 2529-2561, McGraw-Hill, Nueva York), mucopolisacaridosis (*id.* en la p. 3421-3452), enfermedad de Pompe (*id.* en la p. 3389-3420), enfermedad de Hurler-Scheie (Weismann et al., *Science*. 1970; 169, 72-74), enfermedades de Niemann-Pick A y B (*The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* 8ª ed. 2001. Scriver et al. ed., p. 3589-3610, McGraw-Hill, Nueva York), y enfermedad Fabry (*id.* en la p. 3733-3774). Otros incluyen leucodistrofia metacromática, enfermedad de Kuf (lupofucsinosis lipoide neuronal del adulto) y adrenoleucodistrofia. Cada LSD está asociado con una enzima hidrolítica defectuosa específica provocada por una o más mutaciones que provocan que la enzima se haga conformacionalmente inestable en el ER tras la síntesis, y de este modo, se conviertan en dianas para la degradación en lugar de llevar a cabo el tráfico a través del Golgi a la localización nativa en el lisosoma.

Varios LSDs tienen implicación neurológica significativa. Por ejemplo, la enfermedad de Gaucher es el LSD más habitual que está asociado con la acumulación de glucoesfingolípidos (GSL) en células, particularmente monocitos y macrófagos, de individuos afectados. Esta acumulación aberrante de GSL resulta de una deficiencia genética (mutación) en la enzima lisosómica β -glucosidasa ácida (Gba; glucocerebrosidasa), la hidrolasa lisosómica que rompe la GLS glucosilceramida (GluCer). La enfermedad se ha clasificado en tres tipos clínicos, dependiendo de la implicación neurológica y gravedad de la enfermedad (Cox et al., *Q J Med*. 2001; 94: 399-402). La enfermedad de Gaucher Tipo 2 es la forma más grave, más rara, y está asociada con el comienzo temprano de enfermedad neurológica aguda. El rasgo característico de la enfermedad de Gaucher neuronopática es una anomalía de la mirada horizontal. Los pacientes afectados desarrollan encefalopatía progresiva y síntomas extrapiramidales tales como rigidez y movimiento similar al Parkinson (parkinsonismo). La mayoría de los pacientes con Gaucher Tipo 2 mueren en la niñez temprana de apnea o aspiración debido a deterioro neurológico.

Le enfermedad de Gaucher Tipo 3 también tiene implicación neurológica, aunque en un menor grado que el Tipo 2. Los pacientes con Tipo 3 tienen síntomas del sistema nervioso central que incluyen mala coordinación de movimientos (ataxia), ataques, parálisis de los músculos oculares, epilepsia, y demencia. Una subclasificación del Tipo 3, Tipo 3c, está asociada con hepatoesplenomegalia, opacidades de la córnea, ataxia progresiva y demencia, y calcificación de la válvula cardíaca y de la raíz aórtica.

Otros LSDs con implicación neurológica incluyen gangliosidosis G_{M1} , que está asociada con β -galactosidasa mutante y da como resultado lipodosis neuronal; gangliosidosis G_{M2} (enfermedad de Tay-Sachs), que está asociada con hexosaminidasa A mutante y da como resultado lipodosis neuronal; enfermedad de Niemann-Pick, que está asociada con esfingomielinasa mutante y también da como resultado lipodosis neuronal; leucodistrofia por deficiencia de galactocerebrosidasa (enfermedad de Krabbe); y lipofucsinosis cerioidea neuronal, que está asociada con proteasas lisosómicas mutantes y da como resultado lipodosis neuronal. La leucodistrofia metacromática es una deficiencia de la enzima arilsulfatasa A, y los síntomas de los pacientes incluyen trastornos del movimiento progresivos, ataques, trastornos cognitivos y también esquizofrenia y problemas psiquiátricos, además de problemas gastrointestinales. La enfermedad de Kuf (lipofucsinosis lipoide neuronal del adulto) se puede manifestar como síntomas psiquiátricos y ataques. La leucodistrofia adrenal es un trastorno que se caracteriza por desmielinización progresiva de la materia blanca del sistema nervioso central e insuficiencia adrenocortical.

Chaperonas farmacológicas específicas

Recientemente, se ha desarrollado una estrategia con chaperonas farmacológicas específicas para rescatar proteínas mutadas inestables de la degradación presumiblemente en el retículo endoplásmico (ER) o en otros sistemas de degradación/desecho de proteínas celulares. En realizaciones particulares, esta estrategia cambiante del paradigma emplea inhibidores reversibles de pequeñas moléculas que se unen específicamente a una enzima lisosómica defectuosa asociada con un trastorno lisosómico particular, estabilizan la enzima mutante en el ER, y "chaperonizan" la enzima mutante de manera que existe en el ER. Se encontró inesperadamente que los inhibidores

podrían unirse con especificidad a la enzima durante la síntesis y plegamiento en el ER, pero se podrían disociar de la enzima en su localización nativa, restaurando de ese modo su actividad. En ausencia de la chaperona, la proteína enzimática mutada se pliega inapropiadamente en el ER (Ishii et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 220: 812-815), se retrasa en su maduración hasta un producto final, y subsiguientemente se degrada en el ER. Estas chaperonas específicas se denominan chaperonas farmacológicas específicas (o chaperonas específicas del sitio activo, en las que la chaperona es un inhibidor competitivo de una enzima).

La expresión "chaperona específica del sitio activo" evolucionó desde estudios iniciales usando enzimas lisosómicas de tipo salvaje y mutantes. La porción catalítica de las enzimas, es decir, la parte en la que la enzima se une a e interacciona con su sustrato, es conocida generalmente como el "sitio activo in". La estrategia contraintuitiva de usar un inhibidor competitivo reversible de una enzima (es decir, un inhibidor enzimático que compite con el sustrato por la unión al centro catalítico) para inducir a que enzimas lisosómicas plegadas erróneamente asuman una conformación molecular estable se teorizó primeramente en virtud de la capacidad de algunos inhibidores competitivos para unirse a los centros catalíticos durante la biosíntesis y estabilizar enzimas. De este modo, cualquier estabilización que se pudiese lograr *in vivo* en el ER durante el plegamiento de una enzima naciente, especialmente una enzima mutante que tiene un defecto de plegamiento, sería beneficioso puesto que evitaría la unión de las "chaperonas" del ER endógenas que se unen a péptidos erróneamente plegados y los seleccionan como dianas para la degradación. Además, el inhibidor competitivo fue "reversible" puesto que se disoció de la enzima una vez que la enzima alcanzó el lisosoma, en el que el inhibidor tuvo más éxito que el competidor por el sustrato natural.

La estrategia de chaperonas específicas se ha descrito y ejemplificado para alrededor de 15 enzimas implicadas en LSDs en las patentes U.S. n^{os} 6.274.597, 6.583.158, 6.589.964, y 6.599.919, de Fan et al. Por ejemplo, un derivado de pequeña molécula de galactosa, 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ), un inhibidor competitivo potente de la enzima de Fabry mutante α -galactosidasa A (α -Gal A), incrementó eficazmente la estabilidad *in vitro* de la α -Gal A mutante humana (R301Q) a pH neutro, y potenció la actividad de la enzima mutante en linfoblastos establecidos de pacientes con Fabry con mutaciones R301Q o Q279E. Además, la administración oral de DGJ a ratones transgénicos que sobreexpresan α -Gal A mutante (R301Q) elevó sustancialmente la actividad enzimática en órganos principales (Fan et al., Nature Med. 1999; 5: 112-115). Se ha descrito un rescate similar de Gba a partir de células de pacientes con Gaucher usando otro iminoazúcar, isofagomina (IFG), y sus derivados, descrita en el documento U.S. 6.916.829 de Fan et al., y usando otros compuestos específicos para Gba (descritos en las Solicitudes de Patentes U.S. Series Números 10/988.428, y 10/988.427, ambas presentadas el 12 de noviembre de 2004, en trámite junto con la presente).

Mutaciones de enzimas de LSD y trastornos neurológicos

Gba y Parkinson. Se ha descubierto recientemente que hay una relación entre las mutaciones en las enzimas lisosómicas y los trastornos neurológicos distintos de los LSDs. Como ejemplo, existe una relación bien establecida entre mutaciones en el gen de Gba y la enfermedad de Parkinson. En un estudio, se encontró que un grupo de 17 pacientes con parkinsonismo raro, de comienzo temprano, resistente al tratamiento, tienen al menos un alelo con una mutación de sentido erróneo de Gba, incluyendo individuos homocigotos y heterocigotos para N370S, una mutación asociada típicamente con enfermedad no neuronopática de tipo 1 (Tayebi et al., Mol. Genet. Metab. 2003; 79: 104-109). En otro estudio, se evaluó una población de 99 judíos Ashkenazi con enfermedad de Parkinson idiopática en busca de seis mutaciones de Gba (N370S, L444P, 84GG, V394L, y R496H). Treinta y un pacientes con Parkinson tuvieron uno o dos alelos de Gba mutantes: 23 fueron heterocigotos para N370S; 3 fueron homocigotos para N370S; 4 fueron heterocigotos para 84GG; y 1 fue heterocigoto para R496H (Aharon-Peretz et al., New Eng. J. Med. 2004; 351: 1972-77). La frecuencia de un alelo N370S mutante fue 5 veces aquella entre 1573 sujetos normales, y la de 84GG fue 21 veces aquella de sujetos normales. Entre pacientes con enfermedad de Parkinson, los pacientes que portaban una mutación de Gba también fueron más jóvenes que aquellos que no eran portadores. Este estudio sugiere que la heterocigosidad para una mutación de Gba puede predisponer a los judíos Ashkenazi a la enfermedad de Parkinson.

Las enfermedades de Parkinson y Gaucher también comparten algunos rasgos patológicos, incluyendo pérdida neuronal, astrogliosis, y presencia de inclusiones de α -sinucleína similares a cuerpos de Lewy citotóxicos en neuronas del hipocampo (la región CA2-4). Una publicación reciente describió el grado de patología neurológica en las tres formas de enfermedad de Gaucher (Wong et al., Mol. Genet. Metabol. 2004; 38: 192-207). Se encontraron anomalías en las capas corticales cerebrales 3 y 5, hipocampal CA2-4, y capa 4b en pacientes con Gaucher que tienen los tres tipos. La pérdida neuronal fue evidente sólo en pacientes con los tipos 2 y 3, mientras que los pacientes con el tipo 1 presentaron astrogliosis (Wong et al., *más arriba*). Dos pacientes con Gaucher tipo 1 y parkinsonismo/demencia mostraron inclusiones positivas de α -sinucleína en neuronas hipocámpales CA2-4, un paciente tuvo cuerpos de Lewy de tipo tronco encefálico y de tipo cortical, y uno tuvo pérdida neuronal notable de neuronas de la sustancia negra (Wong et al., *más arriba*). En resumen, los 4 pacientes con parkinsonismo y demencia tuvieron gliosis hipocámpal CA2-4, y agotamiento neuronal, gliosis, y cuerpos de Lewy de tipo tronco encefálico en la sustancia negra.

Varios modelos de ratón también demuestran esta relación entre Gba y el Parkinson. La actividad de hidrolasa *in vitro* óptima de Gba requiere saposina C, una proteína activadora que deriva de un precursor, prosaposina. Los

ratones transgénicos que expresan niveles bajos (4-45% de tipo salvaje) de prosaposina y saposinas (PS-NA), retrocruzados con ratones con mutaciones de punto específicas (V394L/V394L o D409H/D409H) de Gba, tienen varios fenotipos del SNC similares a los fenotipos de la PD, incluyendo: ataxia al andar, temblor, agitación hasta el punto de caerse, y una vejiga neurogénica (Sun et al., J Lipid Res. 2005. 46(10): 2102-13).

- 5 El trabajo de chaperonas farmacológicas específicas descrito anteriormente estableció la capacidad para restaurar suficiente función a una enzima mutante (mutación conformacional) para reducir o incluso eliminar la acumulación de cantidades tóxicas de sustrato lipídico en los LSDs. Sin embargo, no estaba claro que este enfoque pudiese afectar a individuos heterocigotos, o a individuos con mutaciones homocigotas que no están diagnosticados con un LSD según los criterios actuales, pero que están en riesgo de desarrollar una afección o trastorno neurológico debido a los efectos de la mutación, o individuos que son diagnosticados con trastornos de almacenamiento lisosómico pero tienen mutaciones además de o distintas de mutaciones conformacionales que hacen a la proteína no funcional. Todas estas poblaciones están en riesgo de desarrollar un trastorno neurológico debido a ganancia tóxica de función, pérdida patológica de función, o una combinación. De este modo, existe aún una necesidad en la técnica para ser capaces de identificar factores etiológicos y abordar las consecuencias de tales mutaciones en estas poblaciones de pacientes.

SUMARIO DE LA INVENCION

- La presente descripción proporciona un método para el tratamiento de un trastorno neurológico en un individuo, en el que el trastorno neurológico está asociado con una mutación en el gen que codifica una enzima lisosómica, mediante la administración de una cantidad eficaz de una chaperona farmacológica específica para tratar el trastorno neurológico.

En una realización, el individuo es homocigoto para la mutación. En otra realización, el individuo es hemicigoto, heterocigoto o heterocigoto de compuesto para la mutación.

En una realización, la mutación da como resultado que la enzima sea un mutante conformacional.

- En una realización específica, en la que la chaperona incrementa el tráfico de la enzima mutante desde el retículo endoplásmico y puede restaurar concomitantemente o no la actividad enzimática.

En otra realización, la mutación da como resultado mayores cantidades de, o agregación de, otra sustancia celular, tal como un lípido u otra proteína o fragmento proteico, tal como α -sinucleína.

En la realización específica de la presente invención, la enzima lisosómica es glucocerebrosidasa, y el trastorno neurológico es enfermedad de Parkinson o parkinsonismo.

- En otra realización específica, la enfermedad de Parkinson es enfermedad de Parkinson de comienzo temprano.

En algunas realizaciones de la descripción, la chaperona farmacológica específica es un inhibidor de la enzima lisosómica, y el inhibidor es un inhibidor reversible o competitivo, o ambos.

En una realización específica, la chaperona farmacológica para glucocerebrosidasa es isofagomina o (5R,6R,7S,8S)-5-hidroximetil-2-octil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridina-6,7,8-triol.

- La presente descripción también proporciona un método para diagnosticar un trastorno neurológico asociado con una enzima lisosómica mutante, al identificar un individuo que muestra síntomas neurológicos para una mutación en una o más enzimas lisosómicas.

En una realización, la mutación da como resultado una enzima que es un mutante conformacional.

- En otra realización, la identificación se realiza determinando una menor actividad enzimática a partir de una muestra biológica procedente del individuo en comparación con una muestra biológica de un individuo sano.

En la realización específica, el trastorno neurológico diagnosticado es parkinsonismo o enfermedad de Parkinson.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

- Figura 1. La Figura 1 demuestra los niveles de actividad de Gba en los cerebros de ratones transgénicos L444P tratados con la chaperona farmacológica específica isofagomina (1A). También se representa el nivel de actividad de Gba en el cerebro tras un período de lavado y retratamiento (1B).

- Figuras 2A-N. La Figura 2 representa tinción fluorescente de lisosomas usando LysoTracker® Red en células de fibroblastos de Gaucher (2a) y fibroblastos normales (2B). También se llevó a cabo la tinción para la proteína lisosómica LAMP-1 en fibroblastos normales (2C) y fibroblastos de Gaucher (2D). La Figura 2E-F muestra una superposición de la tinción dual de Gba y LAMP-1 en fibroblastos de Gaucher. También se representa una superposición dual (LAMP-1 y Gba) de células de Gaucher tratadas con la chaperona farmacológica específica isofagomina (2G-H) y la chaperona farmacológica específica C-bencil-isofagomina

(2I-J). Finalmente, las Figuras 2K-N muestran tinción de células de Gaucher para Gba solamente. Las células de Gaucher del control se tiñeron con anticuerpo secundario solamente (2K), o no se trataron (2L), o se trataron con isofagomina (2M) o con C-bencil-isofagomina (2N).

Figuras 3A-I. La Figura 3 representa tinción fluorescente de células de Gaucher (3D-I) y fibroblastos normales (3A-C) para la presencia de proteínas poliubiquinadas (PUP) (3A, 3D, 3G) y Gba (3B, 3E, 3H), y una superposición para ambas (3C, 3F, 3I).

Figura 4. La Figura 4 representa el gen que codifica β -glucosidasa ácida humana, también denominada como glucocerebrosidasa o Gba (nº de Acceso de GenBank J03059; SEC ID NO: 1).

Figura 5. La Figura 5 representa la proteína Gba humana de tipo salvaje. La proteína Gba consiste en 536 aminoácidos y está en el nº de Acceso de GenBank J03059 (SEC ID NO: 2).

Figura 6. La Figura 6 representa el pseudogén homólogo para Gba situado alrededor de 16 kb en dirección 3' del gen de Gba (nº de Acceso de GenBank M16328; SEC ID NO: 3).

Figura 7. La Figura representa el polipéptido codificado por el pseudogén homólogo para Gba (SEC ID NO: 4).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa en el descubrimiento de que trastornos neurológicos que se presentan en individuos no diagnosticados con trastornos de almacenamiento lisosómico pueden estar relacionados con mutaciones en enzimas lisosómicas. En consecuencia, la presente invención, una chaperona farmacológica específica, tal como una ASSC, puede mejorar patologías tanto de ganancia de función como de pérdida de función asociadas con mutaciones de enzimas lisosómicas que están relacionadas con factores de riesgo, afecciones, o trastornos neurológicos. Las chaperonas pueden incluir el tráfico apropiado de proteínas mutantes a un nivel suficiente para inhibir, incluso hasta el punto de prevenir, la acumulación tóxica asociada con la acumulación de proteínas mutantes erróneamente plegadas (*es decir*, ganancia de función), lo que a su vez puede afectar a la función neurológica. En algunos casos en los que la mutación sólo altera el plegamiento y el tráfico de la proteína hacia su localización celular nativa y no es, por ejemplo, un mutante que altera la actividad catalítica u otra actividad de la proteína, o es un mutante sin sentido, las chaperonas también pueden restaurar la actividad a la proteína mutante, abordando de ese modo patologías asociadas con la pérdida de función de la proteína, tal como la acumulación de sustrato o incluso la agregación de otras proteínas tóxicas o fragmentos que resultan de la acumulación de sustrato.

Definiciones

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

La expresión "enfermedad de Gaucher" incluye Tipo 1, Tipo 2 y Tipo 3, y sus intermedios y subgrupos basados en manifestaciones fenotípicas.

Un "trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP) que esté asociada con defectos de células neuronales o gliales, incluyendo, pero sin limitarse a, pérdida neuronal, degeneración neuronal, desmielinización neuronal, gliosis (*es decir*, astrogliosis), o acumulación neuronal o extraneuronal de proteínas aberrantes o toxinas (*por ejemplo*, β -amiloide o α -sinucleína). El trastorno neurológico puede ser crónico o agudo. Los trastornos neurológicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Gaucher y otros LSDs, incluyendo enfermedad de Fabry, enfermedad de Tay-Sachs, enfermedad de Pome, y las mucopolisacaridosis; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Alzheimer; esclerosis lateral amiotrófica (ALS); esclerosis múltiple (MS); enfermedad de Huntington; ataxia de Fredrich; alteración cognitiva leve; y trastornos del movimiento (incluyendo ataxia, parálisis cerebral, coreoatetosis, distonía, síndrome de Tourette, ictericia nuclear); trastornos de temblor, leucodistrofias (incluyendo adrenoleucodistrofia, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Canavan, enfermedad de Alexander, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher); lipofuscinosis cerioidea neuronal; ataxia-telangectasia; y síndrome de Rett. La expresión también incluye sucesos cerebrovasculares tales como apoplejía y ataques isquémicos.

Como se usa aquí, la expresión "trastorno neurológico" también incluye personas en riesgo de desarrollar un trastorno, enfermedad o afección neurológica, así como personas ya diagnosticadas con un trastorno, enfermedad o afección neurológica.

Un "trastorno neurológico asociado con una mutación en una enzima lisosómica" se refiere a cualquier trastorno neurológico en el que también está presente una mutación o mutaciones en el gen que codifica la enzima cuando se evalúa en individuos que tienen el trastorno neurológico, en comparación con individuos que no tienen o no están en riesgo de desarrollar el trastorno neurológico (*es decir*, individuos sanos). En realizaciones específicas, el trastorno

neurológico asociado con mutaciones de Gba (Gaucher) es enfermedad de Parkinson o parkinsonismo.

La expresión "gen de Gba humano" se refiere al gen que codifica β -glucosidasa ácida, también denominada glucocerebrosidasa o Gba. El gen de Gba está en el cromosoma 1q21 e implica 11 exones (nº de Acceso de GenBank J03059; SEC ID NO: 1). También hay un pseudogén homólogo para Gba situado alrededor de 16 kb en dirección 3' del gen de Gba (nº de Acceso de GenBank M16328; SEC ID NO: 3).

La proteína "Gba humana" se refiere a la proteína Gba humana de tipo salvaje. La proteína Gba consiste en 536 aminoácidos y tiene el nº de Acceso de GenBank J03059 (SEC ID NO: 2). El polipéptido codificado por el pseudogén citado anteriormente se representa en SEC ID NO: 4.

Como se usa aquí, la expresión "chaperona farmacológica", o algunas veces "chaperona farmacológica específica" ("SPC"), se refiere a una molécula que se une específicamente a una proteína tal como una enzima lisosómica (por ejemplo, Gba) y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) potenciar la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) inducir el tráfico de la proteína desde el ER a otra localización celular, preferiblemente una localización celular nativa, es decir, prevenir la degradación asociada al ER de la proteína; (iii) prevenir la agregación de proteínas erróneamente plegadas; (iv) restaurar o potenciar la función de tipo salvaje al menos parcial, estabilidad y/o actividad a la proteína; y/o mejorar el fenotipo o función de la célula que posee la proteína. De este modo, una chaperona farmacológica para una proteína es una molécula que se une a la proteína dando como resultado el plegamiento, tráfico, no agregación y actividad apropiados de la proteína. Como se usa aquí, esta expresión no se refiere a chaperonas endógenas, tales como BiP, o a agentes no específicos que han demostrado actividad de chaperona no específica frente a diversas proteínas, tales como glicerol, DMSO o agua deuterada, algunas veces denominadas "chaperonas químicas" (véanse Sato et al., *Biochem Biophys Acta*. 1988; 126(2): 756-62; Welch et al., *Cell Stress and Chaperones* 1996; 1(2):109-115; Welch et al., *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 1997; 29(5):491-502; patente U.S. nº 5.900.360; patente U.S. nº 6.270.954; y patente U.S. nº 6.541.195).

Como se usa aquí, la expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con una proteína específica, específicamente una interacción con restos de aminoácidos de una proteína que participa directamente en el contacto con la chaperona farmacológica. Un compuesto que se une específicamente a una proteína diana, por ejemplo Gba, significa que se une a y ejerce un efecto de chaperona farmacológica sobre Gba y no un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los restos de aminoácidos de la proteína que interaccionan con cualquier chaperona farmacológica dada pueden estar o no dentro del "sitio activo" de la proteína. La unión específica se puede evaluar a través de ensayos de unión normales, o a través de estudios estructurales, por ejemplo cocristalización, RMN, y similares.

La expresión "proteína de tipo salvaje" se refiere a las secuencias nucleotídicas que codifican proteínas funcionales, y a secuencias polipeptídicas codificadas por las secuencias nucleotídicas mencionadas anteriormente, y a cualesquiera otras secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido funcional (que tiene las mismas propiedades funcionales y afinidades de unión que las secuencias polipeptídicas mencionadas anteriormente), tales como variantes alélicas en individuos normales, que tienen la capacidad para lograr una conformación funcional en el ER, lograr la localización apropiada dentro de la célula, y mostrar actividad de tipo salvaje (por ejemplo, hidrólisis de GluCer).

Como se usa aquí, la expresión "proteína mutante" se refiere a un polipéptido traducido a partir de un gen que contiene una mutación genética que da como resultado una secuencia de aminoácidos alterada. En una realización, la mutación da como resultado una proteína que no logra una conformación nativa en las condiciones normalmente presentes en el ER, cuando se compara con la proteína de tipo salvaje, o muestra una menor estabilidad o actividad en comparación con la proteína de tipo salvaje. Este tipo de mutación se denomina aquí "mutación conformacional", y la proteína que porta tal mutación se denomina "mutante conformacional". El fracaso para lograr esta conformación da como resultado que la proteína se degrade o se agregue, en lugar de ser transportada a través de una ruta normal en el sistema de transporte de proteínas a su localización nativa en la célula o al entorno extracelular.

En otra realización, la proteína tiene otra mutación además de o distinta de un mutante conformacional, que permite la traducción, t por tanto la acumulación en el ER de toda o una parte de la proteína (proteína la cual puede retener o no actividad de tipo salvaje).

En algunas realizaciones, una mutación puede ocurrir en una parte no codificante del gen que codifica la proteína, que da como resultado la expresión eficiente de la proteína, por ejemplo una mutación que afecta a la eficiencia de la transcripción, eficiencia del ajuste, estabilidad del ARNm, y similar. Potenciando el nivel de expresión de variantes de tipo salvaje así como de variantes de mutantes conformacionales de la proteína, la administración de una chaperona farmacológica puede mejorar un déficit que resulta de tal expresión ineficiente de la proteína.

Otras mutaciones pueden dar como resultado una menor actividad enzimática o un recambio más rápido.

Realizaciones específicas de mutantes de Gba asociados con enfermedades neuronopáticas incluyen, pero no se limitan a: N370S, L444P, K198T, D409H, R496H, V394L, 84GG, y R329C.

Una mutación heterocigota de Gba se refiere a un genotipo en el que existe un alelo de tipo salvaje y un alelo mutante, *por ejemplo* N370S/wt. Una mutación de Gba heterocigota también se refiere a un genotipo en el que hay dos alelos mutados, cada uno con diferente mutación, *por ejemplo* N370S/L444P. Este término también incluye el genotipo mutante/null, *por ejemplo* N370S/null. Esta definición también es aplicable cuando se refiere a mutaciones heterocigotas en otras enzimas lisosómicas.

Una mutación de Gba homocigota se refiere a un genotipo en el que hay dos alelos de Gba mutantes en los que las mutaciones son iguales, *por ejemplo* N370S/N370S. Esta definición también es aplicable cuando se refiere a mutaciones homocigotas en otras enzimas lisosómicas.

La expresión “estabilizar una conformación apropiada” se refiere a la capacidad de una chaperona farmacológica para inducir o estabilizar una conformación de una proteína mutada que es funcionalmente idéntica a la conformación de la contraparte de tipo salvaje. La expresión “funcionalmente idéntica” significa que, mientras que puede haber variaciones pequeñas en la conformación (casi todas las proteínas muestran cierta flexibilidad conformacional en su estado fisiológico), la flexibilidad conformacional no da como resultado (1) agregación proteínica, (2) eliminación a través de la ruta de degradación asociada al retículo endoplásmico, (3) alteración de la función proteica, *por ejemplo* actividad de Gba, y/o (4) transporte inapropiado dentro de la célula, *por ejemplo* localización hacia el lisosoma, en un mayor o menor grado que aquel de la proteína de tipo salvaje.

La expresión “conformación molecular estable” se refiere a una conformación de una proteína, *es decir*, Gba, inducida por una chaperona farmacológica específica, que proporciona una función de tipo salvaje al menos parcial en la célula. Por ejemplo, una conformación molecular estable de una proteína mutante sería aquella en la que la proteína escapa del ER y se mueve hacia la localización celular nativa como la hace una Gba de tipo salvaje (por ejemplo, el lisosoma), en lugar de plegarse erróneamente y degradarse. Además, una conformación molecular estable de una proteína mutada también puede poseer actividad completa o parcial, *por ejemplo* hidrólisis de GluCer. Sin embargo, no es necesario que la conformación molecular estable tenga todos los atributos funcionales de la proteína de tipo salvaje.

La expresión “actividad de tipo salvaje” se refiere a la función fisiológica normal de una proteína, *por ejemplo* Gba, en una célula. Por ejemplo, la actividad de Gba incluye el plegamiento y el tráfico desde el ER hacia el lisosoma, con o sin la capacidad concomitante de hidrolizar un sustrato tal como GluCer o 4-metilumbeliferilo (4-MU). Tal funcionalidad se puede ensayar por cualquier medio conocido para establecer la funcionalidad de tal proteína.

Ciertos ensayos pueden evaluar atributos de una proteína que pueden corresponder o no a su función *in vivo* real, pero no obstante son sustitutos de agregados de la funcionalidad proteica, y el comportamiento de tipo salvaje en tales ensayos es una consecuencia aceptable de las técnicas de rescate o potenciación del plegamiento proteico de la invención. Una de tales actividades según la invención es el transporte apropiado de una proteína mutante, *por ejemplo* Gba, desde el retículo endoplásmico hasta la localización celular nativa, *por ejemplo* lisosoma, o al entorno extracelular.

La expresión “expresión endógena” se refiere a la expresión fisiológica normal de una proteína en células en un individuo que no tiene o que no se sospecha que tenga una enfermedad o trastorno del SNC asociado con una deficiencia, sobreexpresión, u otro defecto de una proteína, tal como en la secuencia de ácidos nucleicos o polipeptídica, que inhibe su expresión, actividad o estabilidad. Esta expresión también se refiere a la expresión de la proteína en tipos celulares en los que es normal que la proteína se exprese, y no incluye la expresión en células o tipos celulares, *por ejemplo* tumores, en los que la proteína no se expresa en individuos sanos.

Como se usa aquí, las expresiones “potenciar la expresión” o “incrementar la expresión” se refiere a incrementar la cantidad de un polipéptido que adopta una conformación funcional en una célula que está en contacto con una chaperona farmacológica específica para esa proteína, con respecto a su expresión en una célula (preferiblemente del mismo tipo celular o la misma célula, *por ejemplo*, en un tiempo más temprano) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para esa proteína. Las expresiones mencionadas anteriormente significan como alternativa incrementar la eficiencia del transporte de un polipéptido desde el ER en una célula que está en contacto con una chaperona farmacológica específica para esa proteína, con respecto a la eficiencia del transporte de una contraparte de tipo salvaje en una célula (preferiblemente la misma célula, *por ejemplo*, en un tiempo más temprano, o del mismo tipo celular) que no está en contacto con la chaperona farmacológica específica para esa proteína.

Como se usa aquí, la expresión “eficiencia del transporte” se refiere a la capacidad de una proteína mutante para ser transportada fuera del retículo endoplásmico hacia su localización nativa dentro de la célula, a otra localización dentro de la célula, a la membrana celular, o al entorno extracelular.

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

concentración de sustrato, y de las afinidades relativas del inhibidor y sustrato por el sitio activo.

La inhibición competitiva no clásica se produce cuando el inhibidor se une remotamente al sitio activo, creando un cambio conformacional en la enzima de manera que el sustrato ya no se puede unir a ella. En la inhibición competitiva no clásica, la unión del sustrato en el sitio activo evita la unión del inhibidor en un sitio distinto, y viceversa. Esto incluye la inhibición alostérica.

Un "inhibidor de tipo mixto lineal" de una enzima es un tipo de inhibidor competitivo que permite que el sustrato se una, pero reduce su afinidad, de manera que se incrementa la K_m y disminuye la V_{max} .

Un "inhibidor no competitivo" se refiere a un compuesto que forma enlaces fuertes con una enzima y no se puede desplazar mediante la adición de sustrato en exceso, es decir, los inhibidores no competitivos pueden ser irreversibles. Un inhibidor no competitivo se puede unir a, cerca de, o remotamente del sitio activo de una enzima o proteína, y en relación con enzimas, no tiene efecto sobre la K_m pero disminuye la V_{max} . La inhibición no competitiva se refiere a una situación en la que el inhibidor se une solamente al complejo de enzima-sustrato (ES). La enzima se inactiva cuando se une el inhibidor. Esto difiere de los inhibidores competitivos no clásicos, que se pueden unir a la enzima en ausencia de sustrato.

El término " V_{max} " se refiere a la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por enzimas, es decir, a niveles de sustrato saturantes. El término " K_m " es la concentración de sustrato requerida para lograr $\frac{1}{2} V_{max}$.

Un "respondedor" es un individuo diagnosticado con un trastorno neurológico asociado con una mutación de enzima lisosómica y tratado según el método reivindicado actualmente, que muestra una mejora en, una mejoría, o prevención de uno o más síntomas clínicos, o mejora o inversión de uno o más marcadores clínicos sustitutos. Como ejemplo, un "respondedor" para individuos con la enfermedad de Parkinson (que tienen mutaciones de Gba concomitantes) es aquel que muestra mejora en, mejoría, o prevención de uno o más síntomas clínicos, o mejora o inversión de uno o más marcadores clínicos sustitutos, incluyendo, pero sin limitarse a: pérdida neuronal, astrogliosis, y la presencia de inclusiones de α -sinucleína similares a cuerpos de Lewy intraneuronales en neuronas CA2-3.

Las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a la cantidad de una chaperona farmacológica específica que es suficiente para dar como resultado una respuesta terapéutica. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, tal como evaluando los síntomas y marcadores clínicos sustitutos. De este modo, una respuesta terapéutica será generalmente una mejoría de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, por ejemplo un trastorno neurológico.

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

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

Definiciones de biología molecular

Según la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, y ADN recombinante dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (aquí "Sambrook et al., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

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

El término “purificado”, como se usa aquí, se refiere a material, tal como un ácido nucleico o polipéptido de Gba, que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan materiales no relacionados, es decir, contaminantes. Por ejemplo, una proteína purificada está preferiblemente libre de forma sustancial de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula. Como se usa aquí, la expresión “sustancialmente libre” se usa operativamente, en el contexto del ensayo analítico del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50% puro; más preferiblemente, al menos 90% puro, y más preferiblemente aún, al menos 99% puro. La pureza se puede evaluar mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, y otros métodos conocidos en la técnica.

La expresión “célula hospedante” significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transforma, se hace crecer, o se usa o manipula de cualquier forma, para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión por la célula de un gen, una secuencia de ADN o ARN, una proteína o una enzima. Según la presente invención, la célula hospedante se modifica para expresar un ácido nucleico o polipéptido de enzima lisosómica mutante o de tipo salvaje. Las células hospedantes se pueden usar además para la identificación o para otros ensayos. Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula de ADN que ha sufrido una manipulación biológica molecular. Células hospedantes ejemplares para uso en la presente invención son células HEK293, células COS, y células CHO.

Los polinucleótidos aquí pueden estar flanqueados por secuencias reguladoras naturales (de control de la expresión), o pueden estar asociados con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) u otras secuencias del sitio de unión al ribosoma, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes de 5' y de 3', y similares. Los ácidos nucleicos también se pueden modificar por muchos medios conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones incluyen metilación, “protectores”, sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural por un análogo, y modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos metílicos, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.). Los polinucleótidos pueden contener uno o más restos enlazados covalentemente adicionales, tales como, por ejemplo, proteínas (*por ejemplo*, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), intercalantes (*por ejemplo*, acridina, psoraleno, etc.), quelantes (*por ejemplo*, metales, metales radioactivos, hierro, metales oxidativos, etc.), y alquilantes. Los polinucleótidos se pueden derivatizar mediante formación de un fosfotriéster metílico o etílico o un enlace de fosforamidato de alquilo. Además, los polinucleótidos aquí también se pueden modificar con un marcador capaz de proporcionar una señal detectable, ya sea directa o indirectamente. Los marcadores ejemplares incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, y similares.

Una “secuencia codificante” o una secuencia “que codifica” un producto de expresión, tal como un ARN o polipéptido, es una secuencia nucleotídica que, cuando se expresa, da como resultado la producción de ese ARN o polipéptido, *por ejemplo* la secuencia nucleotídica de Gba codifica una secuencia de aminoácidos para un polipéptido (proteína) de Gba. Una secuencia codificante para la proteína puede incluir un codón de inicio (habitualmente ATG) y un codón de parada.

El término “gen”, también denominado un “gen estructural”, significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de aminoácidos que comprende toda o parte de una o más proteínas lisosómicas, y puede incluir o no secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan por ejemplo las condiciones en las que se expresa el gen.

Los términos “expresar” y “expresión”, cuando se usan en el contexto de producir una secuencia de aminoácidos a partir de una secuencia de ácido nucleico, significa permitir o provocar que se manifieste la información en una secuencia génica o de ADN, por ejemplo producir una proteína cérica activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción del gen o secuencia de ADN de Gba correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un “producto de expresión”, tal como una proteína Gba. Se puede también afirmar que el propio producto de expresión, *por ejemplo* la proteína resultante, es “expresada” por la célula. Un

producto de expresión se puede caracterizar como intracelular, extracelular o segregado. Según la presente invención, la proteína se expresa intracelularmente en neuronas.

El término “intracelular” significa algo que está dentro de una célula. El término “extracelular” significa algo que está fuera de una célula. Una sustancia es “segregada” por una célula si aparece en una medida significativa fuera de la célula, procedente de alguna parte sobre o dentro de la célula.

El término “heterólogo” se refiere a una combinación de elementos de origen no natural en combinación. Por ejemplo, ADN heterólogo se refiere a ADN no situado naturalmente en la célula, o en un sitio cromosómico de la célula. Preferiblemente, el ADN heterólogo incluye un gen extraño a la célula. Un elemento regulador de la expresión heterólogo es un elemento asociado operativamente con un gen diferente que aquel con el que está asociado operativamente en la naturaleza. En el contexto de la presente invención, un gen que codifica una proteína de interés es heterólogo al ADN vector en el que se inserta para clonación o expresión, y es heterólogo para una célula hospedante que contiene tal vector, en el que se expresa, *por ejemplo* una célula de *E. coli*.

El término “transformación” se refiere al proceso mediante el cual el ADN, *es decir*, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de enzima lisosómica, se introduce desde el medio circundante al interior de una célula hospedante.

El término “transducción” se refiere a la introducción de ADN, *es decir*, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Gba, en una célula hospedante procariota, *por ejemplo* en una célula hospedante procariota vía un virus bacteriano, o bacteriófago. Una célula hospedante procariota o eucariota que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha “transformado” o “transducido”, y es un “transformante” o un “clon”. El ADN o ARN introducido en una célula hospedante puede proceder de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula hospedante, o células de un género o especie diferente, o secuencias sintéticas.

La expresión “célula manipulada recombinantemente” se refiere a cualquier célula procariota o eucariota que se ha manipulado para expresar o sobreexpresar el ácido nucleico de interés, *es decir*, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Gba, por cualquier método apropiado, incluyendo transfección, transformación o transducción. Este término también incluye activación endógena de un ácido nucleico en una célula que normalmente no expresa ese producto génico, o que expresa el producto génico en un nivel por debajo del óptimo.

El término “transfección” significa la introducción de un ácido nucleico “extraño” (*es decir*, extrínseco o extracelular) en una célula. El ácido nucleico “extraño” incluye un gen, secuencia de ADN o de ARN a una célula hospedante, de manera que la célula hospedante replicará el ADN y expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o secuencia introducida. El gen introducido, *es decir*, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Gba, o la secuencia también se puede denominar un gen o secuencia “clonada”, puede incluir secuencias reguladoras o de control, tal como secuencias de inicio, de parada, promotoras, señal, de secreción, u otras secuencias usadas por la maquinaria genética de la célula. El gen o secuencia puede incluir secuencias no funcionales o secuencias con una función desconocida. El ADN se puede introducir como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica, o una célula que recibe y expresa ADN o ARN introducido.

Dependiendo de la célula hospedante usada, la transformación/transfección se realiza usando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en la sección 1.82 de Sambrook et al., 1989 *más arriba*, se usa generalmente para células bacterianas que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO, como se describe en Chung y Miller (Nucleic Acids Res. 1988, 16:3580). Todavía otro método es el uso de la técnica denominada electroporación. Como alternativa, cuando se usa un vector vírico, las células hospedantes se pueden infectar por el virus que contiene el gen de interés.

Las expresiones “vector”, “vector de clonación” y “vector de expresión” significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o de ARN (*por ejemplo*, un gen de Gba) en una célula hospedante, para transformar el hospedante y promover la expresión (*por ejemplo*, transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores incluyen plásmidos, fagos, virus, etc.; se discuten con mayor detalle más abajo.

Los vectores comprenden típicamente el ADN de un agente transmisible, en el que se inserta ADN extraño. Una forma habitual para insertar un segmento de ADN en otro segmento de ADN implica el uso de enzimas denominadas enzimas de restricción, que escinden el ADN en sitios específicos (grupos específicos de nucleótidos) denominados sitios de restricción. Un “casete” se refiere a una secuencia codificante de ADN o segmento de ADN que codifica un producto de expresión que se puede insertar en un vector en sitios de restricción definidos. Los sitios de restricción del casete se diseñan para asegurarse una inserción del casete en el marco de lectura apropiado. Generalmente, el ADN extraño se inserta en uno o más sitios de restricción del ADN vectorial, y después es portado por el vector al interior de la célula hospedante junto con el ADN vectorial transmisible. Un segmento o secuencia de ADN que tiene ADN insertado o añadido, tal como un vector de expresión, también se puede denominar un “constructo de ADN”. Un tipo habitual de vector es un “plásmido”, que generalmente es una molécula autocontenida de ADN bicatenario, habitualmente de origen bacteriano, que puede aceptar fácilmente ADN (extraño) adicional y que se puede introducir fácilmente en una célula hospedante adecuada. Un vector plasmídico contiene a menudo ADN codificante y ADN

promotor, y tiene uno o más sitios de restricción adecuados para insertar ADN extraño. El ADN codificante es una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos particular para una proteína o enzima particular. El ADN promotor es una secuencia de ADN que inicia, regula o media de otro modo o controla la expresión del ADN codificante. El ADN promotor y el ADN codificante pueden proceder del mismo gen o de diferentes genes, y pueden proceder del mismo organismo o de organismos diferentes.

Se ha descrito un gran número de vectores, incluyendo vectores plasmídicos y fúngicos, para la replicación y/o expresión en una variedad de hospedantes eucariotas y procariotas. Los ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Clonetech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen, Inc., Madison, WI), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, CA), o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA), pCXN y muchas células hospedantes apropiadas, usando métodos descritos o citados aquí, o conocidos de otro modo por los expertos en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinantes incluirán a menudo uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el hospedante, *por ejemplo* resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

Para expresar las proteínas de interés, se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de hospedantes/vectores de expresión (*es decir*, sistemas de expresión). Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Los vectores adecuados incluyen plásmidos bacterianos conocidos, *por ejemplo* los plásmidos de *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., Gene 67:31-40, 1988), pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; DNAs de fagos, *por ejemplo* los numerosos derivados de fago 1, *por ejemplo* NM989, y otro ADN fágico, *por ejemplo* M13, y ADN fágico monocatenario filamentos; plásmidos de levadura tales como el plásmido 2m o sus derivados; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADNs fágicos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN fágico u otras secuencias de control de la expresión; y similares. Otro sistema de expresión habitual usa células hospedantes de insectos y vectores baculovíricos.

Los vectores de expresión ejemplares comercialmente disponibles para uso en células de mamíferos incluyen pMEP4, pCEP4, pLXSN, PXT1, serie pcDNA3, serie pcDNA4, pCMV-Script, pCMV-Tag y otros vectores a base de CMV, pVP22, pVAX1, pUB6. Para la transfección de células de mamíferos, los vectores víricos incluyen vectores víricos adenoasociados, poxvirus, y retrovirus. Los vectores de expresión de mamíferos son habituales y bien conocidos en la técnica.

Las células hospedantes pueden también cosechar inherentemente el polipéptido de interés, por ejemplo Gba. Para polipéptidos heterólogos tales como Gba, el ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, ADNc) se inserta adecuadamente en un vector replicable para la expresión en el medio de cultivo bajo el control de un promotor adecuado. Como se señala anteriormente, existen muchos vectores para este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico a insertar en el vector y de la célula hospedante particular a transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de su función (amplificación de ADN o expresión de ADN) y de la célula hospedante particular con la que es compatible. Los componentes del vector para la transformación bacteriana incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, y un promotor.

El ADN que codifica el polipéptido de Gba se puede expresar no sólo directamente, sino también como una fusión con otro polipéptido, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el término N del polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada debería ser aquella que se reconoce y procesa (*es decir*, es escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedante. Para células hospedantes bacterianas que no reconocen ni procesan la secuencia señal polipeptídica nativa, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal bacteriana seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o líderes de enterotoxina II termoestables.

Tanto el vector de expresión como el de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedantes seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación, esta secuencia es aquella que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedante, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas.

Los vectores de expresión y de clonación también contienen generalmente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células hospedantes transformadas que se hacen crecer en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedantes no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina; (b) complementan deficiencias auxotróficas; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de los medios complejos. Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedante. Aquellas células que son transformadas con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco, y de este modo

sobreviven al régimen de selección.

El vector de expresión para producir un polipéptido heterólogo también contiene un promotor inducible que es reconocido por el organismo hospedante y está enlazado operablemente al ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés.

- 5 Una "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN capaz de unir ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante en dirección 3' (dirección 3'). Con el fin de definir la presente invención, la secuencia promotora está unida en su término 3' mediante el sitio de iniciación de la transcripción y se extiende en dirección 5' (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción, así como dominios de unión de proteínas (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa.

- 10 Una secuencia codificante está "bajo el control" de o "asociada operativamente con" secuencias de control transcripcionales y traduccionales en una célula cuando ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante en ARNm, que entonces se empalma en trans el ARN (si contiene intrones) y se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

- 15 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enunciados anteriormente emplea técnicas de ligación estándar. Los plásmidos o fragmentos de ADN aislados se escinden, se personalizan a la medida y se vuelven a ligar en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

- 20 Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se usan las mezclas de ligación para transformar cepas bacterianas, y se seleccionan transformantes con éxito mediante resistencia a ampicilina o a tetraciclina cuando sea apropiado. Los plásmidos para los transformantes se preparan, se analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción, y/o se secuencian mediante el método de Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977, 74:5463-5467 o Messing et al., Nucleic Acids Res. 1981, 9:309, o mediante el método de Maxam et al. (Methods in Enzymology 1980, 65:499). Las células hospedantes se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para el promotor utilizado.

Definiciones químicas

- 30 El término "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo de C₁-C₂₀ lineal o ramificado que consiste solamente en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, y que está unido al resto de la molécula mediante un enlace sencillo, *por ejemplo* metilo, etilo, n-propilo, 1-metiletilo (isopropilo), n-butilo, n-pentilo, 1,1-dimetiletilo (t-butilo). Los alquilos usados aquí son preferiblemente alquilos de C₁-C₈.

El término "alquenilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático de C₂-C₂₀ que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono y que puede ser una cadena lineal o ramificada, *por ejemplo* etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), iso-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo.

- 35 El término "cicloalquilo" representa un sistema anular hidrocarbonado mono- o multicíclico no aromático, insaturado, tal como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo. Los ejemplos de grupos cicloalquílicos multicíclicos incluyen grupos perhidronaftilo, adamantilo y norbornilo, grupos cíclicos con puente o grupos espirobicíclicos, *por ejemplo* espiro(4,4)non-2-ilo.

- 40 El término "cicloalcalquilo" se refiere a un cicloalquilo como se define anteriormente unido directamente a un grupo alquilo como se define anteriormente, que da como resultado la creación de una estructura estable tal como ciclopropilmetilo, ciclobutiletilo, ciclopentiletilo.

El término "éter alquílico" se refiere a un grupo alquilo o grupo cicloalquilo como se define anteriormente que tiene al menos un oxígeno incorporado en la cadena alquílica, *por ejemplo* metil etil éter, éter dietílico, tetrahidrofurano.

- 45 El término "alquilamina" se refiere a un grupo alquilo o a un grupo cicloalquilo como se define anteriormente que tiene al menos un átomo de nitrógeno, *por ejemplo* n-butilamina y tetrahidrooxazina.

El término "arilo" se refiere a radicales aromáticos que tienen un intervalo de alrededor de 6 a alrededor de 14 átomos de carbono, tal como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, bifenilo.

El término "arilalquilo" se refiere a un grupo arilo como se define anteriormente enlazado directamente a un grupo alquilo como se define anteriormente, *por ejemplo* -CH₂C₆H₅, y -C₂H₄C₆H₅.

- 50 El término "heterocíclico" se refiere a un radical anular de 3 a 15 miembros estable que consiste en átomos de carbono y de 1 a 5 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, fósforo, oxígeno y azufre. Para los fines de esta invención, el radical anular heterocíclico puede ser un sistema anular monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas anulares condensados, en puente o espiro, y los átomos de nitrógeno, fósforo, carbono, oxígeno o azufre en el radical anular heterocíclico puede estar opcionalmente oxidado a diversos estados

de oxidación. Además, el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical anular puede estar parcial o completamente saturado (*es decir*, heteroaromático o heteroarilaromático). Los ejemplos de tales radicales anulares heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, azetidino, acridino, benzodioxolilo, benzodioxanilo, benzofurnilo, carbazolilo, cinolino, dioxolanilo, indolizino, naftiridino, perhidroazepino, fenazino, fenotiazino, fenoxazino, ftalazino, piridilo, pteridino, purino, quinazolino, quinoxalino, quinolino, isoquinolino, tetrazolo, imidazolilo, tetrahydroisoquinolilo, piperidino, piperazino, 2-oxopiperazino, 2-oxopiperidino, 2-oxopirrolidino, 2-oxoazepino, azepino, pirrolilo, 4-piperidono, pirrolidino, pirazino, pirimidino, piridazino, oxazolilo, oxazolino, oxazolidino, triazolilo, indano, isoxazolilo, isoxazolidino, morfolino, tiazolilo, tiazolino, tiazolidino, isotiazolilo, quinuclidino, isotiazolidino, indolilo, isoindolilo, indolino, isoindolino, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, quinolilo, isoquinolilo, decahidroisoquinolilo, bencimidazolilo, tiadiazolilo, benzopirano, benzotiazolilo, benzooxazolilo, furilo, tetrahydrofurilo, tetrahidropirano, tienilo, benzotienilo, tiamorfolino, tiamorfolinilsulfóxido, tiamorfolinilsulfona, dioxafosfolano, oxadiazolilo, cromano, isocromano.

El radical anular heterocíclico se puede unir a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heteroarilo" se refiere a un anillo heterocíclico en el que el anillo es aromático.

El término "heteroarilalquilo" se refiere a un radical anular heteroarílico como se define anteriormente enlazado directamente a un grupo alquilo. El radical heteroarilalquílico puede estar unido a la estructura principal en cualquier átomo de carbono del grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heterociclilo" se refiere a un radical anular heterocíclico como se define anteriormente. El radical anular heterociclilo puede estar unido a la estructura principal en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado la creación de una estructura estable.

El término "heterocicilalquilo" se refiere a un radical anular heterocíclico como se define anteriormente enlazado directamente a un grupo alquilo. El radical heterocicilalquilo puede estar unido a la estructura principal en un átomo de carbono en el grupo alquilo que dé como resultado la creación de una estructura estable.

Los sustituyentes en el "alquilo sustituido", "alqueno sustituido", "alquino sustituido", "cicloalquilo sustituido", "cicloalcalquilo sustituido", "cicloalqueno sustituido", "arilalquilo sustituido", "arilo sustituido", "anillo heterocíclico sustituido", "anillo heteroarílico sustituido", "heteroarilalquilo sustituido", o "anillo heterocicilalquílico sustituido", pueden ser iguales o diferentes, con uno o más seleccionados de los grupos hidrógeno, hidróxido, halógeno, carboxilo, ciano, amino, nitró, oxo (=O), tio (=S), o grupos opcionalmente sustituidos seleccionados de alquilo, alcoxi, alqueno, alquino, arilo, arilalquilo, cicloalquilo, arilo, heteroarilo, heteroarilalquilo, anillo heterocíclico, -COOR^x, -C(O)R^x, -C(S)R^x, -C(O)NR^xR^y, -C(O)ONR^xR^y, -NR^xCON-R^yR^z, -N(R^x)SOR^y, -N(R^x)SO₂R^y, -(=N-N(R^x)R^y), -NR^xC(O)OR^y, -NR^xR^y, -NR^xC(O)R^z, -NR^xC(S)R^y, -NR^xC(S)NR^yR^z, -SONR^xR^y, -SO₂NR^xR^y, -OR^x, -OR^xC(O)NR^yR^z, -OR^xC(O)OR^y, -OC(O)R^x, -OC(O)NR^xR^y, -R^xNR^yR^z, -R^xR^yR^z, -R^xCF₃, -R^xNR^yC(O)R^z, -R^xOR^y, -R^xC(O)OR^y, -R^xC(O)NR^yR^z, -R^xC(O)R^z, -R^xOC(O)R^y, -SR^x, -SOR^x, -SO₂R^x, -ONO₂, en los que R^x, R^y y R^z en cada uno de los grupos anteriores puede ser un átomo de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, haloalquilo, arilalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalcalquilo sustituido o no sustituido, anillo heterocíclico sustituido o no sustituido, heterocicilalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heteroarilalquilo sustituido o no sustituido.

El término "halógeno" se refiere a radicales de flúor, cloro, bromo y yodo.

Ganancia tóxica de función

En una realización particular, la invención se refiere al uso de chaperonas farmacológicas específicas para una enzima lisosómica para incrementar el nivel de tráfico proteico apropiado y disminuir el nivel de acumulación de enzima mutante. Esto a su vez se puede usar para tratar afecciones neurológicas asociadas con una mutación o mutaciones en la enzima, incluyendo formas de enfermedades de almacenamiento lisosómico en las que la mutación en uno o en ambos alelos produce enzimas que son mutaciones conformacionales pero que también tienen mutaciones en dominios funcionales, aboliendo la actividad enzimática. Esta realización se ejemplifica aquí mediante el efecto de una chaperona farmacológica específica en una Gba mutante encontrada en una forma neurológica de la enfermedad de Gaucher en la que no había Gba funcional. La chaperona incrementó el nivel de tráfico de proteína Gba desde el ER, y restauró la ubiquitinación apropiada de la proteína mutante. Este efecto no fue previsible a partir del trabajo previo sobre el rescate mediante ASSC de la función proteica.

La agregación de proteínas, tal como la acumulación de Gba mutante, en el SNC es particularmente nefasta puesto que las neuronas son incapaces de regenerarse tras la neurodegeneración o apoptosis que surge del estrés neuronal asociado con la acumulación tóxica. De este modo, la presencia de mutaciones homocigotas o heterocigotas es suficiente para provocar la agregación o acumulación de proteínas mutantes en neuronas y provocar estrés celular, conduciendo finalmente a la muerte celular. Se han publicado numerosos informes que relacionan la agregación proteica en el SNC con la patología.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención se basa en el concepto de que la patología del SNC en

enfermedades de almacenamiento lisosómico y otros trastornos neurológicos asociados con mutaciones en enzimas lisosómicas se pueden explicar, en parte, por acumulación tóxica de enzimas mutantes, erróneamente plegadas, en las neuronas, y que un enfoque de chaperonas farmacológicas específicas puede invertir este efecto. El efecto tóxico también depende de la función de la proteína, los efectos de la mutación sobre la función y estabilidad de la proteína, y si la pérdida o reducción de la función proteica es más o menos perjudicial que los efectos tóxicos de la acumulación y/o agregación proteica. En consecuencia, el aumento del tráfico de la proteína desde el ER usando una chaperona farmacológica específica puede aliviar la patología de la enfermedad al reducir los efectos tóxicos de la acumulación/agregación proteica, incluso sin restaurar necesariamente la función proteica.

Se concluye que las chaperonas farmacológicas específicas podrían usarse potencialmente para tratar cualquier enfermedad en la que un contribuyente significativo a la patología de la enfermedad es la acumulación tóxica de proteína y/o la agregación proteica, incluyendo la asociada con enfermedades neurodegenerativas, especialmente enfermedades de almacenamiento lisosómico con implicación neurológica, tal como enfermedad de Gaucher, y otros factores de riesgo, trastornos y afecciones neurológicas asociados con mutaciones en enzimas lisosómicas, tal como la enfermedad de Parkinson. Como se indica anteriormente, otros tipos de enfermedad neurológica que pueden estar asociados con una enzima lisosómica disfuncional, y de este modo se pueden tratar mediante chaperonas farmacológicas, son enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Canavan, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, enfermedad de Pick, y atrofia espinocerebelosa.

En consecuencia, un método de tratamiento que incremente el transporte de enzima mutante desde el ER, y/o incremente la actividad enzimática, es beneficioso a la hora de mitigar los efectos neuronopáticos asociados con la enfermedad de almacenamiento lisosómico u otras enfermedades neurológicas asociadas que están relacionadas con mutaciones en enzimas lisosómicas. Incluso en ausencia de un incremento de la actividad enzimática (*es decir*, restauración de la pérdida de función), y de una reducción de la acumulación de sustrato, el tráfico apropiado de enzima mutante tiene efectos beneficiosos sobre la neurona, tales como (i) aliviar el estrés celular sobre la ruta de degradación de ubiquitina/proteasoma para proteínas normales; o (ii) reducir la respuesta de la proteína no plegada provocada por el estrés de ER, mejorando así patologías tales como, *por ejemplo*, agregación de α -sinucleína en pacientes con Parkinson que tienen mutaciones en Gba. El respaldo para estos efectos se proporciona directamente a continuación.

Estrés celular. Está bien establecido que la acumulación o agregación de numerosas proteínas plegadas erróneamente en una célula conduce a estrés celular. Este estrés está correlacionado algunas veces con mayores cantidades de poliubiquitina, una proteína de "estrés" celular. Conjugados de ubiquitina-proteína han revelado que la ubiquitina es un componente de muchos de los cuerpos de inclusión filamentosos característicos de enfermedades neurodegenerativas, sugiriendo activación o una respuesta neuronal común en este tipo de proceso mórbido (Lowe et al., *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1990; 16: 281-91). Por ejemplo, estudios genéticos, que incluyen la identificación de mutaciones en genes asociados con enfermedad de Parkinson familiar (incluyendo α -sinucleína), y la presencia de inclusiones citoplásmicas proteinosas en neuronas nigrales dopaminérgicas de repuesto en casos esporádicos de enfermedad de Parkinson han sugerido un papel importante para el sistema de ubiquitina-proteasoma y la degradación proteica aberrante (Betarbet et al., *Exp Neurol.* 2005;191 Supl. 1:S17-27)

Además, estudios *in vivo* e *in vitro* han relacionado la α -sinucleína agregada y el estrés oxidativo a un sistema comprometido de ubiquitina-proteasoma y patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Además, se han identificado en pars compacta de la sustancia negra de pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica defectos estructurales y funcionales en proteasomas 26/20S con acumulación y agregación de proteínas anormales potencialmente citotóxicas (McKnaught et al., *Ann Neurol.* 2003; 53 Supl. 3:S73-84). Específicamente, mutaciones en α -sinucleína que hacen que la proteína se pliegue erróneamente y resista a la degradación proteasómica provocan enfermedad de Parkinson familiar. De este modo, un defecto en la manipulación de proteínas parece ser un factor común en la forma esporádica y diversas formas familiares de PD. Esta misma conclusión se extrajo de experimentos en los que una combinación de un inhibidor de proteasoma con agentes que inducen el plegamiento erróneo de proteínas se añadió a un cultivo de neuronas dopaminérgicas (Mytilineou et al., *J Neural Transm.* 2004; 111(10-11):1237-51). La pérdida preferente de neuronas dopaminérgicas y la muerte celular aumentan notablemente cuando se combinan los dos.

Además, se ha dado a conocer que se encontraron en células de pacientes agregados de proteínas ubiquitinadas para algunas enfermedades de almacenamiento lisosómico, incluyendo enfermedad de Gaucher (Asmarina et al., *Eur. J. Biochem.* 2003; Suplemento 1; abstract n° P3.7-08). Estas células también presentaron patrones de expresión génica alterados para genes relacionados con la ruta de ubiquitina/proteasoma.

Una teoría alternativa para las interrupciones en la homeostasis neuronal en LSDs con implicación del SNC es debida a supresión de la ruta de ubiquitina/proteasoma por las enzimas acumuladas (Rocca et al., *Molecular Biology of the Cell.* 2001; 12: 1293-1301). Por ejemplo, se ha encontrado que uno de los mecanismos de toxicidad asociado con agregación de α -sinucleína es la inhibición proteasómica, que aparece en muchos procesos neurodegenerativos. Específicamente, se demostró que α -sinucleína agregada inhibe la función proteasómica al interactuar con S6', una subunidad del proteasoma (Snyder et al., *J Mol Neurosci.* 2004;24(3):425-42). La función proteasómica está disminuida en cerebros de sujetos con enfermedad de Parkinson, así como en cerebros de

individuos y animales que carecen de parkina, que es una E3 ubiquitina ligasa y parte del sistema proteasómico de ubiquitina. La agregación proteica, y la inhibición proteasómica asociada, también se ha relacionado con la inflamación (Li et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003; 35: 547-552). Se ha propuesto que un desequilibrio entre chaperonas moleculares y proteínas dañadas/desnaturalizadas/plegadas erróneamente, que conduce a la acumulación de estas últimas, puede dar como resultado la senescencia, inhibición del proteasoma (que conduce a apoptosis), o necrosis, dependiendo de la gravedad del desequilibrio (Soti et al., *Aging Cell.* 2003; 2: 39-45). Esta hipótesis se denomina como la "hipótesis de acumulación de proteína tóxica". Puesto que se piensa que los monómeros de α -sinucleína son degradados por los proteasomas, y la formación de oligómeros depende de la concentración, esto podría conducir a una acumulación y oligomerización de α -sinucleína. La acumulación tanto de Gba mutante como de α -sinucleína (ésta última debido a la pérdida de actividad de Gba) exacerbaría este efecto sobre los proteasomas, y Gba deficiente también puede alterar cualquier incremento en la respuesta autofágica por lisosomas que se produce para compensar la deficiencia de la ruta de la degradación del proteasoma.

Estrés del ER. Además de la discusión citada anteriormente, la acumulación continuada de proteínas plegadas erróneamente en la luz del ER crea una respuesta de estrés del ER, que, a su vez, provoca la "respuesta de proteína no plegada" (UPR). La UPR es una respuesta de estrés celular de control de calidad que resulta de la inhibición de la síntesis proteica, tal como mediante estrés oxidativo, o retención de proteínas mutantes en el ER que son incapaces de plegarse. Sin esta respuesta, el ER se dilata con proteínas inestables plegadas erróneamente, lo que puede dar como resultado la muerte celular vía apoptosis (Gow et al., *NeuroMolecular Med.* 2003; 4: 73-94).

Ahora se ha demostrado que Gba interacciona con el receptor de rianodina en el ER para perturbar la homeostasis de Ca^{2+} , conduciendo a un plegamiento alterado de la proteína y a UPR, apoptosis inducida por estrés del ER, y muerte celular dirigida por mitocondrias debido a un incremento en Ca^{2+} citosólico (Korkotian et al., *J Biol Chem.* 1999. 274(31): 21673-8; Lloyd-Evans et al., *J Biol Chem.* 2003. 278(26): 23594-9; Pelled et al., *Neurobiol Dis.* 2005. 18(1): 83-8).

Autofagia. Además de degradar lípidos, los lisosomas son responsables de degradar proteínas agregadas (discutido posteriormente más abajo). Este proceso, denominado autofagia, es un proceso de degradación masivo intracelular a través del cual se suministra a lisosomas una porción del citoplasma a degradar por enzimas lisosómicas. Tales enzimas incluyen proteasas (catepsinas) que escinden enlaces peptídicos, fosfatasas, que eliminan fosfatos unidos covalentemente, nucleasas, que escinden ADN/ARN, lipasas, que escinden moléculas lipídicas, y enzimas que escinden hidratos de carbono. Las proteínas agregadas, incluyendo enzimas lisosómicas mutadas, pueden provocar activación de una respuesta autofágica conspicua, conduciendo a cambios degenerativos de larga duración en las neuronas. Muchas neuronas en trastornos del SNC, incluyendo esclerosis lateral amiotrófica (ALS), muestran un tráfico vesicular irregular y respuestas autofágicas.

Es posible que la vacuolación lisosómica-autofágica excesiva pueda provocar muerte neuronal. La sobreactivación de la respuesta autofágica, especialmente en combinación con inhibición de la ruta proteasómica como un mecanismo compensatorio, por proteínas mutantes acumuladas es una hipótesis para una relación entre enzimas lisosómicas mutantes acumuladas y neurodegeneración, especialmente en enfermedad de Alzheimer.

Pérdida patológica de función

Además de restaurar el tráfico apropiado de enzimas lisosómicas, la restauración mediante chaperona farmacológica específica de la actividad de la enzima mutante puede ser beneficiosa en pacientes que poseen una mutación o mutaciones desestabilizantes en uno o ambos alelos, que reduce o reducen la cantidad de enzima funcional (por ejemplo, Gba) en su localización nativa (por ejemplo, el lisosoma) debido a un plegamiento y tráfico ineficientes. Incluso una pequeña pérdida de función puede conducir a patologías tales como acumulación o agregación de sustrato, lo que puede dar como resultado el germen de otros agregados patológicos.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona métodos para mejorar trastornos neurológicos asociados con proteínas de enzimas lisosómicas mutantes al incrementar la actividad reducida de las enzimas, lo que, a su vez, (i) incrementa la degradación lisosómica de sustratos, proteínas o fragmentos agregados; (ii) disminuye la apoptosis o necrosis neuronal; y (iii) evita la alteración del "equilibrio" fosfolipídico en membranas celulares (discutido directamente más abajo).

Las posibles explicaciones postuladas para explicar la pérdida neuronal o la neuropatía en la enfermedad de Gaucher se puede explicar por la pérdida de actividad de Gba asociada con las mutaciones. La pérdida de actividad provoca la acumulación de ceramida, tal como la GluCer, en células con Gba deficiente. Se ha demostrado que esto provoca apoptosis en células neuronales hipocámpales Ca^{2+} -4 cultivadas, debido a un incremento en el calcio intracelular, y un incremento en la sensibilidad a la muerte celular mediada por calcio. También se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas sufren apoptosis tras daño inducido por ceramida.

En segundo lugar, se han observado niveles elevados del compuesto tóxico glucosilesfingosina, también como sustrato de Gba, en órganos de ratones con Gaucher con alelo null letal. La glucosilesfingosina también está elevada en tejidos de pacientes que tienen los tres tipos de enfermedad de Gaucher. Aunque los niveles cerebrales están elevados solamente en aquellos pacientes con implicación neuronal usando métodos actuales de detección

(Sidransky, Mol. Gen. Metabol. 2004; 83: 6-15), pequeñas cantidades de acumulación, no detectables usando métodos actuales, podrían todavía afectar al plegamiento proteico y también alterar el tráfico de proteínas al afectar la composición de la balsa lipídica (discutido *más abajo*).

En tercer lugar, el contenido de fosfolípidos de la membrana afecta a la actividad de Gba en células. Concretamente, los fosfolípidos cargados negativamente potencian la actividad de Gba, y los fosfolípidos cargados positivamente, tales como fosfatidilcolina (PC), no lo hacen. Por lo tanto, un mecanismo en el que Gba disminuida en enfermedad de Gaucher activa una enzima implicada en la síntesis de PC, incrementando de ese modo PC, puede provocar una reducción adicional en Gba (Wong et al., *más arriba*). Además, la ceramida elevada puede impedir el transporte axonal de α -sinucleína, favoreciendo la agregación y la formación de cuerpos de Lewy. Las neuronas requieren presumiblemente α -sinucleína para funcionar. Puesto que α -sinucleína se une pobremente a PC, las vesículas del transporte axonal, que están comprendidas principalmente de PC, pueden no ser tan eficientes como las vesículas que comprenden fosfolípidos ácidos (Wong et al., *más arriba*).

Además, como se discute anteriormente, los lisosomas están implicados en el aclaramiento de agregados implicados en numerosos trastornos del SNC mediante autofagia. La autofagia es particularmente relevante en neuronas, puesto que la pérdida de autofagia provoca neurodegeneración incluso en ausencia de cualesquiera proteínas mutantes asociadas a enfermedades (Hara et al., Nature, publicación en línea, 19 de abril de 2006). La inducción del sistema autofágico lisosómico, en un esfuerzo protector por eliminar componentes intracelulares alterados, se produce durante el estrés oxidativo (Kiffin et al., Antioxid Redox Signal. 2006; 8(1-2):152-62).

Como ejemplo, oligómeros de α -sinucleína. Un grupo dio a conocer una interacción entre gangliósidos que contienen glucosilceramida y α -sinucleína en lisosomas en homogenados de cerebro humano (Schlossmacher et al., New Eng J Med. 2005; 352: 730). En pacientes con Gaucher con la enfermedad de Parkinson, Gba se colocó con α -sinucleína en cuerpos de Lewy (Wong et al., Mol. Genet. Metabol. 2004; 38: 192-207). Estos resultados apoyan que el procesamiento de α -sinucleína se produce en los lisosomas, y proporciona una relación bioquímica entre la actividad de Gba disminuida y la sinucleinopatía en la enfermedad de Parkinson.

Además, la autofagia es esencial para la eliminación de formas agregadas de huntingtina y ataxina-1 mutantes del compartimiento citoplásmico (Iwata et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(37):13135-40). La autofagia también desempeña el papel principal en el aclaramiento de células de agregados proteicos en esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y otros trastornos de expansión de poliglutamina (Meriin et al., Int J Hyperthermia. 2005; 21(5):403-19). De este modo, las deficiencias en hidrolasas lisosómicas afectarían adversamente a la respuesta autofágica a la acumulación tóxica de proteínas (incluyendo las propias proteínas lisosómicas acumuladas).

Acumulación de sustrato y defectos de tráfico endocítico. La acumulación de sustratos celulares, tales como los esfingolípidos y colesterol en enfermedades lisosómicas, especialmente aquellas que implican al SNC, se ha asociado con perturbaciones en el tráfico endocítico de proteínas y lípidos. Esto puede ocurrir debido a la perturbación de proteínas rab (*ras* en el cerebro), que son proteínas asociadas a la membrana que se localizan en compartimientos subcelulares discretos y están asociadas con el tráfico de proteínas. La perturbación de rab provoca el secuestro por proteínas asociadas a la membrana en "balsas lipídicas". Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana enriquecidos en esfingolípidos (esfingomielina y fosfatidilcolina) y colesterol. Se ha sugerido que sirven como plataformas para diversos sucesos celulares, incluyendo la señalización y el tráfico de la membrana. En particular, las balsas lipídicas estabilizan la asociación de proteínas ancladas a GPI dentro de la membrana del ER, y están implicadas directamente en la conformación de las proteínas y también dirigen a los lípidos o proteínas asociadas a lípidos que entran en la célula hacia el compartimiento apropiado vía endosomas. Por lo tanto, la acumulación de balsas lipídicas en las membranas de endosomas y lisosomas en, por ejemplo, enfermedades del almacenamiento lisosómico, debido a una menor actividad de hidrolasa lipídica, podría alterar la clasificación intracelular de glicosfingolípidos (que ya están acumulados), y proteínas asociadas a lípidos que entran en la célula (Pagano et al., Philo Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003; 358: 885-91).

Esta hipótesis de pérdida de clasificación está apoyada por hallazgos recientes en mucopolisacaridosis (MPSs), en los que se demostró que dos sustratos acumulados diferentes, gangliósidos GM_2 y GM_3 , se acumulan en las mismas neuronas, pero estaban localizados consistentemente en poblaciones separadas de vesículas citoplásmicas (McGlynn et al., Comp Neurol. 2004; 480: 415-26). Estos autores teorizaron que el co-secuestro en neuronas individuales sugiere la presencia de defectos en la composición, tráfico, y/o reciclaje de componentes de la balsa lipídica, conduciendo a nuevos mecanismos para explicar la disfunción neuronal en trastornos de MPS.

Los estudios de modelos de ratón para la enfermedad de Gaucher también sugieren que actividad de Gba reducida perturba más generalmente el catabolismo de glucoesfingolípidos, conduciendo a la acumulación de especies más complejas (gangliósidos). La acumulación de gangliósidos puede dar como resultado distonía y parkinsonismo en seres humanos (Roze et al., Movement Disorders. 2005; 20(10): 1366-1369). Un modelo de ratón que acumula gangliósido GM_2 también acumuló α -sinucleína (Suzuki et al., Neuroreport. 2003; 14(4):551-4). Tal acumulación de gangliósidos también puede conducir a acumulación de α -sinucleína, así como muerte neuronal a través de las rutas de UPR (Lee et al., J Biol Chem. 2002. 277(1): 671-8). Además, como se cita anteriormente, se ha demostrado que los esfingolípidos pueden funcionar como un germen para la formación de agregados de α -sinucleína.

5 Estos mecanismos de neurotoxicidad como resultado de acumulación de lípidos pueden explicar parcialmente la neuropatología de la enfermedad de Gaucher, puesto que hay una correlación imprecisa entre la actividad de Gba y la gravedad de la enfermedad de Gaucher. Esta correlación trabaja para diferenciar los tres tipos de la enfermedad principales (I-III), aunque existe un solapamiento, y la correlación es débil dentro de los tipos individuales. Los pacientes que son heterocigotos normales para Gba no experimentan acumulación significativa de lípidos, debido a que hay cierta cantidad de Gba activa producida por el alelo normal. Sin embargo, incluso la acumulación de pequeñas cantidades de GluCer puede perturbar la homeostasis del calcio del ER y alterar el plegamiento proteico, (descrito anteriormente), o incluso posiblemente sembrar la agregación de α -sinucleína mediante algún mecanismo.

10 En vista de lo anterior, el uso de chaperonas farmacológicas específicas según la presente invención es ventajoso con respecto a la terapia de sustitución enzimática (ERT) y la terapia de reducción de sustrato (SRT), puesto que la primera se debe administrar directamente en el cerebro vía un catéter, y puesto que ninguna resuelve los problemas de la acumulación tóxica de las propias enzimas lisosómicas mutantes, es decir, Gba mutante. Por lo tanto, estos tratamientos son menos eficaces que un tratamiento que puede reducir la acumulación de proteína mutante, o potenciar y/o restaurar la función proteica (reduciendo de ese modo la acumulación de sustrato), o ambos.

15 Enzimas lisosómicas mutantes y chaperonas farmacológicas específicas

A continuación se da una tabla que enumera enzimas lisosómicas y chaperonas farmacológicas específicas para esas enzimas lisosómicas que se pueden usar para tratar individuos que tienen mutaciones en las enzimas y que tienen una afección o trastorno neurológico resultante, o están en riesgo de desarrollar una afección o trastorno neurológico.

ENZIMA LISOSÓMICA	CHAPERONA FARMACOLÓGICA ESPECÍFICA
α -Glucosidasa Nº de Acceso de GenBank Y00839	1-desoxinojirimicina (DNJ) α -homonojirimicina castanospermina
β -Glucosidasa ácida (glucocerebrosidasa) Nº de Acceso de GenBank J03059	isofagomina C-bencil isofagomina y derivados N-alkil de (C9-12)-DNJ Glucoimidazol (y derivados) C-alkil-IFG (y derivados) N-alkil- β -valeinaminas Flufenocina calisteginas A ₃ , B ₁ , B ₂ y C ₁
α -Galactosidasa A Nº de Acceso de GenBank NM000169	1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) α -alo-homonojirimicina α -galacto-homonojirimicina β -1-C-butil-desoxinojirimicina calisteginas A ₂ y B ₂ N-metil calisteginas A ₂ y B ₂
β -Galactosidasa ácida Nº de Acceso de GenBank M34423	=
Galactocerebrosidasa (β -Galactosidasa acida) Nº de Acceso de GenBank D25283	4-epi-isofagomina 1-desoxigalactonojirimicina
α -Manosidasa ácida Nº de Acceso de GenBank U68567	1-desoximanojirimicina Swainsonina Manostatina A
β -Manosidasa ácida Nº de Acceso de GenBank U60337	2-hidroxi-isofagomina

α -L-fucosidasa ácida Nº de Acceso de GenBank NM_000147	1-desoxifuconojirimicina β -homofuconojirimicina 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-L-glucitol 2,5-desoxi-2,5-imino-D-fucitol 2,5-imino-1,2,5-tridesoxi-D-altritol
α -N-Acetilglucosaminidasa Nº de Acceso de GenBank U40846	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-nojirimicina
α -N-Acetilgalactosaminidasa Nº de Acceso de GenBank M62783	1,2-didesoxi-2-N-acetamido-galactonojirimicina
β -Hexosaminidasa A (Nº de Acceso de GenBank NM_000520)	2-N-acetilamino-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina nagstaina
β -Hexosaminidasa B Nº de Acceso de GenBank NM_000521	2-N-acetamido-isofagomina 1,2-didesoxi-2-acetamido-nojirimicina nagstaina
α -L-Iduronidasa Nº de Acceso de GenBank NM 000203	1-desoxiiduronojirimicina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
β -Glucuronidasa Nº de Acceso de GenBank NM_000181	6-carboxi-isofagomina 2-carboxi-3,4,5-tridesoxipiperidina
Sialidasa Nº de Acceso de GenBank U84246	Ácido 2,6-didesoxi-2,6, imino-siálico Siaistatina B
Iduronato sulfatasa Nº de Acceso de GenBank AF_011889	2,5-anhidromanitol-6-sulfato
Esfingomielinasa ácida Nº de Acceso de GenBank M59916	desipramina, fosfatidilinositol-4,5-difosfato

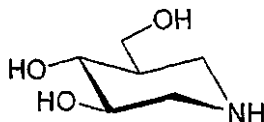
En una realización específica, a continuación se dan algunas chaperonas farmacológicas específicas contempladas por esta invención que se pueden usar para tratar factores de riesgo, afecciones o trastornos neurológicos en los que Gba está mutada. También se ejemplifican mutaciones de Gba contempladas para ser “rescatadas” por las chaperonas.

Mutaciones de Gba. La presencia de la mutación de punto de Gba N370S en al menos un alelo (heterocigotos) está casi universalmente asociada con enfermedad de Gaucher tipo 1 (Cox, *más arriba*). La homocigosidad N370S está asociada con un fenotipo menos grave que la heterocigosidad Gba null/N370S (N370S/null), probablemente debido a la actividad de Gba residual de los homocigotos. De hecho, algunos pacientes N370S/N370S son asintomáticos durante la mayor parte de su vida, pero pueden estar en riesgo de desarrollar trastornos neurológicos tales como enfermedad de Parkinson. En este caso, la mutación de Gba sería un factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson. Las mutaciones de punto adicionales asociadas con enfermedad de Gaucher de tipo 1 incluyen 84GG, R496H, Q350X, y H162P (Orvisky et al., Human Mutation. 2002; 495, 19(4):458-9). Además, las mutaciones de sitio de empalme IVS10+2T→G e IVS10+2T→A también se asociaron con enfermedad de Gaucher tipo I (Orvisky, *más arriba*).

La enfermedad de Gaucher tipo 2 neuronopática está asociada con mutaciones que dan como resultado principalmente dos sustituciones de aminoácidos, L444P y A456P. La homocigosidad L444P también está asociada habitualmente con la enfermedad de Gaucher tipo 3, aunque esta mutación se ha identificado en pacientes con los tres tipos de la enfermedad. Otras mutaciones de punto asociadas con la enfermedad de Gaucher neuronopática de tipos 2 y 3 incluyen D409H (homocigotos) y V349L y D409V (heterocigotos). Los pacientes homocigotos para D409H muestran un fenotipo único que incluye hidrocefalia y calcificación de la válvula cardíaca y aórtica, además de la

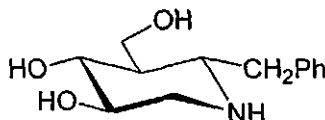
implicación neurológica. Estas dos últimas mutaciones de punto, V349L y D409V, dan como resultado Gba que es catalíticamente defectuosa. Otras mutaciones identificadas en enfermedad de tipo 2 ó 3 son K198E, K198T, Y205C, F251L, 1402F, y la mutación de sitio de empalme IVS10+2T→A (Orvisky et al., *más arriba*; y Lewin et al., Mol Genet Metab. 2004; 81(1):70-3). Los pacientes y los ratones genosuprimidos que carecen de cualquier actividad de Gba mueren poco después del nacimiento debido a deshidratación, puesto que la ceramida es esencial para la integridad cutánea de la piel (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998; 95: 2503-08).

Chaperonas para Gba. Isofagomina (IFG; (3R,4R,5R)-5-(hidroximetil)-3,4-piperidindiol) se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura:

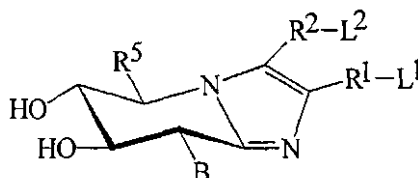


IFG tiene una fórmula molecular de $C_6H_{13}NO_3$ y un peso molecular de 147,17. Este compuesto se describe adicionalmente en las patentes U.S. 5.844.102 de Sierks et al., y 5.863.903, de Lundgren et al.

C-bencil-IFG se refiere a un compuesto que tiene la siguiente estructura:



Otras chaperonas para Gba incluyen glucoimidazol, policiclohexanilo, y derivados de hidroxilpiperidina, que se describen en las solicitudes U.S. publicadas 2005/0130972 y 2005/0137223, en trámite junto con la presente, y en las publicaciones PCT correspondientes WO 2005/046611 y WO 2005/046612, todas presentadas el 12 de noviembre de 2004 e incorporadas aquí como referencia. El glucoimidazol y los derivados se representan mediante la siguiente estructura química:



en la que B se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxilo, acetamino, y halógeno;

R^1 y R^2 opcionalmente presentes son ligadores flexibles cortos de longitud lineal de alrededor de 6Å a alrededor de 12Å, preferiblemente alrededor de 9Å. R^1 y R^2 también se pueden seleccionar independientemente del grupo que consiste en alquilo de C_2 - C_6 sustituido o no sustituido, opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ y $-S(O)_m$ NR^3 ; alqueno de C_2 - C_6 sustituido o no sustituido, opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ y $-S(O)_m$ NR^3 ; alquino de C_2 - C_6 sustituido o no sustituido, opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ y $-S(O)_m$ NR^3 , en los que m es 1 ó 2, y R^3 se selecciona independientemente para cada caso de los grupos que consisten en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido; alquino sustituido o no sustituido; cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalqueno sustituido o no sustituido; arilo sustituido o no sustituido; arilalquilo sustituido o no sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; heterocíclico sustituido o no sustituido; heterociclicualquilo sustituido o no sustituido; heteroarilalquilo sustituido o no sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables y sus profármacos.

Además, R^1-L^1 o R^2-L^2 puede ser un hidrógeno, si R^2-L^2 o R^1-L^1 es distinto de un hidrógeno, respectivamente.

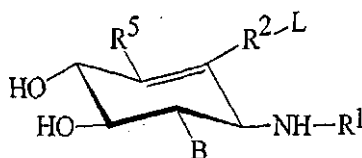
R^5 representa un hidrógeno, hidroxilo, o hidroximetilo;

L^1 y L^2 son grupos lipófilos seleccionados del grupo que consiste en alquilo de C_3 - C_{12} sustituido o no sustituido, alqueno sustituido o no sustituido; alquino sustituido o no sustituido; cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalqueno sustituido o no sustituido; arilo sustituido o no sustituido; arilalquilo sustituido o no sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; heterocíclico sustituido o no sustituido; heterociclicualquilo sustituido o no

sustituido; heteroarilalquilo sustituido o no sustituido.

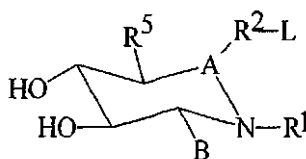
En realizaciones específicas, los compuestos GIZ incluyen (5R,6R,7S,8S)-5-hidroxi-2-octil-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridin-6,7,8-triol y (5R,6R,7S,8S)-5-hidroxi-2-(3,3-dimetilbutil)-5,6,7,8-tetrahidroimidazo[1,2-a]piridin-6,7,8-triol.

- 5 Los derivados de polihidroxicicloalquilo (PHCA) contemplados para uso en la presente invención incluyen compuestos representados por la siguiente estructura química:



en la que B se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, hidroxi, N-acetamino, y halógeno.

- 10 R¹ se selecciona independientemente para cada caso del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquenilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclico sustituido o no sustituido, heterociclicialquilo sustituido o no sustituido, heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, -C(O)R³ y -S(O)_mR³, en los que m es 1 ó 2, y R³ se selecciona independientemente para cada caso de los grupos que consisten en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido; alquinilo sustituido o no sustituido; cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquenilo sustituido o no sustituido; arilo sustituido o no sustituido; arilalquilo sustituido o no sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; heterocíclico sustituido o no sustituido; heterociclicialquilo sustituido o no sustituido; heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, y -C(O) unido a un alquilo de C₁-C₆ sustituido o no sustituido.
- 15 20 R² opcionalmente presente es un ligador flexible corto de longitud lineal de alrededor de 6Å a alrededor de 12Å, preferiblemente alrededor de 9Å. R² también se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en alquilo de C₂-C₆ sustituido o no sustituido, opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR³, O, S, S(O)_m y -S(O)_mNR³; alquenilo de C₂-C₆ sustituido o no sustituido, opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR³, O, S, S(O)_m y -S(O)_mNR³; alquinilo de C₂-C₆ sustituido o no sustituido, opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR³, O, S, S(O)_m y -S(O)_mNR³, en los que m es 1 ó 2, y R³ se selecciona independientemente para cada caso de los grupos que consisten en hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido; alquinilo sustituido o no sustituido; cicloalquilo sustituido o no sustituido, cicloalquenilo sustituido o no sustituido; arilo sustituido o no sustituido; arilalquilo sustituido o no sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; heterocíclico sustituido o no sustituido; heterociclicialquilo sustituido o no sustituido; heteroarilalquilo sustituido o no sustituido, y -C(O) unido a un alquilo de C₁-C₆ sustituido o no sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables y sus profármacos.
- 25 30 L es un grupo lipófilo seleccionado del grupo que consiste en alquilo de C₃-C₁₂ sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido; cicloalquilo sustituido o no sustituido; cicloalquenilo sustituido o no sustituido; arilo sustituido o no sustituido; arilalquilo sustituido o no sustituido; heteroarilo sustituido o no sustituido; heterocíclico sustituido o no sustituido; heterociclicialquilo sustituido o no sustituido; heteroarilalquilo sustituido o no sustituido.
- 35 40 Los derivados de hidroxilpiperidina contemplados para uso en la presente invención en la que Gba está mutada se representa mediante la siguiente estructura química.



en la que A representa un carbono o nitrógeno;

B es hidrógeno, hidroxi, N-acetamida o un halógeno;

R¹ es un hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo,

arilalquilo, heteroarilo, heterocíclico, heterociclicualquilo, heteroarilalquilo; $-C(O)R^3$ y $-S(O)_mR^3$. Preferiblemente, R^1 comprende H o un resto orgánico que tiene 1-12 átomos de carbono.

R^2 es un ligador flexible corto opcional de longitud lineal de alrededor de 6Å a alrededor de 12Å. Como alternativa, R^2 es un alquilo de C_1 - C_6 sustituido o no sustituido, alqueno o alquino opcionalmente interrumpido por uno o más restos escogidos del grupo que consiste en NH, NHCOO, NHCONH, NHCSO, NHCSNH, CONH, NHCO, NR^3 , O, S, $S(O)_m$ y $-S(O)_mNR^3$.

R^3 es un hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno; arilo; arilalquilo; heteroarilo; heterocíclico; heterociclicualquilo; heteroarilalquilo. Preferiblemente, R^3 comprende H o un resto orgánico que tiene 1-12 átomos de carbono, o más preferiblemente 1-6 átomos de carbono.

m es 1 ó 2, y

R^5 es un hidrógeno, hidroxilo, o hidroximetilo.

L es un grupo lipófilo que tiene 1-12 átomos de carbono que comprende alquilo sustituido o no sustituido, alqueno; alquino; cicloalquilo, cicloalqueno; arilo; arilalquilo; heteroarilo; heterocíclico; heterociclicualquilo; heteroarilalquilo.

En realizaciones específicas, los compuestos de hidroxilpiperidina contemplados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes: (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-butil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-hexil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-heptil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-octil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-n-nonil-3,4-dihidroxipiperidina; (3R,4R,5R,6S/6R)-5-(hidroximetil)-6-bencil-3,4-dihidroxipiperidina.

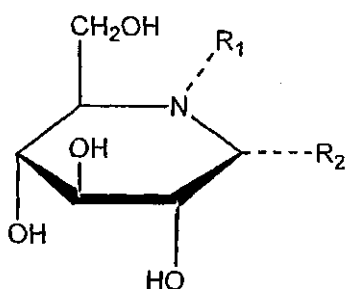
Todavía otras chaperonas para Gba se describen en la patente U.S. 6.599.919 de Fan et al., e incluyen calistegina A₃, calistegina A₅, calistegina B₁, calistegina B₂, calistegina B₃, calistegina B₄, calistegina C₁, N-metil-calistegina B₂, DMDP, DAB, castanospermina, 1-desoxinojirimicina, N-butil-desoxinojirimicina, bisulfito de 1-desoxinojirimicina, N-butilisofagomina, N-(3-ciclohexilpropil)-isofagomina, N-(3-fenilpropil)-isofagomina, y N-[(2E,6Z,10Z)-3,7,11-trimetildodecatrienil]-isofagomina.K.

En otra realización específica, a continuación se dan chaperonas farmacológicas específicas que incluyen 1-desoxinojirimicina (DNJ; 1,5-imino-1,5-didesoxi-D-glucitol nº de CAS 19130-96-2) y derivados que se pueden usar para tratar factores de riesgo, afecciones o trastornos neurológicos en los que la enzima lisosómica α -glucosidasa (Gaa) está mutada.

Las mutaciones ejemplares de Gaa incluyen las siguientes: D645E (Lin et al., Zhonghua Min Guo Xiao Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi. 1996; 37(2):115-21); D645H (Lin et al., Biochem Biophys Res Commun. 1995 17; 208(2):886-93); R224W, S619R, y R660H (New et al. Pediatr Neurol. 2003; 29(4):284-7); T1064C y C2104T (Montalvo et al., Mol Genet Metab. 2004; 81(3):203-8); D645N y L901Q (Kroos et al., Neuromuscul Disord. 2004; 14(6):371-4); G219R, E262K, M408V (Fernandez-Hojas et al., Neuromuscul Disord. 2002; 12(2):159-66); G309R (Kroos et al., Clin Genet. 1998; 53(5):379-82); D645N, G448S, R672W, y R672Q (Huie et al., Biochem Biophys Res Commun. 1998; 27;244(3):921-7); P545L (Hermans et al., Hum Mol Genet. 1994; 3(12):2213-8); C647W (Huie et al., Huie et al., Hum Mol Genet. 1994; 3(7):1081-7); G643R (Hermans et al., Hum Mutat. 1993; 2(4):268-73); M318T (Zhong et al., Am J Hum Genet. 1991; 49(3):635-45); E521K (Hermans et al., Biochem Biophys Res Commun. 1991; 179(2):919-26); W481R (Raben et al., Hum Mutat. 1999;13(1):83-4); y L552P y G549R (datos no publicados).

Los mutantes de empalme incluyen IVS1AS, T>G, -13 y IVS8+1G>A).

Las chaperonas para α -glucosidasa ejemplares se representan mediante la siguiente estructura química:



en la que:

R_1 es H o alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo, alqueno, alquino o alquiléter o alquilamina que contiene 1-12 átomos de carbono, y arilo, alquilarilo, heteroarilo, o heteroarilalquilo que contiene 5-12 átomos anulares, en el que R_1

está opcionalmente sustituido con uno o más de -OH, -COOH, -Cl, -F, -CF₃, -OCF₃, -O-C(=O)N-(alquilo)₂; y

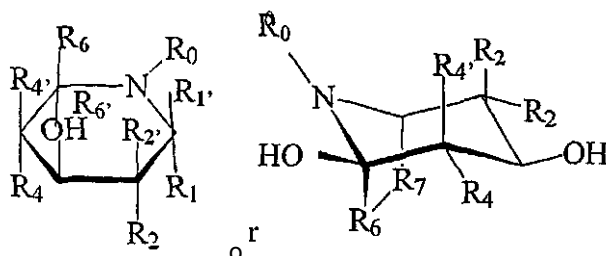
R₂ es H; un alquilo lineal o ramificado, cicloalquilo, alqueno o alquín que contiene 1-9 átomos de carbono, o arilo que contiene 5-12 átomos de carbono, en el que R₂ está opcionalmente sustituido con -OH, -COOH, -CF₃, -OCF₃ o un anillo heterocíclico;

5 en la que al menos uno de R₁ y R₂ no es H, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En particular, las chaperonas para α -glucosidasa ácida incluyen, pero no se limitan a, N-metil-DNJ, N-etil-DNJ, N-propil-DNJ, N-butil-DNJ, N-pentil-DNJ, N-hexil-DNJ, N-heptil-DNJ, N-octil-DNJ, N-nonil-DNJ, N-metilciclopropil-DNJ, y N-metilciclopentil-DNJ.

10 Además de los derivados de DNJ sustituidos en el nitrógeno, otros derivados de DNJ útiles como chaperonas para Gaa incluyen derivados de DNJ N-bencil sustituidos, y también son compuestos preferidos de la presente invención los derivados que tienen un sustituyente colgante en el carbono C-1 adyacente al nitrógeno anular. Tales compuestos se describen en la solicitud número de serie 11/---, presentada el 17 de mayo de 2006, en trámite junto con la presente, de titularidad compartida.

15 En todavía otra realización, las chaperonas preferidas para el tratamiento de trastornos neurológicos asociados con mutaciones heterocigotas en α -galactosidasa (α -Gal A), otra enzima lisosómica, se representan mediante las siguientes estructuras químicas:



en las que R₁ y R_{1'} representan H, OH, o un grupo alquilo de 1-12 carbonos, hidroxialquilo o un grupo alcóxido;

20 R₂ y R_{2'} representan independientemente H, LH, o un grupo N-acetamido, o un grupo alquilo de 1-12 carbonos;

R₄ y R_{4'} representan independientemente H, OH;

R₆ y R_{6'} representan independientemente H, CH₂OH, CH₃, o COOH;

R₇ representa H u OH;

25 R₀ representa H, metilo o una cadena de carbono saturada o insaturada de cadena lineal o ramificada que contiene 9-12 átomos de carbono, opcionalmente sustituida con un grupo fenilo, hidroxilo o ciclohexilo.

En una realización específica, la chaperona es 1-desoxinojirimicina.

Las mutaciones de α -Gal A ejemplares asociadas con enfermedad de Fabry incluyen R301Q, L166V, A156V, G272S, y M296I.

30 Ensayos

Detección y tráfico de proteínas acumuladas. La acumulación de proteínas en el ER se puede detectar y/o visualizar, y se manifiesta como localización perinuclear en perfiles tubulovesiculares que se colocan con proteínas residentes en el ER, tales como BiP. Estas proteínas también están reducidas o ausentes en su localización nativa dentro de la célula, tal como en la superficie celular o en otro compartimiento celular tal como el lisosoma. La acumulación proteica en el citoplasma se puede detectar usando métodos de colocación similares con proteínas citosólicas.

40 Los métodos para detectar el tráfico alterado de enzimas lisosómicas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, para proteínas que son N- y O-glicosiladas en el aparato de Golgi, se puede usar un marcaje metabólico de pulso-seguimiento usando proteínas marcadas radioactivamente, combinado con tratamiento con glucosidasa e inmunoprecipitación, para detectar si las proteínas sufren glicosilación completa en el aparato de Golgi, o si están siendo retenidas en el ER en lugar de circular hacia el aparato de Golgi para la glicosilación posterior.

Los métodos sensibles para detectar visualmente la localización celular de proteínas también incluyen microscopía

- fluorescente, que usa proteínas fluorescentes o anticuerpos fluorescentes. Para la evaluación de muestras celulares, se pueden usar anticuerpos fluorescentes para detectar proteínas. Para la detección en células manipuladas o modificadas mediante ingeniería, las proteínas de interés se pueden etiquetar con, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente ciano, proteína fluorescente amarilla (YFP), y proteína fluorescente roja, antes de la transfección, seguido de microscopía multicolor y de lapso de tiempo y microscopía electrónica para estudiar el destino de las proteínas en células fijas y en células vivas. Para un repaso del uso de formación de imágenes fluorescentes en el tráfico de proteínas, véase Watson et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(1):43-61). Para una descripción del uso de microscopía confocal para la colocalización intracelular de proteínas, véase Miyashita et al., *Methods Mol Biol.* 2004; 261:399-410.
- Además, se pueden usar experimentos de marcaje dual con anticuerpos para, por ejemplo, LAMP-1 o LysoTracker® para el lisosoma (rojo) (u otra tinción o marcador específico para el lisosoma, tal como puntos cuánticos fluorescentes, dextrano con Cascade blue), y enzima lisosómica (verde), relaciones de solapamiento verde/rojo (colocalización), para medir cambios en la enzima lisosómica, por ejemplo el tráfico enzimático hacia los lisosomas (relaciones crecientes de verde/rojo significa que circula más enzima hacia el lisosoma). Las células sanas normales con rutas endocíticas normales deberían producir más fluorescencia. Véase también el Ejemplo 2, *más abajo*.
- La espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) es un método de detección ultrasensible y no invasivo capaz de resolución en tiempo real y de una sola molécula (Vukojevic et al., *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(5): 535-50). SPFI (formación de imágenes mediante fluorescencia de una sola partícula) usa la elevada sensibilidad de la fluorescencia para visualizar moléculas individuales que se han marcado selectivamente con pequeñas partículas fluorescentes (Cherry et al., *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 5): 1028-31). Para la localización de proteínas con balsas lipídicas, véase Latif et al., *Endocrinology.* 2003; 144(11): 4725-8). Para un repaso de la formación de imágenes de células vivas, véase Hariguchi, *Cell Struct Funct.* 2002; 27(5):333-4).
- La microscopía de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) también se usa para estudiar la estructura y localización de proteínas en condiciones fisiológicas (Periasamy, *J Biomed Opt.* 2001; 6(3): 287-91).
- En realizaciones particulares, la detección de α -sinucleína en individuos que poseen mutaciones de Gba se puede realizar usando ELISA o análisis de transferencia Western. Los métodos de LCMS/MS y/o TLC se pueden usar para monitorizar los niveles de GluCer (acumulación de sustrato).
- La monitorización *ex vivo* de niveles de α -sinucleína y las relaciones oligómero/monómero, en respuesta al tratamiento de animales con inhibidores y/o chaperonas, se puede evaluar usando ensayos de cortes cerebrales.
- Ensayos de ubiquitinación. Además, los ensayos para determinar la presencia y localización de conjugados de ubiquitina-enzima lisosómica se pueden usar para evaluar los efectos de ganancia tóxica de función de las mutaciones y en respuesta al tratamiento con chaperonas. Los estudios morfológicos que usan inmunohistoquímica o inmunofluorescencia para localizar estos conjugados son un método sensible de detección. Véase el Ejemplo 3, *más abajo*. Como se indica anteriormente, la presencia de niveles bajos de proteínas ubiquitinadas, en comparación con células no estresadas, puede ser indicativa de inhibición de la función proteasómica.
- Como otro ejemplo, se puede usar un procedimiento denominado AlphaScreen™ (Perkin-Elmer) para detectar proteínas ubiquitinadas. En este modelo, el resto GST de una proteína de fusión GST-Ubch5a se ubiquitina usando biotina-ubiquitina (bio-Ub). Tras la activación de ubiquitina por E1, en presencia de ATP, bio-Ub se transfiere a Ubch5a. En esta reacción, Ubch5a actúa como el portador para transferir la bio-Ub a su resto GST etiquetado. La proteína que se biotinila y se ubiquitina se captura entonces mediante un aceptor anti-GST y estreptavidina. Las perlas donantes dan como resultado la generación de señal. No se genera señal en ausencia de ubiquitinación.
- Además, se pueden usar ensayos de altos rendimientos para medir las actividades de las diversas E3 ubiquitina ligasas y enzimas de conjugación E2, para determinar el incremento o disminución en la ubiquitinación de la proteína (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD).
- Respuesta UPR. El estrés del ER se puede evaluar determinando los niveles de expresión de genes y las proteínas codificadas por los genes implicados en la UPR. Tales genes y proteínas incluyen los mencionados anteriormente Grp78/BiP, Grp94, y orp150, que están aumentados en las etapas tempranas de la UPR. Otras proteínas implicadas en la respuesta al estrés del ER incluyen IRE1, PERK, ATF6, y XBP1, que están aumentadas en células sometidas a estrés continuo del ER. Además, el estrés celular prolongado conduce a apoptosis, y de este modo al aumento de jun cinasa (JNK) y caspasas 3, 9 y 12.
- La presente invención contempla la comparación de niveles de expresión de los genes y/o proteínas indicadores mencionados anteriormente entre pacientes con acumulación o agregación tóxica de proteína o sustrato e individuos sanos.
- En otra realización, la presente invención también contempla evaluar el efecto de chaperonas farmacológicas específicas sobre células estresadas, para identificar compuestos que alivian el estrés celular causado por agregados de ganancia tóxica de función. Como controles positivos, se pueden usar inductores de estrés del ER, tales como tunicamicina, ditiotretol (DTT), lacatcistina, y peróxido, para provocar la acumulación de proteínas no

plegadas en el ER. Tunicamicina inhibe la glicosilación enlazada a N, y DTT evita la formación de enlaces de disulfuro. Lacatcictina es un inhibidor del proteasoma. Los aliviadores del estrés, tales como ciclohexamida, un inhibidor de la síntesis de proteínas, se pueden usar como controles positivos cuando se evalúan compuestos de chaperona en células estresadas.

Los ensayos para determinar niveles de expresión incluyen expresión génica vía análisis de micromatrices. Esto se puede lograr usando, *por ejemplo*, el conjunto de matriz génica Affymetrix U133 (genoma humano) que contiene tales genes (Affymetrix, Santa Clara, CA). Además, esta técnica se ha usado por otros. Por ejemplo, el análisis de micromatrices de ARN recogido de múltiples puntos de tiempo tras el tratamiento con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) se combinó con recogida de datos y técnicas de agrupamiento, para identificar distintos subgrupos funcionales de genes del estrés celular (Holtz et al., *Antioxidants & Redox Signaling*. 2005; 7: 639-648). Se ha demostrado que 6-OHDA es un mimético parkinsoniano que provoca cambios transcripcionales asociados con estrés celular y la UPR.

Apoptosis. Además, como se señala anteriormente, el estrés del ER prolongado y persistente que no se elimina mediante la UPR puede conducir también a muerte celular programada en células neuronales, *por ejemplo* apoptosis. Para la evaluación *in vitro*, se pueden transfectar estirpes de células neuronales tales como hNT2 (nº de acceso ATCC#CRL-10742), Hs68 (# CRL-1636), HCN-1A (# CRL-10442), SK-N-FI (# CRL-2142), SK-N-DZ (# CRL-2149), SK-N-SH (# HTB-11), o NT2/D1 (# CRL-1973), o células madre embrionarias o células madre neurales que se han diferenciado *in vitro* en neuronas (véanse, por ejemplo, documento US 2003/0013192 de Laeng et al.; y Yan et al., *Stem Cells*. 2005; 23:781-90), con Gba mutante y se pueden evaluar para determinar la apoptosis.

De este modo, el número de células apoptóticas se puede medir usando análogos de sustratos fluorescentes para, por ejemplo, caspasa 3, un indicador prematuro de la apoptosis. La apoptosis se puede detectar usando numerosos métodos en la técnica, incluyendo clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), y/o usando un lector de placas fluorescente (por ejemplo, 96 pocillos para alto rendimiento). Para éste último, se puede determinar el porcentaje de células positivas para apoptosis o muerte celular, o se puede medir la intensidad de la fluorescencia con respecto a la concentración de la proteína.

Morfología de células/orgánulos. Las anomalías morfológicas en neuronas pueden resultar de la acumulación de proteína mutante, y se pueden evaluar usando análisis morfométrico. Por ejemplo, los cambios en la morfología de las neuronas en neuronas transfectadas con tau-GFP incluyeron asimetría, una reducción en el número de axones en las proyecciones anterior y posterior, formación anormal de manojos de axones, formación de ampollas de axones, y arborizaciones terminales reducidas. Otras alteraciones en la morfología celular incluyen agregación, tamaño celular (área celular o densidad celular), polimegatismo (variación del tamaño celular tal como coeficiente de variación de área celular media), pleomorfismo (variación de la forma celular tal como porcentaje de células hexagonales o coeficiente de variación de la forma celular), perímetro celular, longitud lateral celular promedio, forma celular, etc. La morfología se puede evaluar usando análisis morfométrico cuantitativo según los métodos descritos en Ventimiglia et al., *J Neurosci Methods*. 1995; 57:63-6; y Wu et al., *Cerebral Cortex*. 2004; 14: 543-54 (análisis de alto rendimiento); y usando software de análisis de imágenes, tal como el software Image Pro-Plus.

El estrés de las células/ER también se puede detectar evaluando la morfología de los orgánulos. Por ejemplo, la UPR en células de *S. cerevisiae* que expresan CY028 se manifestó como una morfología aberrante del retículo endoplásmico (ER) y como proliferación membránica extensa en comparación con la morfología del ER y con la proliferación membránica de células de *S. cerevisiae* productoras de CY000 de tipo salvaje (Sagt et al., *Applied and Environmental Microbiology*. 2002; 68: 2155-2160).

Además, indicadores morfológicos específicos pueden estar asociados con enfermedades de agregación individuales. Por ejemplo, en la enfermedad de Gaucher, los lípidos se acumulan en los lisosomas de macrófagos, dando como resultado una morfología distinta, indicativa de un macrófago activado.

Almacenamientos de calcio en el ER. El estrés del ER también se puede detectar midiendo los niveles de calcio en la luz del ER y en el citosol, y también determinando el nivel de proteínas reguladoras del calcio tales como SERCA2b, una calcio-ATPasa ubicua que regula almacenamientos de calcio intracelular. Como control, el estrés del ER se puede inducir mediante agotamiento del calcio, usando, *por ejemplo*, tapsigargina.

Función proteasómica. La función proteasómica, una respuesta de estrés celular a la acumulación de proteínas o sustratos, se puede medir según el método de Glas et al. (*Nature*. 1998; 392: 618-622). La evaluación de la función del proteasoma 26S en animales vivos mediante formación de imágenes se ha logrado usando el informador de ubiquitina-luciferasa para formación de imágenes mediante bioluminiscencia (Luker et al., *Nature Medicine*. 2003. 9, 969 - 973). El aislamiento del proteasoma y los ensayos se describen en Craiu et al., *JBC*. Los kits para el aislamiento del proteasoma están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Calbiochem (nº de Catálogo 539176). Este kit se puede usar para aislar subunidades proteasómicas a partir de extractos celulares, para estudiar su función e interacciones con otras proteínas. Las subunidades proteasómicas se pueden identificar cargando directamente las perlas en un gel de SDS-PAGE y llevando a cabo la inmunotransferencia con anticuerpos específicos de la subunidad. Como alternativa, el proteasoma unido a las perlas se puede usar en ensayos proteolíticos usando sustratos proteasómicos.

Ensayos de crecimiento celular y tráfico por pH. El tráfico de proteínas en células se produce a lo largo de gradientes del pH (es decir, pH del ER de alrededor de 7,0, pH del aparato de Golgi de alrededor de 6,2-7,0, pH de la red trans-Golgi de alrededor de 6,0, pH de endosomas tempranos y tardíos de alrededor de 6,5, pH de lisosomas de alrededor de 4,5). El tráfico, las morfologías de lisosomas/endosomas y los pHs luminales también están perturbados en algunas enfermedades de almacenamiento lisosómico (Ivleva et al., Biomed Sci. 1991; 2: 398-402; Futerman y van Meer, Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5:554-65), y se ha demostrado que un pH elevado en el endosoma promueve una inversión del tráfico vesicular desde los endosomas hacia el aparato de Golgi (van Wert et al., 1995, *más arriba*).

La tasa de crecimiento de células (por ejemplo, células de pacientes no tratados, de tipo salvaje, y células de pacientes tratadas con chaperonas) expuestas a un intervalo de pHs se pueden medir y comparar usando un lector de placas fluorescente. Los ensayos de apoptosis y muerte celular (descritos anteriormente) también se pueden usar para determinar la sensibilidad al pH en la viabilidad celular.

Como alternativa, el pH lisosómico y los efectos del pH sobre el tráfico se pueden evaluar usando microscopio confocal. Las sondas fluorescentes sensibles al pH que son endocitadas por las células se pueden usar para medir intervalos de pH en los lisosomas y endosomas (es decir, la fluoresceína es roja a pH 5,0 y azul a verde a pH 5,5 a 6,5). La morfología de los lisosomas y el pH se pueden comparar con células de pacientes de tipo salvaje y tratadas con chaperonas y no tratadas. Este ensayo se puede llevar a cabo en paralelo con el ensayo de lector de placas, para determinar la sensibilidad al pH. Además, el tráfico de las enzimas hacia el lisosoma se puede evaluar en células a diferentes pHs usando experimentos de marcaje dual, descritos anteriormente.

Las velocidades de endocitosis para células (células de pacientes de tipo salvaje, tratadas con chaperonas, y no tratadas) expuestas a diversos pHs se pueden medir usando puntos cuánticos o azul de dextrano. Además, los ensayos que describen el uso de análogos lipídicos fluorescentes (BODIPY-LacCer, gangliósidos GM1, etc.) se describen en Pagano, Phil Trans R Soc Lond B. 2003; 358-885-91.

Actividad enzimática. Además de evaluar el efecto de chaperonas sobre la agregación y/o sobre el tráfico, usando los ensayos de localización proteica descritos anteriormente, también se pueden usar ensayos bioquímicos para determinar si las proteínas son funcionales, y para evaluar los efectos de restaurar la función, una vez que han sido tratadas con chaperonas fuera del ER, por ejemplo al lisosoma. Los ensayos de actividad se diseñan generalmente para medir la actividad de la proteína diana en presencia o ausencia de un agente de ensayo. Tales ensayos dependerán de la proteína específica. Por ejemplo, cuando la proteína es una enzima, los ensayos de actividad enzimática intracelular que usan sustratos habituales en la técnica, se pueden usar para evaluar la actividad enzimática.

La evaluación *ex vivo* e *in vivo* de la actividad catalítica se puede llevar a cabo usando animales normales y modelos de animales de estados de enfermedad tales como los descritos *más abajo*.

Métodos de diagnóstico

La presente invención proporciona un método para diagnosticar un factor de riesgo, afección o trastorno neurológico asociado con una mutación en una enzima lisosómica. Puesto que efectos neurológicos que pueden aparecer en pacientes con LDSs pueden estar presentes en otros trastornos neurológicos, las personas con mutaciones en las enzimas lisosómicas, pero que no han sido diagnosticadas con un LSD, pueden no ser tratadas de forma eficaz. Un ejemplo son los individuos con mutaciones heterocigotas en el gen de Gba, que están en riesgo de desarrollar o que han desarrollado parkinsonismo o enfermedad de Parkinson. Otros síntomas neurológicos ejemplares que pueden estar asociados con una enzima lisosómica mutante incluyen neurodegeneración, regresión neurológica, ataques, ceguera, trastornos del movimiento ocular, espasticidad, demencia; retrasos en el desarrollo; síntomas neuromusculares, neuropatía periférica (dolor neuropático), acroparestesia, alteraciones en la memoria a largo plazo, sucesos cerebrovasculares tales como sucesos cerebrovasculares (apoplejía, ataque isquémico transitorio), y capacidad alterada para tragar.

Los métodos de identificación de una mutación o mutaciones en enzimas lisosómicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen comparar la actividad enzimática de una enzima lisosómica procedente de una muestra biológica de un individuo que muestra síntomas neurológicos, o un individuo que está en riesgo de desarrollar síntomas neurológicos (tal como un portador para un LSD, o un familiar de un individuo que tiene un LSD. Los métodos para identificar mutaciones a un nivel molecular, *es decir*, alteraciones nucleotídicas o de aminoácidos, también son bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como amplificación mediante PCR seguida de secuenciación, polimorfismo de conformación de una sola hebra (SSCP), o usando micromatrices de ADN para muestras grandes (Tennis et al., Cancer Epidemiology Biomarkers & Preventio. 2006; 15: 80-85).

Formulación, dosificación y administración de chaperonas farmacológicas específicas

La presente invención proporciona la chaperona farmacológica específica a administrar en una forma de dosificación que permite la administración sistémica, puesto que los compuestos necesitan atravesar la barrera hematoencefálica para ejercer efectos sobre células neuronales. En una realización, la chaperona farmacológica específica se administra como monoterapia, preferiblemente en una forma de dosificación oral (descrita posteriormente más abajo), aunque se contemplan otras formas de dosificación. En una realización, se contempla que el régimen de

dosificación debería ser aquel que proporcione un nivel pico periódico de compuesto en el plasma del individuo que se esté tratando. Otra realización puede requerir niveles constantes de estado estacionario del compuesto en plasma. Esto se puede obtener ya sea mediante la administración diaria en dosis divididas, o mediante formulaciones de liberación controlada, o mediante administración menos frecuente de formas de dosificación de liberación sostenida. Las formulaciones, dosificaciones y vías de administración para la chaperona farmacológica específica se detallan a continuación.

Formulaciones

La chaperona farmacológica específica se puede administrar en una forma adecuada para cualquier vía de administración, incluyendo, *por ejemplo*, oralmente en forma de comprimidos o cápsulas o líquido, o en disolución acuosa estéril para inyección. Cuando la chaperona farmacológica específica se formula para administración oral, los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (*por ejemplo*, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos se pueden revestir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (*por ejemplo*, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o de propilo, o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral se pueden formular adecuadamente para dar una liberación controlada o sostenida de la chaperona farmacológica específica.

Las formulaciones farmacéuticas de la chaperona farmacológica específica adecuadas para uso parenteral/inyectable incluyen generalmente disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua), o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril, y debe fluir hasta el grado en que exista una fácil capacidad para introducirla en una jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol, y similares), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede producir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, será razonable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando la chaperona farmacológica específica en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enunciados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración o terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y la técnica de liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional procedente de la disolución filtrada de forma estéril previamente del mismo.

La formulación puede contener un excipiente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en la formulación son tampones tales como tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato, y tampón de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tales como seroalbúmina, colágeno, y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro de sodio; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol, y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Los sistemas tamponantes para uso con las formulaciones incluyen tampones de citrato; de acetato; de bicarbonato; y de fosfato. El tampón de fosfato es una realización preferida.

La formulación también puede contener un detergente no iónico. Los detergentes no iónicos preferidos incluyen polisorbato 20, Polisorbato 80, Triton X-100, Triton X-114, Nonidet P-40, octil α -glucósido, octil β -glucósido, Brij 35, Pluronic, y Tween 20.

Administración

La vía de administración de la chaperona farmacológica específica puede ser oral (preferiblemente) o parenteral, incluyendo intravenosa, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bucal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradérmica, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracistérica, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosal, transdérmica, o vía inhalación.

La administración de las formulaciones parenterales descritas anteriormente de la chaperona farmacológica específica puede ser mediante inyecciones periódicas de un bolo de la preparación, o se puede administrar mediante administración intravenosa o intraperitoneal a partir de un depósito que es externo (por ejemplo, una bolsa i.v.) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable). Véanse, *por ejemplo*, las patentes U.S. n^{os} 4.407.957 y 5.798.113. Los métodos de suministro intrapulmonar y los aparatos se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 5.654.007, 5.780.014, y 5.814.607, cada una incorporada aquí como referencia. Otros sistemas de suministro parenteral útiles incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, suministro mediante bomba, suministro celular encapsulado, suministro liposómico, inyección a través de aguja, inyección sin aguja, nebulizador, aerosol, electroporación, y parche transdérmico. Los dispositivos inyectorios sin aguja se describen en las patentes U.S. n^{os} 5.879.327; 5.520.639; 5.846.233 y 5.704.911. Cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente se puede administrar usando estos métodos.

Las inyecciones subcutáneas tienen la ventaja de permitir la autoadministración, mientras que también dan como resultado una semivida plasmática prolongada en comparación con la administración intravenosa. Además, con las formulaciones de la presente invención como se discuten aquí, se pueden usar una variedad de dispositivos diseñados para la conveniencia del paciente, tales como bolígrafos de inyecciones recargables y dispositivos de inyección sin agujas.

Dosificación

La cantidad de chaperona farmacológica específica eficaz para rescatar la Gba mutante endógena se puede determinar caso por caso por aquellos expertos en la técnica. La farmacocinética y la farmacodinámica, tales como la semivida ($t_{1/2}$), la concentración plasmática pico (C_{max}), el tiempo para la concentración plasmática pico (t_{max}), la exposición como se mide mediante el área bajo la curva (AUC), y la distribución tisular tanto para la proteína de sustitución como para la chaperona farmacológica específica, así como los datos para la unión de chaperona farmacológica específica/Gba (constantes de afinidad, constantes de asociación y disociación, y valencia), se pueden obtener usando métodos normales conocidos en la técnica para determinar cantidades compatibles requeridas para estabilizar la proteína de sustitución, sin inhibir su actividad, y de este modo conferir un efecto terapéutico.

Los datos obtenidos del ensayo de cultivo celular o de estudios con animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación terapéutica para uso en seres humanos y animales no humanos. La dosificación de compuestos usados en métodos terapéuticos de la presente invención se encuentra preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la concentración de ED_{50} (eficaz para 50% de la población ensayada) pero con poca o ninguna toxicidad. La dosis particular usada en cualquier tratamiento puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de factores tales como la forma de dosificación particular empleada, la vía de administración utilizada, las condiciones del individuo (por ejemplo, paciente), etc.

Una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular y se puede formular en modelos de animales para lograr un intervalo de concentración circulante que incluya la IC_{50} . La concentración de IC_{50} de un compuesto es la concentración que logra la inhibición semimáxima de los síntomas (por ejemplo, como se determina a partir de los ensayos de cultivo celular). Las dosis apropiadas para uso en un individuo particular, por ejemplo en pacientes humanos, se puede determinar entonces de forma más exacta usando tal información.

Las medidas de compuestos en plasma se pueden medir de forma habitual en un individuo, tal como un paciente, mediante técnicas tales como cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) o cromatografía de gases.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de la composición se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar, por ejemplo en ensayos de cultivo celular, o usando animales experimentales para determinar la LD_{50} y la ED_{50} . Los parámetros LD_{50} y ED_{50} son bien conocidos en la técnica, y se refieren a las dosis de un compuesto que es letal para el 50% de una población y terapéuticamente eficaz en el 50% de una población, respectivamente. La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos se denomina como índice terapéutico, y se puede expresar como la relación: LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren chaperonas farmacológicas específicas que muestran grandes índices terapéuticos.

Las concentraciones óptimas de la chaperona farmacológica específica se determinan según la cantidad requerida para estabilizar e inducir una conformación apropiada de la proteína recombinante (*por ejemplo* Gba, *in vivo*, en tejido o circulación, sin prevenir persistentemente su actividad, biodisponibilidad de la chaperona farmacológica específica en tejido o en circulación, y metabolismo de la chaperona farmacológica específica en tejido o en circulación. Por ejemplo, cuando la chaperona farmacológica específica es un inhibidor enzimático, la concentración del inhibidor se puede determinar calculando el valor de IC_{50} de la chaperona específica para la enzima. Teniendo

en consideración la biodisponibilidad y el metabolismo del compuesto, entonces se pueden evaluar las concentraciones alrededor del valor de IC_{50} o ligeramente por encima del valor de IC_{50} basándose en los efectos sobre la actividad enzimática, por ejemplo la cantidad de inhibidor necesaria para incrementar la cantidad de actividad enzimática o prolongar la actividad enzimática de la enzima administrada. Como ejemplo, el valor de IC_{50} del compuesto isofagomina para la enzima Gba es 0,04 μM , indicando que es un inhibidor potente.

Terapia farmacéutica de combinación

La chaperona farmacológica específica se puede usar para tratar pacientes con trastornos del SNC que están asociados con mutaciones en enzimas lisosómicas, en combinación con otros fármacos que también se usan para tratar el trastorno del SNC.

Por ejemplo, para pacientes que tienen enfermedad de Parkinson, tales como agonistas del receptor de dopamina, anticolinérgicos, inhibidores de COMT, inhibidores de monoamina oxidasa B. Los agentes ejemplares incluyen, pero no se limitan a, levodopa (Sinemet®; Merck), Parlodel® (mesilato de bromocriptina; Novartis); Permax® (mesilato de pergolida; Eli Lilly); Requip® (ropinirol HCl), Mirapex® (dihidrocloruro de pramipexol); Cogetin® (mesilato de benzotropina); Artane® (trihexafenidilo HCl; American Cyanamid); Symmetrel® (hidrocloruro de amantadina; Du Pont Merck); y Eldepryl® (Somerset Pharmaceuticals).

Terapia de combinación con terapia génica

Aunque todavía no se han aprobado para tratamiento terapéutico en los Estados Unidos de América, las terapias génicas (tanto transferencia *ex vivo* como directa) para numerosos trastornos genéticos están bajo investigación. La presente invención también contempla el uso de la chaperona farmacológica específica en combinación con terapia génica para sustituir el gen de Gba defectuoso en la enfermedad neurológica. Tal combinación potenciará la eficacia de la terapia génica al incrementar el nivel de expresión de la Gba terapéutica *in vivo*, puesto que, además de potenciar el plegamiento y el procesamiento de enzimas mutadas, se ha demostrado que las chaperonas farmacológicas específicas potencian el plegamiento y procesamiento de las contrapartes de tipo salvaje o conformacionalmente estables (véase, *por ejemplo*, documento U.S. 6.274.597 de Fan et al., Ejemplo 3).

La patente U.S. 6.309.634 de Bankiewicz describe un enfoque de terapia génica para tratar enfermedad de Parkinson. Según el método, los viriones del virus adenoasociado recombinante (rAAV) se producen *in vitro* y comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica aminoácidos aromáticos descarboxilasa (AADC). Otro grupo insertó recientemente el gen para el factor neurotrófico derivado de la estirpe de gliocitos (GDNF), también vía vectores víricos adenoasociados recombinantes, en un modelo de mono de enfermedad de Parkinson (Eslamboli et al., J Neurosci. 2005; 25(4):769-77).

Cualquiera de los métodos para terapia génica que existen o se hagan disponibles en la técnica se pueden usar para suministrar genes terapéuticos. Más abajo se describen métodos ejemplares. Para repasos generales de los métodos de terapia génica, véanse Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 1993, 12:488-505; Wu y Wu, Biotherapy 1991, 3:87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1993, 32:573-596; Mulligan, Science. 1993, 260:926-932; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 1993, 62:191-217; May, TIBTECH 1993, 11:155-215. Los métodos conocidos habitualmente en la técnica para la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel et al., (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli et al., (eds.), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY; y Colosimo et al., Biotechniques 2000;29(2):314-8, 320-2, 324.

El gen a administrar para los métodos de la presente invención se puede aislar y purificar usando técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante normales dentro de la pericia de la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican la proteína diana se pueden aislar usando expresión de ADN recombinante como se describe en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B.É Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984). El ácido nucleico que codifica la proteína puede ser de longitud completa o truncado, en tanto que el gen codifique una proteína biológicamente activa.

El gen de Gba identificado y aislado se puede insertar entonces en un vector de clonación apropiado. Los vectores adecuados para terapia génica incluyen virus, bacteriófagos, cósmidos, plásmidos, vectores fúngicos y otros vehículos de recombinación usados típicamente en la técnica, que se han descrito para la expresión en una variedad de hospedantes eucariotas y procariotas, y se pueden usar para terapia génica así como para expresión simple de proteínas.

En una realización específica, el vector es un vector vírico. Los vectores víricos, especialmente vectores adenovíricos, se pueden complejar con anfífilos catiónicos, tales como un lípido catiónico, poli-L-lisina (PLL), y

dietilaminoetildextrano (DELAE-dextrano), que proporcionan una mayor eficiencia de infección vírica de las células diana (véase, *por ejemplo* el documento PCT/US97/21496, presentado el 20 de noviembre de 1997). Los vectores víricos para uso en la presente invención incluyen vectores derivados de virus de la vacuna, virus del herpes, AAV y retrovirus. En particular, los virus del herpes, especialmente virus del herpes simple (HSV), tales como los descritos en la patente U.S. nº 5.672.344, son particularmente útiles para el suministro de un transgén a una célula neuronal. También son útiles los vectores de AAV, tales como los descritos en las patentes U.S. nºs 5.139.941, 5.252.479 y 5.753.500 y en la publicación PCT WO 97/09441, puesto que estos vectores se integran en los cromosomas del hospedante, con una necesidad mínima de repetir la administración del vector. Para un repaso de vectores víricos en terapia génica, véanse McConnell et al., Hum Gene Ther. 2004; 15(11):1022-33; Mccarty et al., Annu Rev Genet. 2004; 38:819-45; Mah et al., Clin. Pharmacokinet. 2002; 41(12):901-11; Scott et al., Neuromuscul. Disord. 2002; 12 Supl. 1:S23-9. Además, véase la patente U.S. nº 5.670.488.

Las secuencias codificantes del gen a suministrar están operablemente enlazadas a secuencias de control de la expresión, por ejemplo un promotor que dirige la expresión del gen. Como se usa aquí, la frase "operablemente enlazadas" se refiere a la relación funcional de un polipéptido/gen con secuencias reguladoras y efectoras de nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcionales y traduccionales, y otras secuencias señal. Por ejemplo, el enlace operativo de un ácido nucleico a un promotor se refiere a la relación física y funcional entre el polinucleótido y el promotor, de manera que la transcripción del ADN se inicia desde el promotor mediante una ARN polimerasa que reconoce específicamente y se une al promotor, y en el que el promotor dirige la transcripción del ARN a partir del polinucleótido.

En una realización específica, se usa un vector en el que las secuencias codificantes y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando así la expresión del constructo a partir de una molécula de ácido nucleico que se ha integrado en el genoma (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989, 86:8932-8935; Zijlstra et al., Nature. 1989, 342:435-438; patente U.S. nº 6.244.113 de Zarling et al.; y patente U.S. nº 6.200.812 de Pati et al.).

Suministro génico

El suministro del vector a un paciente puede ser directo, en cuyo caso el paciente se expone directamente al vector o a un complejo de suministro, o indirecto, en cuyo caso se transforman primeramente las células con el vector *in vitro*, y después se transplantan al paciente. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* y *ex vivo*.

Transferencia directa. En una realización específica, el vector se administra directamente *in vivo*, en el que entra en la célula del organismo y media la expresión del gen. Esto se puede lograr mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica y discutidos anteriormente, *por ejemplo* construyéndolo como parte de un vector de expresión apropiado y administrándolo de manera que se haga intracelular, por ejemplo mediante infección usando un vector retrovírico defectuoso o atenuado u otro vector vírico (véase la patente U.S. nº 4.980.286), o mediante inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola génica; Biolistic, Dupont); o revistiendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulamiento en biopolímeros (por ejemplo, poli-β-1-64-N-acetilglucosamina polisacárido; véase la patente U.S. nº 5.635.493), encapsulamiento en liposomas, micropartículas o microcápsulas; administrándolo en enlace con un péptido u otro ligando que se sabe que entra en el núcleo; o administrándolo en enlace a un ligando sujeto a endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 1987, 262:4429-4432), etc. En otra realización, se puede formar un complejo de ácido nucleico-ligando, en el que el ligando comprende un péptido vírico fusogénico para destruir los endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosómica, o péptidos 12-meros catiónicos, por ejemplo derivados de antenapedia, que se pueden usar para transferir ADN terapéutico a células (Mi et al., Mol. Therapy. 2000, 2:339-47). En todavía otra realización, el ácido nucleico se puede direccionar específicamente *in vivo* para la captación y expresión específicas de la célula, al seleccionar como diana un receptor específico (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nºs WO 92/06180, WO 92/22635, WO 92/20316 y WO 93/14188). Recientemente, se ha usado una técnica, denominada magnetofección, para suministrar vectores a mamíferos. Esta técnica asocia los vectores con nanopartículas superparamagnéticas para el suministro bajo la influencia de campos magnéticos. Esta aplicación reduce el tiempo de suministro y potencia la eficacia del vector (Scherer et al., Gene Therapy. 2002; 9:102-9). En la descripción de los vectores, más abajo, se contemplan metodologías de direccionamiento y suministro adicionales.

En una realización específica, el ácido nucleico se puede administrar usando un portador lipídico. Los portadores lipídicos pueden estar asociados con ácidos nucleicos desnudos (*por ejemplo*, ADN plasmídico) para facilitar el paso a través de membranas celulares. Para este fin, se pueden usar lípidos catiónicos, aniónicos o neutros. Sin embargo, se prefieren los lípidos catiónicos, debido a que se ha demostrado que se asocian mejor con el ADN que, generalmente, tiene una carga negativa. También se ha demostrado que los lípidos catiónicos median el suministro intracelular de ADN plasmídico (Felgner y Ringold, Nature. 1989; 337:387). Se ha demostrado que la inyección intravenosa de complejos de lípidos catiónicos-plásmidos en ratones da como resultado la expresión del ADN en el pulmón (Brigham et al., Am. J. Med. Sci. 1989; 298:278). Véanse también, Osaka et al., J. Pharm. Sci. 1996; 85(6):612-618; San et al., Human Gene Therapy. 1993; 4:781-788; Senior et al., Biochemica et Biophysica Acta. 1991; 1070:173-179; Kabanov y Kabanov, Bioconjugate Chem. 1995; 6:7-20; Liu et al., Pharmaceut. Res. 1996; 13;

Remy et al., Bioconjugate Chem. 1994; 5:647-654; Behr, J-P., Bioconjugate Chem. 1994; 5:382-389; Wyman et al., Biochem. 1997; 36:3008-3017; patente U.S. nº 5.939.401 de Marshall et al; y patente U.S. nº 6.331.524 de Scheule et al.

5 Los lípidos catiónicos representativos incluyen aquellos descritos, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.283.185, y por ejemplo la patente U.S. nº 5.767.099, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia. En una realización preferida, el lípido catiónico es N4-espermina colesteryl carbamato (GL-67), descrito en la patente U.S. nº 5.767.099. Lípidos preferidos adicionales incluyen N4-espermidina colesteryl carbamato (GL-53) y 1-(N4-espermina)-2,3-dilaurylglicerol carbamato (GL-89).

10 Preferiblemente, para la administración *in vivo* de vectores víricos, se emplea un tratamiento inmunosupresor apropiado conjuntamente con el vector vírico, *por ejemplo* vector adenovírico, para evitar la inmunodesactivación del vector vírico y células transfectadas. Por ejemplo, se pueden administrar citocinas inmunosupresoras, tales como interleucina-12 (IL-12), interferón- γ (IFN- γ), o anticuerpo anti-CD4, para bloquear las respuestas inmunitarias humoral o celular a los vectores víricos. A ese respecto, es ventajoso emplear un vector vírico que se haya manipulado para expresar un número mínimo de antígenos.

15 Transferencia indirecta. Las células somáticas se pueden modificar mediante ingeniería *ex vivo* con un constructo que codifica una proteína de tipo salvaje usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente, y se pueden reimplantar en un individuo. Este método se describe generalmente en el documento WO 93/09222 de Selden et al. Además, esta tecnología se usa en la tecnología patentada ImPACT de Cell Based Delivery, descrita en Payumo et al., Clin. Orthopaed. and Related Res. 2002; 403S: S228-S242. En tal sistema de terapia génica, las células
20 somáticas (*por ejemplo*, fibroblastos, hepatocitos, o células endoteliales) se retiran del paciente, se cultivan *in vitro*, se transfectan con el gen o genes de interés terapéutico, se caracterizan, y se reintroducen en el paciente. Se pueden usar tanto células primarias (derivadas de un individuo o tejido y manipuladas mediante ingeniería antes de hacerlas pasar) como células secundarias (que se hacen pasar *in vitro* antes de la introducción *in vivo*), así como estirpes celulares inmortalizadas conocidas en la técnica. Las células somáticas útiles para los métodos de la
25 presente invención incluyen, pero no se limitan a, células somáticas, tales como fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales, células endoteliales, gliocitos, células neurales, elementos formados de la sangre, células del músculo, otras células somáticas que se pueden cultivar, y precursores de células somáticas. En una realización preferida, las células son fibroblastos o células madre mesenquimatosas.

30 Para transfectar células primarias o secundarias en las que se va a producir el producto codificado, se usan constructos de ácidos nucleicos, que incluyen el gen exógeno y, opcionalmente, ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable, junto con secuencias adicionales necesarias para la expresión del gen exógeno en células primarias o secundarias del receptor. Tales constructos incluyen, pero no se limitan a, vectores infecciosos, tales como vectores retrovíricos, del herpes, adenovíricos, asociados a adenovirus, de las paperas y del virus de la polio, que se pueden usar para este fin.

35 Las células madre mesenquimatosas (MSCs) son células madre no productoras de sangre producidas en la médula ósea. Las MSCs pueden obtenerse para diferenciarse y proliferar en tejidos no sanguíneos especializados. Las células madre transfectadas con los retrovirus son buenas candidatas para la terapia, debido a su capacidad para la autorrenovación. Esta capacidad excluye la administración repetitiva de la terapia génica. Otra ventaja es que, si las células madre inyectadas alcanzan el órgano diana y después se diferencian, pueden sustituir a las células dañadas
40 o malformadas en el órgano.

Como un ejemplo, para la enfermedad de Gaucher, se están poniendo en marcha ensayos para la transducción de células madre somáticas de un individuo con un retrovirus que codifica el gen de Gba, seguido de la devolución de las células madre corregidas al paciente, en el que toman residencia en la médula ósea y producen células que expresan Gba, tales como macrófagos.

45 Suministro de chaperona. Cuando se administra en combinación con terapia génica que codifica un gen terapéutico, la chaperona farmacológica específica se puede administrar según los métodos y formas de dosificación descritos anteriormente.

Combinación con inhibidores del sustrato

50 Además, también se contempla la combinación de chaperonas de pequeñas moléculas de esta invención con otros inhibidores de sustrato de pequeñas moléculas, como se describe en los antecedentes. Puesto que incluso una ligera reducción en la actividad de enzimas lisosómicas puede conducir a una acumulación elevada de lípidos, lo que, a su vez, puede alterar el balance de fosfolípidos de la célula o iniciar sucesos de señalización que dan como resultado apoptosis. Los inhibidores del sustrato ejemplares incluyen NB-DNJ (Miglustat) para la inhibición de glucosiltransferasas específicas de ceramida (reducción de sustratos glucolipídicos) (Kasperzyk et al., Journal of
55 Neurochemistry 2004. 89: 645-653).

EJEMPLOS

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los ejemplos, presentados más abajo. El uso de

tales ejemplos es solamente ilustrativo y de ningún modo limita el alcance y significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Igualmente, la invención no está limitada a ninguna realización preferida particular descrita aquí. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención serán manifiestas para aquellos expertos en la técnica al leer esta memoria descriptiva. La invención está limitada por lo tanto solamente por los términos de las reivindicaciones anejas junto con el alcance completo de equivalentes a los que nombran las reivindicaciones.

EJEMPLO 1: Determinación de mayor actividad de Gba en los cerebros de ratones transgénicos L444P tratados con chaperonas farmacológicas específicas

L444P es una mutación asociada con la enfermedad de Gaucher de los Tipos 2 y 3. Los ratones transgénicos L444P (homocigotos para Gba mutada L444P humana en un antecedente nulo de glucosilceramida sintasa) muestran una deficiencia en la actividad de Gba en el cerebro. Sin embargo, debido a la interrupción en el gen de glucosilceramida sintasa, estos ratones no muestran acumulación de GluCer en, por ejemplo, macrófagos. La interrupción de glucosilceramida sintasa concomitante es necesaria, puesto que los ratones transgénicos L444P obtenidos previamente murieron a los 3 días de nacer debido a la función alterada de la barrera de permeabilidad en la epidermis.

En este experimento, los ratones transgénicos L444P se trataron con isofagomina o C-bencil-isofagomina, y los marcadores sustitutos se midieron a 1, 3, 6 y 12 meses para determinar la eficacia de las chaperonas. Además, los ratones en un período de "lavado" de 2 semanas sin tratamiento con chaperona después de 4 semanas de tratamiento también se evaluaron para buscar la inversión de los marcadores sustitutos nuevamente a los niveles observados en los controles no tratados.

Métodos

Tratamiento con chaperona farmacológica específica. A los ratones se les administró isofagomina o C-bencil-isofagomina en el agua de beber, *ad libitum*. La dosis diaria estimada basada en el volumen de agua consumido es alrededor de 10 mg/kg/día.

Ensayos de actividad de Gba en el cerebro. Al final de los 1, 3, 6 y 12 meses, los ratones se sacrificaron y se evaluaron en busca de la potenciación de la actividad de la enzima Gba en el cerebro. El tejido cerebral se recoge de forma inmediata (la sangre se elimina por lavado con PBS), o se descongela a partir de un lote congelado. El tejido es tejido picado, y se homogeneiza en hielo en 200-500 μ l de tampón Mcllvaina (MI) (0,25% de taurocolato de sodio, 0,1% de Triton x-100 en tampón de 0,1M de citrato y 0,2M de fosfato, pH 5,2), y se centrifugó a 10.000 x g. El sobrenadante se recoge y se puede congelar en esta etapa.

Se añaden alrededor de 1-10 μ l de sobrenadante procedente de los homogenados de tejido cerebral a una placa de 96 pocillos clara para el ensayo de proteína Micro BCA (Pierce, n° de catálogo 23235), para cuantificar la cantidad de proteína total según el protocolo del fabricante. Como control negativo, se añaden otros 10 μ l a una placa negra, mezclado con 10 μ l de 2,5 mM de CBE (2,7 mg de epóxido de conduritól B en 6,7 ml de tampón), un inhibidor de la actividad de Gba, y se dejó a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos. Entonces se añaden 50 μ l de 3 mM de 4-metil umbeliferil beta-D-glucósido (4-MU-beta-D-glucósido; obtenido recientemente, y el polvo se disuelve en 0,2 ml de DMSO, y después c.s. hasta el volumen apropiado con tampón MI), un sustrato de Gba, y la placa negra se incuba adicionalmente a 37°C durante 1 h. Tras la incubación, se añaden 10 μ l del sobrenadante a una segunda placa negra, se mezcla con 10 μ l de tampón MI y 50 μ l de 6 mM de sustrato de Gba 4-MU-beta-D-glucósido, y se incuba a 37°C durante 1 h. La reacción se detiene entonces añadiendo 70 μ l de 0,2M de glicina, pH 10,8. La placa se lee en un lector de placas (contador (Victor2 1420 multilabel; Wallac) a F₄₆₀.

La actividad de beta-glucosa relativa se determina mediante la siguiente ecuación: $F_{460} \text{ sin CBE} - F_{460} \text{ con CBE} / (A_{550} \text{ muestra} - A_{550} \text{ tampón})$.

La lectura de F₄₆₀ se convierte en nmoles de 4-MU basándose en una curva estándar de 4-MU, y A₅₅₀ se convierte en mg de proteína basándose en una curva estándar de proteína. Una unidad de actividad de Gba se define como nmol de 4-MU liberado en una hora.

Estudio de lavado. Para determinar si y en qué marco de tiempo se invierten los efectos de AT2101 dosificado con el agua de beber en ratones L444P después de detener el tratamiento, se llevó a cabo un estudio de lavado. A nueve ratones macho L444P de 3 meses se les dosificaron alrededor de 10 mg/kg/día durante 4 semanas, con un número igual de ratones no tratados como control. Cuatro ratones tratados y cuatro ratones no tratados se sacrificaron al final de las 4 semanas, y los animales restantes no se trataron posteriormente con isofagomina, *es decir*, se les administró agua de beber normal, durante otras dos semanas antes del sacrificio y evaluación de la actividad de Gba en el cerebro.

Resultados

Actividad de Gba en el cerebro. Se observó un incremento significativo en la actividad de Gba después de poco menos de dos semanas de tratamiento con isofagomina en el cerebro (Fig. 1A), que persistió durante 4-12 semanas.

Notablemente, en el cerebro, el tratamiento con isofagomina dio como resultado un incremento de alrededor de 1 U/mg en ratones no tratados, hasta alrededor de 4,5 U/mg después de 2 y 4 semanas de tratamiento, y aumentó posteriormente hasta alrededor de 6 U/mg después de 12 semanas ($p < 0,001$). Se espera que el incremento de actividad de Gba persistirá a 3, 6 y 12 meses, y durante todo el tiempo en el que se administren las chaperonas.

- 5 De forma similar, tras dos semanas, los ratones tratados con C-bencil-isofagomina también mostraron un incremento significativo de la actividad de Gba en los órganos tales como bazo, y una tendencia hacia la actividad creciente en el pulmón y cerebro (datos no mostrados). Se espera que se observarán incrementos en la actividad de Gba en otros órganos, incluyendo el cerebro, con el tratamiento posterior, puesto que, después de dos semanas de tratamiento con AT2206, había una tendencia hacia el incremento en el cerebro (dato no mostrado).
- 10 Lavado. Igual que antes, tras 4 semanas de tratamiento a 10 mg/kg/día, la actividad de Gba se elevó significativamente en el cerebro en los ratones transgénicos L444P. (Fig. 1B).

Discusión

- 15 Estos resultados proporcionan la primera indicación de que niveles fisiológicos de chaperona son suficientes para atravesar la barrera hematoencefálica y potenciar la actividad de Gba en el cerebro y en los órganos periféricos (por ejemplo, bazo e hígado). Esto es sorprendente puesto que los agentes administrados periféricamente se han de administrar a menudo en mayores dosis para que sean eficaces en el cerebro. En el caso cuando se usan como chaperonas inhibidores de Gba por debajo de la inhibidora, las dosis elevadas de inhibidor en la periferia serían inhibidoras para Gba mutante, haciendo fracasar de ese modo el propósito de potenciar la actividad enzimática como se demostró previamente. Se obtuvieron resultados similares en monos tratados con IFG, en los que IFG se detectó en el CSF tras el tratamiento.
- 20

EJEMPLO 2: Restauración del tráfico lisosómico interrumpido en fibroblastos de Gaucher

- 25 Aunque los fibroblastos de Gaucher N370S (procedentes de un paciente humano) no demuestran una acumulación de sustrato (*es decir*, GluCer) en el citoplasma, estos fibroblastos muestran tinción de proteína y Gba lisosómica anormal en comparación con fibroblastos de tipo salvaje. El tratamiento de fibroblastos N370S con la chaperona farmacológica isofagomina incrementó la cantidad de Gba observada en el lisosoma, y restauró un patrón de tinción lisosómico normal a las células.

Métodos

- 30 Cultivo celular. Se cultivaron fibroblastos N370S (DMN89.15) en DMEM con 10% de FBS y 1% de penicilina/estreptomycin a 37°C con 5% de CO₂. Como control, se usó la estirpe celular de fibroblastos de tipo salvaje CRL-2097 procedente de un individuo sano. Las células se subcultivaron a partir de placas de 10 cm en placas de 12 pocillos con cubreobjetos. Las células de una placa de 10 cm confluyente se diluyeron en 38 ml de medio de cultivo. Se añadió isofagomina o C-bencil-isofagomina a partir de una disolución madre 10 mM (5% de DMSO) a cada pocillo de una placa de 12 pocillos a las siguientes concentraciones:

- 35 Control de C-bencil-isofagomina (anticuerpo secundario solamente; no tratado; 0,03 μ M; 0,1 μ M; 0,3 μ M; 1,0 μ M; 3,0 μ M; y 10,0 μ M.

Control de isofagomina (anticuerpo secundario solamente; no tratado; 10 μ M; 30 μ M; 100 μ M; 1 nM; 3 nM; y 10 nM.

Las células se cultivaron durante un total de alrededor de 6 días.

- 40 Fijación y tinción. Las células se lavaron durante 5 minutos en PBS, se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído al 3,7% (en PBS), se lavaron nuevamente durante 5 minutos en PBS, y se permeabilizaron con saponina al 0,5% durante 5 minutos. Las células se lavaron entonces con PBS que contiene 0,1% de saponina, se trataron durante 5 minutos con 0,1% de borohidruro de sodio/0,01% de saponina reciente, y se lavaron 3 veces con PBS con 0,1% de saponina/1% de BSA durante 5 minutos cada vez.

- 45 Las células se incubaron durante 1 h con 500 μ l de disolución de anticuerpo primario anti-Gba (1:200) o LAMP-1 (1:200; BD Pharmingen, nº de Catálogo 555798) en PBS con 1% BSA. La tinción lisosómica usando LysoTracker® Red (Cambrex, East Rutherford, NJ) se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Tras la incubación, las células se lavaron 3 veces en 1% de BSA que contiene 0,1% de saponina en PBS, seguido de la incubación con la disolución de anticuerpo secundario (1:500; AlexaFluor588 anti-conejo para anti-Gba, y AlexaFluor594 anti-IgG de ratón para anti-LAMP-1). Las células se montaron sobre cubreobjetos, se cerraron herméticamente, y se visualizaron inmediatamente.
- 50

Microscopía confocal. Las células se visualizaron usando un microscopio confocal. Las ganancias de los canales rojo y verde se ajustaron a 6 y la potencia del láser se optimizó usando la ventana de intensidad, y no se ajustaron durante el resto del experimento. Todos los portaobjetos se analizaron en la misma sesión, y todas las imágenes se reunieron sin ningún aumento usando las lentes 20x y 60x, el pequeño orificio, el tamaño óptimo de píxel, una media

de 2 barridos, y los canales rojo y verde se adquirieron simultáneamente en todos los experimentos previos.

Todas las imágenes se presentaron a la misma intensidad, y se generaron gráficas de intensidad de los canales rojo + verde para cada imagen colocando el cursor sobre el número máximo de células.

Se pueden realizar medidas futuras calculando una relación para los píxeles rojos (LAMP-1) y verdes (GBA) solapantes.

Resultados

Los fibroblastos N370S de Gaucher que han sido confluentes durante más de 5 días muestran un patrón de tinción lisosómico granular usando LysoTracker® Red (Fig. 2A) en comparación con un fibroblasto normal, que tiene un patrón de tinción por puntos (Fig. 2B). Se muestran resultados similares para fibroblastos L444P (datos no mostrados). La tinción para LAMP-1 lisosómica se muestra en fibroblastos tanto N370S como normales (Figs. 2C-D, respectivamente). Se muestra más LAMP-1 en fibroblastos de Gaucher.

El tratamiento con 30,0 μ M de isofagomina (AT2201) (Fig. 2G-H) y 3,0 μ M C-bencil-isofagomina (AT2206) (Fig. 2I-J) incrementó la cantidad de Gba en los lisosomas, y reestableció un patrón de tinción por puntos lisosómica normal para Gba y LAMP-1 en comparación con un control no tratado (Fig. 2E-F), como se indica mediante tinción dual.

Las Figuras 2K-N muestran cambios en la tinción lisosómica de Gba en fibroblastos de Gaucher N370S según lo siguiente: (K) control (anticuerpo secundario solo); (L) fibroblastos N370S no tratados; (M) 30 μ M de isofagomina; y (N) 3 μ M de C-bencil-isofagomina. Se muestra que la tinción de Gba se localiza en los lisosomas en controles tratados con chaperona frente a controles no tratados. Se obtuvieron resultados similares para fibroblastos de Gaucher L444P (datos no mostrados).

Esta mejora en la morfología celular normal con el tratamiento con chaperonas es debido a una disminución en la cantidad o en la acumulación de Gba mutante, posiblemente en forma de agregados, en el ER y/o citosol. En consecuencia, esta estrategia podría aliviar los síntomas del SNC en pacientes con Parkinson con mutaciones N370S heterocigotas, o pacientes con Gaucher heterocigotos con mutaciones N370S homocigotas y parkinsonismo/demencia.

EJEMPLO 3. Incremento de proteínas poliubiquitinadas con tratamiento con chaperonas en fibroblastos de Gaucher; restauración de la ruta de degradación de proteasoma

Se comparó un marcaje anti-proteína poliubiquitinada (PUP) y anti-Gba de fibroblasto humano sano con aquel en fibroblastos procedentes de un paciente con Gaucher que tiene una mutación de Gba L444P, y fibroblastos de pacientes de Gaucher que tienen la mutación de Gba N370S.

Métodos

Cultivo celular. Se cultivaron fibroblastos de Gaucher L444P (estirpe celular GM10915), fibroblastos de Gaucher N370S (estirpe celular DMN89.15), y fibroblastos de un individuo sano (CRL-2097) en DMEM con 10% de FBS y 1% de PS a 37°C con 5% de CO₂. Las células se subcultivaron a partir de placas de 10 cm en placas de 12 pocillos con cubreobjetos estériles. Las células N370S procedentes de un matraz T75 confluyente se diluyeron 1:6, y se cultivaron durante otros 4 días.

Las chaperonas isofagomina o C-bencil-isofagomina se añaden a partir de una disolución madre 10 mM (5% de DMSO) a cada fila de una placa de 12 pocillos a las siguientes concentraciones:

C-bencil-isofagomina- no tratado; control (anticuerpo secundario solamente; 0,03 μ M; 0,1 μ M; 0,3 μ M; 1,0 μ M; 3,0 μ M; y 10,0 μ M.

Isofagomina- no tratado; control (anticuerpo secundario solamente; 10 μ M; 30 μ M; 100 μ M; 1 nM; 3 nM; y 10 nM.

Fijación y tinción. Las células se lavaron una vez en PBS durante 5 minutos, seguido de la fijación durante 15 minutos en paraformaldehído al 3,7% reciente. Las células se lavaron entonces una vez en PBS durante 5 minutos, seguido de la permeabilización durante 5 minutos en Triton X-100 al 0,2%. Las células se lavaron entonces nuevamente en PBS durante 5 minutos, y se trataron durante 5-10 minutos con borohidruro de sodio al 0,1% reciente. Las células se lavaron tres veces en PBS con 1% de BSA (5 min. cada vez) antes de la tinción.

Las células se incubaron durante 1 hora con 500 μ l de los siguientes anticuerpos primarios (diluidos 1:200 en PBS con 1% de BSA):

1. Anticuerpo monoclonal de ratón anticlon FK1 de proteínas ubiquitinadas (nº de Catálogo PW 8805 de AFFINITY Research Products)

2. Anticuerpos anti-Gba de conejo comercialmente disponibles, por ejemplo 8E4.

Las células se lavaron entonces tres veces con PBS con 1% de BSA, seguido de la incubación durante 1 hora con una dilución 1:500 de los siguientes anticuerpos secundarios:

1. AlexaFluor568 anti-IgM (cadena μ) de ratón de cabra (nº de Catálogo A21043 de Molecular Probes);
2. AlexaFluor488 anti-IgG (H+L) de conejo de cabra muy absorbido de forma cruzada (nº de Catálogo A11034 de Molecular Probes)

Las células se lavaron tres veces en PBS con BSA, se montaron, y se almacenaron a 4°C antes de la visualización.

Resultados

Experimentos iniciales indicaron que la concentración de proteínas poliubiquitinadas (PUP) en células es mayor (muy intensa) en células sanas (Figs. 3A y 3C) que en fibroblastos de Gaucher N370S (Figs. 3D y 3F) y L444P (Figs. 3G y 3I), en los que la tinción es mucho menos intensa. Se sabe que la agregación proteica inhibe la ruta de ubiquitina/proteasoma. En consecuencia, la disminución de la agregación usando chaperonas tiene un efecto positivo sobre la ruta de degradación mediada por proteasomas.

Discusión

Los pacientes con Gaucher con la mutación L444P tienen una implicación más amplia del SNC. Esto puede ser debido al hecho de que se sabe que la enzima mutante L444P humana es mucho más inestable que, por ejemplo, el mutante N370S, haciendo incluso más probable que se formen agregados proteicos, e inhibiendo de ese modo la ruta de ubiquitina/proteasoma (Tsuji et al., N. Eng. J. Med. 1987; 315: 570). Muchas otras enfermedades neurodegenerativas están provocadas por mutaciones que dan como resultado la acumulación de proteínas ubiquitinadas, y se ha dado a conocer además que agregados proteicos pueden alterar directamente la ruta de ubiquitina/proteasoma e inducir la expresión de mediadores inflamatorios (Li et al., The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2003; 35: 547-552).

Si L444P de ratón se estabiliza usando una chaperona farmacológica específica, el estrés sobre la ruta de ubiquitina/proteasoma se alivia mediante el tráfico creciente de Gba hacia el lisosoma, alargando de ese modo la semivida de la Gba mutante - en lugar de ser degradada en el ER, circularía hacia el lisosoma. Esto explica la mayor tinción de PUP en fibroblastos normales en comparación con fibroblastos de Gaucher.

Otras mutaciones de Gba que clínicamente no dan como resultado síntomas abiertos del SNC (es decir, N370S) pueden todavía dar como resultado la acumulación de la proteína mutante en el ER y en el citosol, provocando estrés adicional sobre la ruta de ubiquitina/proteasoma o interrumpiendo el tráfico en neuronas al disminuir la capacidad de las células para monoubiquitinar proteínas.

La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas aquí. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas aquí, serán manifiestas para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras que se acompañan.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wustman, Brandon

<120> TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DEL SNC ASOCIADOS CON MUTACIONES EN GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS LISOSÓMICAS

<130> 077376.0352

<150> 60/689,120

<151> 2005-06-08

<160>4

<170> FastSEQ for Windows version 4.0

<210> 1

<211> 8850

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

tctagaaaga	cttcaactgag	atcattttaa	gaacaaaaag	gatggctggg	gtccagcgca	60
gtggctcatg	cctgtaatcc	cagcactttc	ggataccaag	gcagcagatc	acctgaggtc	120
cagagtttca	gaccagcctg	gccaacatag	tgaaacccca	tctctactaa	aaataaaaaa	180
attagctgag	catgttggag	ggcacctgta	atcccagcta	cttgggaggc	tgaggcagga	240
gaatcactcg	aacccaggag	gtggagggtg	cagtgaagcca	agatcacgcc	actgcactcc	300
agcctgggca	acagagttag	actctgtctc	aaaaaacaac	aacaacaaaa	aatacaaaaca	360
agagacaagt	agttcccagg	tgccctacca	gtggtcaggc	actgcactta	cctcaactgac	420
tgacagtaacc	acccttttag	gttggtggcat	tgccctccatt	ttccaggcaa	ggaaatgggc	480
tgagagctgg	gattagtcag	gtcatgactg	tgtgtgccac	tcccgcataa	tctcatttga	540
tgtggttcat	gaggccacac	catggacagc	ttcctccttg	tgtccactga	ggatatggct	600
ttgtacaaca	ctttgggttt	ttgaacgact	ttacaaacct	ccctgtcttg	tgaggaagga	660
agaacagtta	ttaccatctg	catctgatga	tgaaacaagg	gacgctgcag	aggagccgca	720
ctgaccactc	cctccctcca	gtcctgtcat	cccactgccca	gtgtcccacc	ctcttgtgcc	780
ctgcacttca	ctggctaata	acccccctca	ctttttcctc	tgtgaagcca	tcctggataa	840
ttccccaccc	acgaatggtc	cctcctcatc	tcagagagct	ctccatgcac	acctgttacc	900
gtttctgtct	ttatctgtaa	atatctgtgt	gtctgacttc	catgcctcac	acacctctat	960
agggcaaaga	ctgtctttaa	catcttggta	gtgtcagtat	tttgcacagt	gaagtttttt	1020
tttttaaatt	atatcagctt	tatttgtacc	tttttgacat	ttctatcaaa	aaagaagtgt	1080
gcctgctgtg	gttcccattc	tctgggattt	aggagcctct	acccatttct	ccatgcaaat	1140
ctgtgttcta	ggctcttcct	aaagttgtca	cccatacatg	ccctccagag	ttttataggg	1200
catataatcg	taacagatga	gaggaagcca	attgcccttt	agaaatatgg	ctgtgattgc	1260
ctcacttcct	gtgtcatgtg	acgctcctag	tcatcacatg	acccatccac	atcggaagc	1320
cgggaattact	tgacgggcta	acctagtgcc	tatagctaag	gcaggtacct	gcattccttg	1380
ttttgttttag	tggatcctct	atccttcaga	gactctggaa	cccctgtggt	cttctcttca	1440
tctaattgacc	ctgaggggat	ggagttttca	agtccttcca	gagaggtaag	agagagagct	1500
cccaatcagc	attgtcacag	tgcttctgga	atcctggcac	tggaatttaa	tgaatgacag	1560
actctctttg	aatccagggc	catcatggct	ctttgagcaa	ggcacagatg	gagggagggg	1620
tcgaagttag	aatgggtggg	aagagtgggt	gggagcatcc	tgatttgggg	tgggcagaga	1680
gttgtcatca	gaaggggtgc	agggagagct	gcacccaggt	ttctgtgggc	cttgtcctaa	1740
tgaatgtggg	agaccgggccc	atgggcaccc	aaaggcagct	aagccctgcc	caggagagta	1800
gttgaggggt	ggagaggggc	ttgcttttca	gtcattcctc	attctgtcct	caggaatgtc	1860
ccaagccttt	gagttagggt	agcatcatgg	ctggcagcct	cacaggattg	cttctacttc	1920
aggcagtgtc	gtgggcatca	ggtgagttag	tcaaggcagt	ggggaggtag	cacagagcct	1980
cccttctgcc	tcatagtcct	ttggtagcct	tccagtaagc	tggtggtaga	cttttagtag	2040
gtgctcaata	aatccttttg	agtgaactgag	accaactttg	gggtgaggat	tttgtttttt	2100
ttcttttgaa	acagagtctt	actctgttgc	ctgggctgga	gtgcagtggg	gcaatttttg	2160
ctcattccaa	cctctgcctc	ccagattcaa	gcgattctct	tgcttcagct	ttccaggtag	2220
ctgggattac	aggcggccac	cactacgccc	agctaatttt	tgtattttta	gtagagacgg	2280
ggtttcacca	tgctggcaag	gcaggtctca	aactcctcac	ctcaggtgat	ccgcccacct	2340

cggcctccta	aagtgttagg	attacaggtg	tgagccccctg	cgccccggcca	aggggtgagg	2400
aatttttga	ccgtgttcag	tctctcctag	cagatgtgtc	cattctccat	gtcttcacat	2460
gacctcactc	tgcttgact	ccctccctcc	caggtgcccc	cccctgcatc	cctaaaagct	2520
tcgggtacag	ctcgggtggg	tgtgtctgca	atgccacata	ctgtgactcc	tttgaccccc	2580
cgacctttcc	tgcccttggg	accttcagcc	gctatgagag	tacacgcagt	gggcgacgga	2640
tgaggtgag	tatggggccc	atccaggcta	atcacacggg	cacaggtaac	cattacaccc	2700
ctcacccccct	gggccaggct	gggtcctcct	agaggtaaat	ggtgtcagtg	atcacatgg	2760
agtttcccgc	tggtgtactga	tacccttatt	ccctgtggat	gtcctcaggc	ctgctactga	2820
ccctgcagcc	agaacagaag	ttccagaaaag	tgaagggatt	tgaggggggcc	atgacagatg	2880
ctgctgtctt	caacatcctt	gccctgtcac	cccctgcccc	aaatttgcta	cttaaatcgt	2940
acttctctga	agaaggtgag	gaggaagggg	acaagatgac	atagagccat	tttgcacatt	3000
cgtttttctt	ttcttttttt	aaaatttttt	tgaggcagaa	tctcactctg	cccattctgt	3060
cggcgagaca	ggagtgcagt	ggtgtgatct	cccctcacag	caacctctgc	ctcccaggct	3120
atagtgattc	tcctgcctca	gcctcctgag	tagctggaat	tataggcggtg	cgccactacc	3180
acctggctaa	tttttgtatt	tttagtagag	acagggtttc	atcatgttga	ccaggctagt	3240
cttaaactcc	tgacctcaaa	tgatatacct	gccttggcct	cccgaagtgc	tggaattaca	3300
agtgtgagcc	accgagccca	gcagacactt	ttcttttttc	tttttttttt	tttgagacag	3360
agtctgcac	tgtcacccag	gctggagtgc	agtggcacia	tctcagctca	ctgcaacctc	3420
cacctccggg	gttcagggtg	ttctcctgtc	tcagcctctc	gagtacctgg	gattacaggt	3480
gcctgccacc	acgcccggct	aattttttgt	attttttagta	gagacagggg	ttcactatgt	3540
tgccaggat	gattgcgaac	tcctgacctc	gtgatctgcc	cacatcgggc	ttccaaagtg	3600
ctgggattac	atgctgtgagc	cactgacact	tttctttggc	ctttctttgg	accttgactt	3660
ctgcccattcc	ctgacatttg	gttctctgtt	taatggcctg	tgaaataaga	tttcggccgc	3720
tatcatctgc	taactgctac	ggactcaggc	tcagaaaggc	ctgctgttca	cccagggtgc	3780
agcctccaca	ggttccaacc	caggagccca	agttcccttt	ggccctgact	cagacactat	3840
taggactggc	aagtgataag	cagagtccca	tactctccta	ttgactcgga	ctaccatata	3900
ttgatcatcc	ttttctgtag	gaatcgata	taacatcatc	cggttaccca	tgccagctg	3960
tgactttctc	atccgcacct	acacctatgc	agacaccctt	gatgatttcc	agttgcacaa	4020
cttcagcctc	ccagaggaag	ataccaagct	caaggtaggc	attctagctt	tttcaggccc	4080
tgagggccct	gatgtctggg	ggttgagaaa	ctgtagggtg	ggtctgcttg	tacagacatt	4140
ttgtcccttg	ctgttttgtc	ctgggggtgg	gaggggtggg	gctaattggc	gaaccggatg	4200
cactgggttg	gctagtatgt	gttccaactc	tggtgtgctt	tctcttccat	acctttgtct	4260
ctagataccc	ctgattcacc	gagccctgca	gttggccagg	cgtcccgttt	cactccttgc	4320
cagcccttgg	acatcaccca	cttggctcaa	gaccaatgga	gcggtgaatg	ggaaggggtc	4380
actcaaggga	cagcccggag	acatctacca	ccagacttgg	gccagatact	ttgtgaagta	4440
agggatcagc	aaggatgtgg	gatcaggact	ggcctcccat	ttagccatgc	tgatctgtgt	4500
cccaaccctc	aacctagtgc	cacttccaga	tctgcctgtc	ctcagctcac	ctttctacct	4560
tctgggcctt	tcagccttgg	gcctgtcaat	cttggccact	ccatcaggct	tcctgttctc	4620
tcggtctggc	ccactttctt	tttatttttt	ttcttttttt	tttttttgag	aaggagtctc	4680
tcctctgtgc	accagcgtg	gagtgctgtg	gcgccactct	cactcactgt	caactcttgc	4740
tcctgagttc	aagcaattct	cctgcctcag	cttccaagt	agctgggatt	ataggcgctt	4800
gccaccaggc	ccagctgatt	tttctatttt	tagtagagac	gggttttcgc	caggctgttc	4860
tcgaactcct	gaactcaagt	gatccacctg	cctcggcttc	ccaaagtgtc	gggattacag	4920
gtgtgagcca	ccacacccag	ctggtctggg	ccactttctt	ggccggatca	ttcatgacct	4980
ttctcttgcc	aggttccttg	atgcctatgc	tgagcacaag	ttacagtctt	gggcagtgac	5040
agctgaaaat	gagccttctg	ctgggctgtt	gagtggtatc	cccttccagt	gcctgggctt	5100
cacccttgaa	catcagcgag	acttcattgc	ccgtgacctc	ggtcctaccc	tcgccaaacag	5160
tactcaccac	aatgtccgcc	tactcatgct	ggatgaccac	cgcttgctgc	tgccccactg	5220
ggcaaagggtg	gtaaggcctg	gacctccatg	gtgtctccagt	gaccttcaaa	tccagcatcc	5280
aatgactgg	ctcccaaact	tagagcgatt	tctctaccca	actatggatt	cctagagcac	5340
cattccccctg	gacctccagg	gtgccatgga	tcccacagtt	gtcgttgtaa	acctttctag	5400
gggctgggctg	aggtggctca	ctcatgcaaa	cccagcactt	tggaagccg	aggcgggtga	5460
tcacctgagg	tcaggagtgt	aagaccaccc	tgccaacgt	gttgaaaccc	tgtgtctact	5520
aaaatacaaa	aaaaaaaaat	tatctgggca	tgatggtggg	tgtctgtaat	cccagctact	5580
caggaggctg	agaagggaga	atcagttgaa	cccgggagat	ggtgggttgcg	gtgagccgag	5640
atcgcgccac	tgactccag	cctgggaggc	tgagcgagac	tccatctcga	aacaaaacaa	5700
aacaaaacta	tctaggctgg	gggtgggtgt	tcagtgtatg	atgtgtatat	acatatatat	5760
gtgtttatat	gtatatatat	atcacacac	atcacatcat	acacacacat	acacacacaa	5820
attagctggg	tgtggcacc	gtgtagtccc	agctactcag	gaggctaatt	tgaggagatc	5880
agttgaccct	aggaagtcaa	ggctgcagtg	agtcgtgatt	gcgccactgt	actccagccc	5940
gagtgacaga	gtgacatcct	gtctcaaaaa	caaaaaaaaaa	tctccccaaa	cctctctagt	6000
tgcatctctc	ccgtcaccca	actccaggat	tcctacaaca	ggaactagaa	gttccagaag	6060
cctgtgtgca	aggtccagga	tcagttgtct	ttcctttgca	ggtactgaca	gaccacagaag	6120

```

cagctaaata tgttcatggc attgctgtac attggtacct ggactttctg gctccagcca 6180
aagccaccct aggggagaca caccgcctgt tccccaacac catgctcttt gcctcagagg 6240
cctgtgtggg ctccaagtctc tgggagcaga gtgtgcggct aggcctcctg gatcgagggg 6300
tgcagtacag ccacagcctc atcacggtaa gccacccag tctcccttcc tgcaaagcag 6360
acctcagacc tcttactagt ttcaccaaaag actgacagaa gcccttcctg tccagcttcc 6420
cccagctagc ctgcccctttt gagcaactct ggggaaccat gattccctat ctcccttctc 6480
cttcacaggt ctgcacacct cattgcccc tttgcaacta ctgaggcact tgcagctgcc 6540
tcagacttct cagctcccc tgagatgcct ggatcttcac acccccaact ccttagctac 6600
taaggaatgt gcccctcaca gggctgacct acccacagct gcctctccca catgtgaccc 6660
ttacctacac tctctgggga cccccagtgt tgagcctttg tctctttgcc tttgtcctta 6720
ccctagaacc tccgttacca tgtggtcggc tggaccgact ggaaccttgc cctgaacccc 6780
gaaggaggac ccaattgggt gcgtaacttt gtcgacagtc ccatcattgt agacatcacc 6840
aaggacacgt tttaaaaca gccatgttcc taccaccttg gccacttcag gtgagtggag 6900
ggcgggcacc cccattccat accaggccta tcatctccta catcgatgg cttacatcac 6960
tctacaccac gagggagcag gaaggtgttc aggggtggaac ctcggaagag gcacacccat 7020
ccccttttgc accatggagg caggaagtga ctaggtagca acagaaaacc ccaatgcctg 7080
aggctggact gcgatgcaga aaagcagggg cagtgcctag cagcatggct ccaggcctag 7140
agagccaggg cagagcctct gcaggagtta tgggggtggg ccggtgggtg gtgacttctt 7200
agatgagggg ttcattggag gtaccccgag ggactctgac catctgttcc cacattcagc 7260
aagttcattc ctgagggctc ccagagagtg gggctggttg ccagtcagaa gaacgacctg 7320
gacgcagtgg cactgatgca tcccgatggc tctgtgtgtg tggctgtgct aaaccggtga 7380
gggcaatggg gaggtctggg aagtgggctg aagacagcgt tgggggctt ggccaggatca 7440
cactctcagc ttctctctcc tgctctctag ctctctctag gatgtgcctc ttaccatcaa 7500
ggatcctgct gtgggcttcc tggagacaat ctacactggc tactccattc acacctacct 7560
gtggcgtcgc cagtgatgga gcagatactc aaggaggcac tgggctcagc ctgggcatta 7620
aaggagacaga gtcagctcac acgtgtgtct tgactaaaga gggcacagca gggccagtgt 7680
gagcttacag cgacgtaagc ccaggggcaa tgggttgggt gactcacttt cccctctagg 7740
tggtgccagg ggctggaggc ccctagaaaa agatcagtaa gccccagtgt cccccagcc 7800
ccatgctta tgtgaacatg cgtgtgtgtc tgcttgcctt ggaaactggg cctgggtcca 7860
ggcctagggg gagctcactg tccgtacaaa cacaagatca gggctgaggg taaggaaaag 7920
aagagactag gaaagctggg cccaaaactg gagactgttt gtctttcctg gagatgcaga 7980
actgggcccg tggagcagca gtgtcagcat cagggcgga ggccttaaagc agcagcgggt 8040
gtgcccaggc acccagatga ttcctatggc accagccagg aaaaatggca gctcttaaag 8100
gagaaaaatg ttgagcccag tcagtgtgag tggctttatt ctgggtggca gcaccccgtg 8160
tccggctgta ccaacaacga ggaggcacgg gggcctctgg aatgcatgag agtagaaaaa 8220
ccagtcttgg gagcgtgagg acaaatcatt cctcttcatt ctctcagcc atgccaggg 8280
tccgggtgcc tggggcccga gcaggcgttg cccgctggat ggagacaatg ccgctgagca 8340
aggcgtagcc caccatggct gccagtcctg ccagcacaga taggatctgg ttccggcgcc 8400
ggtatggctc ctctcagtc tctgggcctg ctggtgtctg gcgttgcggt ggtacctcag 8460
ctgaggggtc aggaaggaag gtgtgttagg agaactagt ctgggatccc tgcccactct 8520
ccccagggt cccctccca tctgcccctt acctccatcc caggggaagt agagacttag 8580
aatgtgggta caataggcac agaggttgtg cagccacgc aggtggacct gcagcttccc 8640
actgggcagc tttgctgca gcagcagggc caagtagctg aagacgaagg cgtccaagga 8700
ggcagggctg gagcagagag agaaggggtg gatggaggag aaccactggg gtagaagggg 8760
taaagatgga gctggaggaa gagtcagcct tgggaggtg gctctgggca gcaggcggcc 8820
accaggaagg acaggacaca cagttctaga

```

<210>2

<211> 536

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Glu Phe Ser Ser Pro Ser Arg Glu Glu Cys Pro Lys Pro Leu Ser
 1          5          10          15
Arg Val Ser Ile Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln
          20          25          30
Ala Val Ser Trp Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe
          35          40          45
Gly Tyr Ser Ser Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser
          50          55          60

```

Phe 65	Asp	Pro	Pro	Thr	Phe 70	Pro	Ala	Leu	Gly	Thr	Phe	Ser	Arg	Tyr	Glu 80
Ser	Thr	Arg	Ser	Gly 85	Arg	Arg	Met	Glu	Leu 90	Ser	Met	Gly	Pro	Ile 95	Gln
Ala	Asn	His	Thr 100	Gly	Thr	Gly	Leu	Leu 105	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro 110	Glu	Gln
Lys	Phe	Gln	Lys	Val	Lys	Gly	Phe 120	Gly	Gly	Ala	Met	Thr	Asp	Ala	Ala
Ala	Leu 130	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu 135	Ser	Pro	Pro	Ala	Gln	Asn	Leu	Leu	Leu
Lys 145	Ser	Tyr	Phe	Ser	Glu 150	Glu	Gly	Ile	Gly	Tyr 155	Asn	Ile	Ile	Arg	Val 160
Pro	Met	Ala	Ser	Cys 165	Asp	Phe	Ser	Ile	Arg 170	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Asp
Thr	Pro	Asp	Asp 180	Phe	Gln	Leu	His	Asn 185	Phe	Ser	Leu	Pro	Glu	Glu	Asp
Thr	Lys	Leu 195	Lys	Ile	Pro	Leu	Ile 200	His	Arg	Ala	Leu	Gln 205	Leu	Ala	Gln
Arg	Pro 210	Val	Ser	Leu	Leu	Ala 215	Ser	Pro	Trp	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Leu
Lys 225	Thr	Asn	Gly	Ala	Val 230	Asn	Gly	Lys	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Gln	Pro 240
Gly	Asp	Ile	Tyr	His 245	Gln	Thr	Trp	Ala	Arg 250	Tyr	Phe	Val	Lys	Phe	Leu
Asp	Ala	Tyr	Ala	Glu 260	His	Lys	Leu	Gln 265	Phe	Trp	Ala	Val	Thr	Ala	Glu
Asn	Glu 275	Pro	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu 280	Ser	Gly	Tyr	Pro	Phe	Gln	Cys	Leu
Gly	Phe 290	Thr	Pro	Glu	His 295	Gln	Arg	Asp	Phe	Ile	Ala 300	Arg	Asp	Leu	Gly
Pro 305	Thr	Leu	Ala	Asn	Ser 310	Thr	His	His	Asn	Val 315	Arg	Leu	Leu	Met	Leu
Asp	Asp	Gln	Arg	Leu 325	Leu	Leu	Pro	His	Trp 330	Ala	Lys	Val	Val	Leu	Thr
Asp	Pro	Glu	Ala 340	Ala	Lys	Tyr	Val	His 345	Gly	Ile	Ala	Val	His	Trp	Tyr
Leu	Asp	Phe 355	Leu	Ala	Pro	Ala	Lys 360	Ala	Thr	Leu	Gly	Glu	Thr	His	Arg
Leu	Phe 370	Pro	Asn	Thr	Met	Leu 375	Phe	Ala	Ser	Glu	Ala	Cys	Val	Gly	Ser
Lys 385	Phe	Trp	Glu	Gln	Ser 390	Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Gly	Met
Gln	Tyr	Ser	His	Ser 405	Ile	Ile	Thr	Asn	Leu 410	Leu	Tyr	His	Val	Val	Gly
Trp	Thr	Asp	Trp 420	Asn	Leu	Ala	Leu	Asn 425	Pro	Glu	Gly	Gly	Pro	Asn	Trp
Val	Arg	Asn 435	Phe	Val	Asp	Ser	Pro 440	Ile	Ile	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Asp
Thr	Phe 450	Tyr	Lys	Gln	Pro	Met 455	Phe	Tyr	His	Leu	Gly 460	His	Phe	Ser	Lys
Phe 465	Ile	Pro	Glu	Gly	Ser 470	Gln	Arg	Val	Gly	Leu	Val	Ala	Ser	Gln	Lys
Asn	Asp	Leu	Asp	Ala 485	Val	Ala	Leu	Met	His 490	Pro	Asp	Gly	Ser	Ala	Val
Val	Val	Val	Leu 500	Asn	Arg	Ser	Ser	Lys 505	Asp	Val	Pro	Leu	Thr	Ile	Lys
Asp	Pro	Ala 515	Val	Gly	Phe	Leu	Glu 520	Thr	Ile	Ser	Pro	Gly 525	Tyr	Ser	Ile
His 530	Thr	Tyr	Leu	Trp	Arg	Arg 535	Gln								

<210>3

<211> 2586

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221 > característica diversa

<222> 2317

5 <223> n = A, T, C o G

<400> 3

```

cattaggcct atgaattata agatacagtc acttttaaaat ccactggaag gctgaagagt 60
gagttaaacc tcttataatg aatatacagt gaaaccagta gaggcatttt atttaggggt 120
cctacaagaa agtgcttaaa tagcatcgac gcctacatgc tacatcctgt tcagtctctg 180
cctctgtgat gcagttggcc agcaaatatc ctccaagtca tcatttgcag agtgctaggg 240
ataaaatgag gagcaatacc aaatgctata cctgccctta tgggtcttat agtccaacgg 300
gagaaaaaga tattatacaa ataatacagg aaaataaata gaaaacgcat ccttgttttt 360
gttttagtggg tctctatcc ttcagagact ctggaacccc tgtggtcttc tcttcatcta 420
atgaccctga ggggatggag ttttcaagtc cttccagaga ggaatgtccc aagcctttga 480
gtagggtaag catcatggct ggcagcctca caggtttgct tctacttcag gcagtgtcgt 540
gggcatcagg tgcccccccc tgcattcccta aaagcttcgg ctacagctcg gtggtgtgtg 600
tctgcaatgc cacatactgt gactcctttg accccccgac ctttcctgcc ctgtgtacct 660
tcagccgcta tgagagtaca cgcagtgggc gacggatgga gctgagtatg gggcccatcc 720
aggctaatac cacgggcaca ggctgtctac tgacctgca gccagaacag aagttccaga 780
aagtgaaggg atttggaggg gccatgacag atgctgtctg tctcaacatc cttgccctgt 840
caccctctgc ccaaaatttg ctacttaaat cgtacttctc tgaagaagga atcggatata 900
acatcatccg ggtacctatg gccagctgtg actttctccat ccgcacctac acctatgcag 960
acaccctga tgatttccag ttgcacaact tcagcctccc agaggaagat accaagctca 1020
agatacccct gattcacgga gccctgcagt tggcccagcg tcccgtttca ctcttgcca 1080
gcccctggac atcacccact tggctcaaga ccaatggagc ggtgaatggg aaggggtcac 1140
tcaagggaca gcccggagac atctaccacc agacctgggc cagatacttt gtgaagtcc 1200
tggatgccta tgctgagcac aagttacagt tctgggcagt gacagctgaa aatgagcctt 1260
ctgctgggct gttgagtga tacccttcc agtgcctggg cttcacccct gaacatcagc 1320
gagacttcat tgcccgtgac ctaggctcta ccctcgccaa cagtactcac cacaatgtcc 1380
gcctactcat gctggatgac caacgcttgc tgctgcccc ctgggcaaag gtggtactga 1440
cagaccaga agcagctaaa tatgttcatg gcattgtctg acattggtac ctggactttc 1500
tggctccagc caaagccacc ctaggggaga cacaccgctt gttccccaac acctgctct 1560
ttgctcaga ggctgtgtg ggctccaagt tctgggagca gagtgtgagg ctaggctcct 1620
gggatcgagg gatgcagtac agccacagca tcatcacgaa cctcctgtac catgtggtcg 1680
gctggaccga ctggaacctt gccctgaacc ccgaaggagg acccaattgg gtgcgtaact 1740
ttgtcgacag tcccatcatt gtagacatca ccaaggacac gttttacaaa cagcccatgt 1800
tctaccacct tggccacttc agcaagttca ttctgaggg ctcccagaga gtggggctgg 1860
ttgccagtca gaagaacgac ctggacgcag tggcactgat gcatcccgat ggctctgctg 1920
ttgtggtcgt gctaaaccgc tcttctaagg atgtgcctct taccatcaag gatcctgctg 1980
tgggcttctt ggagacaatc tcacctggt actccattca cacctacctg tggcatcgcc 2040
agtgatggag cagatactca aggaggcact gggtcagcc tgggcattaa agggacagag 2100
tcagctcaca cgctgtctgt gactaaagag ggcacagcag ggccagtgtg agcttacagc 2160
gacgtaagcc caggggcaat ggtttgggtg actcactttc cctcctaggt ggtgcccagg 2220
gctggaggcc ctagaaaaa gatcagtaag cccagtgctc ccccagccc ccatgcttat 2280
gtgaacatgc gctgtgtgct gcttgccttg gaaactngcc tgggtccagg cctaggggtga 2340
gctcactgtc cgtacaaaaca caagatcagg gctgagggtg agggaaaagaa gagactagga 2400
aagctgggcc caaaactgga gactgtttgt ctttcttaga gatgcagaac tggggccgtg 2460
gagcagcagt gtcagcatca gggcggaagc cttaaagcag cagcgggtgt gccaggcac 2520
ccagatgatt cctatggcac cagccaggaa aaatggcagc tcttaaagga gaaaatgttt 2580
gagccc

```

<210>4

<211> 516

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Gly Ser Leu Thr Gly Leu Leu Leu Leu Gln Ala Val Ser Trp
1 5 10 15

Ala Ser Gly Ala Arg Pro Cys Ile Pro Lys Ser Phe Gly Tyr Ser Ser
20 25 30
Val Val Cys Val Cys Asn Ala Thr Tyr Cys Asp Ser Phe Asp Pro Pro
35 40 45
Thr Phe Pro Ala Leu Gly Thr Phe Ser Arg Tyr Glu Ser Thr Arg Ser
50 55 60
Gly Arg Arg Met Glu Leu Ser Met Gly Pro Ile Gln Ala Asn His Thr
65 70 75 80
Gly Thr Gly Leu Leu Leu Thr Leu Gln Pro Glu Gln Lys Phe Gln Lys
85 90 95
Val Lys Gly Phe Gly Gly Ala Met Thr Asp Ala Ala Ala Leu Asn Ile
100 105 110
Leu Ala Leu Ser Pro Pro Ala Gln Asn Leu Leu Leu Lys Ser Tyr Phe
115 120 125
Ser Glu Glu Gly Ile Gly Tyr Asn Ile Ile Arg Val Pro Met Ala Ser
130 135 140
Cys Asp Phe Ser Ile Arg Thr Tyr Thr Tyr Ala Asp Thr Pro Asp Asp
145 150 155 160
Phe Gln Leu His Asn Phe Ser Leu Pro Glu Glu Asp Thr Lys Leu Lys
165 170 175
Ile Pro Leu Ile His Arg Ala Leu Gln Leu Ala Gln Arg Pro Val Ser
180 185 190
Leu Leu Ala Ser Pro Trp Thr Ser Pro Thr Trp Leu Lys Thr Asn Gly
195 200 205
Ala Val Asn Gly Lys Gly Ser Leu Lys Gly Gln Pro Gly Asp Ile Tyr
210 215 220
His Gln Thr Trp Ala Arg Tyr Phe Val Lys Phe Leu Asp Ala Tyr Ala
225 230 235 240
Glu His Lys Leu Gln Phe Trp Ala Val Thr Ala Glu Asn Glu Pro Ser
245 250 255
Ala Gly Leu Leu Ser Gly Tyr Pro Phe Gln Cys Leu Gly Phe Thr Pro
260 265 270
Glu His Gln Arg Asp Phe Ile Ala Arg Asp Leu Gly Pro Thr Leu Ala
275 280 285
Asn Ser Thr His His Asn Val Arg Leu Leu Met Leu Asp Asp Gln Arg
290 295 300
Leu Leu Leu Pro His Trp Ala Lys Val Val Leu Thr Asp Pro Glu Ala
305 310 315 320
Ala Lys Tyr Val His Gly Ile Ala Val His Trp Tyr Leu Asp Phe Leu
325 330 335
Ala Pro Ala Lys Ala Thr Leu Gly Glu Thr His Arg Leu Phe Pro Asn
340 345 350
Thr Met Leu Phe Ala Ser Glu Ala Cys Val Gly Ser Lys Phe Trp Glu
355 360 365
Gln Ser Val Arg Leu Gly Ser Trp Asp Arg Gly Met Gln Tyr Ser His
370 375 380
Ser Ile Ile Thr Asn Leu Leu Tyr His Val Val Gly Trp Thr Asp Trp
385 390 395 400
Asn Leu Ala Leu Asn Pro Glu Gly Gly Pro Asn Trp Val Arg Asn Phe
405 410 415
Val Asp Ser Pro Ile Ile Val Asp Ile Thr Lys Asp Thr Phe Tyr Lys
420 425 430
Gln Pro Met Phe Tyr His Leu Gly His Phe Ser Lys Phe Ile Pro Glu
435 440 445
Gly Ser Gln Arg Val Gly Leu Val Ala Ser Gln Lys Asn Asp Leu Asp
450 455 460
Ala Val Ala Leu Met His Pro Asp Gly Ser Ala Val Val Val Val Leu
465 470 475 480
Asn Arg Ser Ser Lys Asp Val Pro Leu Thr Ile Lys Asp Pro Ala Val
485 490 495
Gly Phe Leu Glu Thr Ile Ser Pro Gly Tyr Ser Ile His Thr Tyr Leu
500 505 510
Trp His Arg Gln

REIVINDICACIONES

1. Isofagomina para uso en la prevención o tratamiento de un individuo predispuesto o que tiene enfermedad de Parkinson o parkinsonismo, en el que el individuo es heterocigoto u homocigoto para una mutación en un gen que codifica glucocerebrosidasa.
- 5 2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad de Parkinson es enfermedad de Parkinson de comienzo temprano.
3. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el individuo es heterocigoto u homocigoto para una mutación N370S en un gen que codifica glucocerebrosidasa.
- 10 4. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el individuo es heterocigoto para una mutación R496H en un gen que codifica glucocerebrosidasa.
5. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el individuo es heterocigoto u homocigoto para una mutación L444P en un gen que codifica glucocerebrosidasa.
6. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en el que el individuo tiene una mutación en un gen que codifica β -glucocerebrosidasa.
- 15 7. El compuesto para uso según la reivindicación 1, y adicionalmente un segundo agente terapéutico.
8. El compuesto para uso según la reivindicación 7, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en agonistas de receptores de dopamina, anticolinérgicos, inhibidores de catecol-O-metil transferasa (COMT), e inhibidores de monoamina oxidasa.
9. El compuesto para uso según la reivindicación 7, en el que el segundo agente terapéutico es levodopa.

20

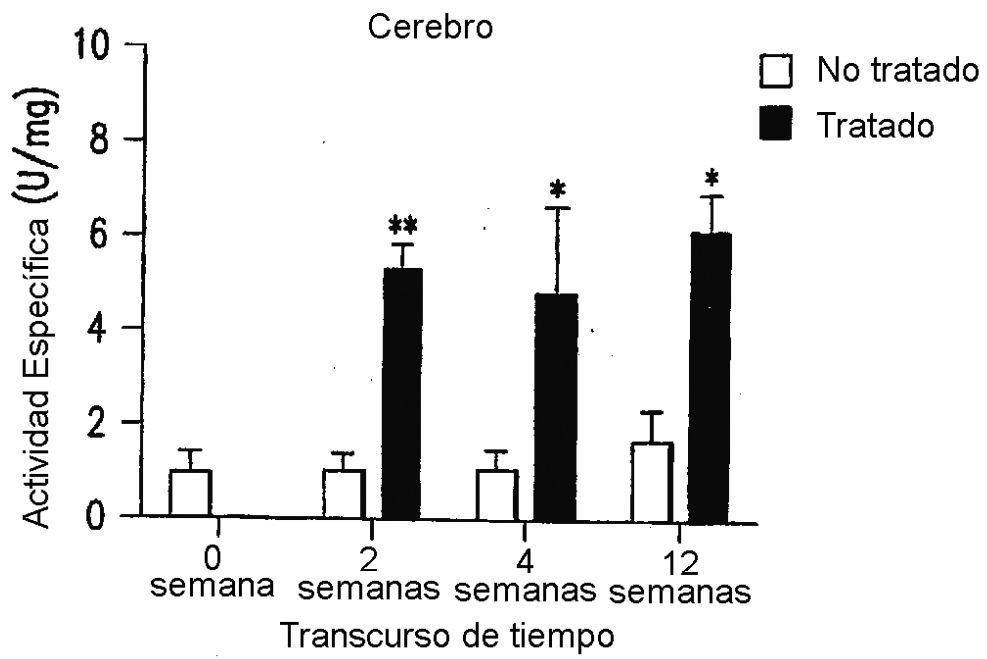


FIG.1A

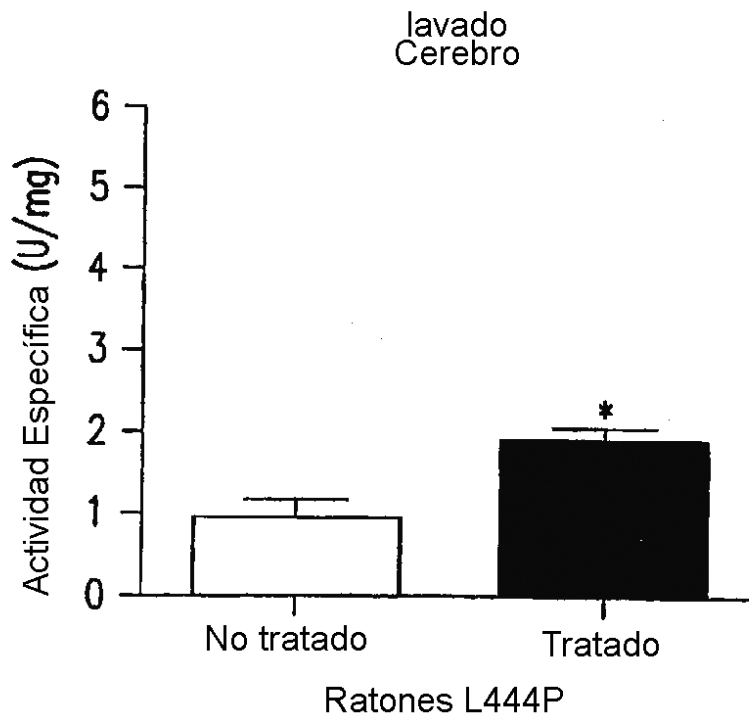


FIG.1B

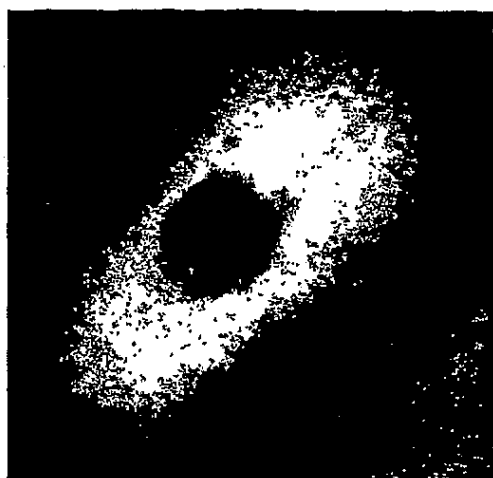


FIG. 2A



FIG. 2B



FIG. 2C



FIG. 2D

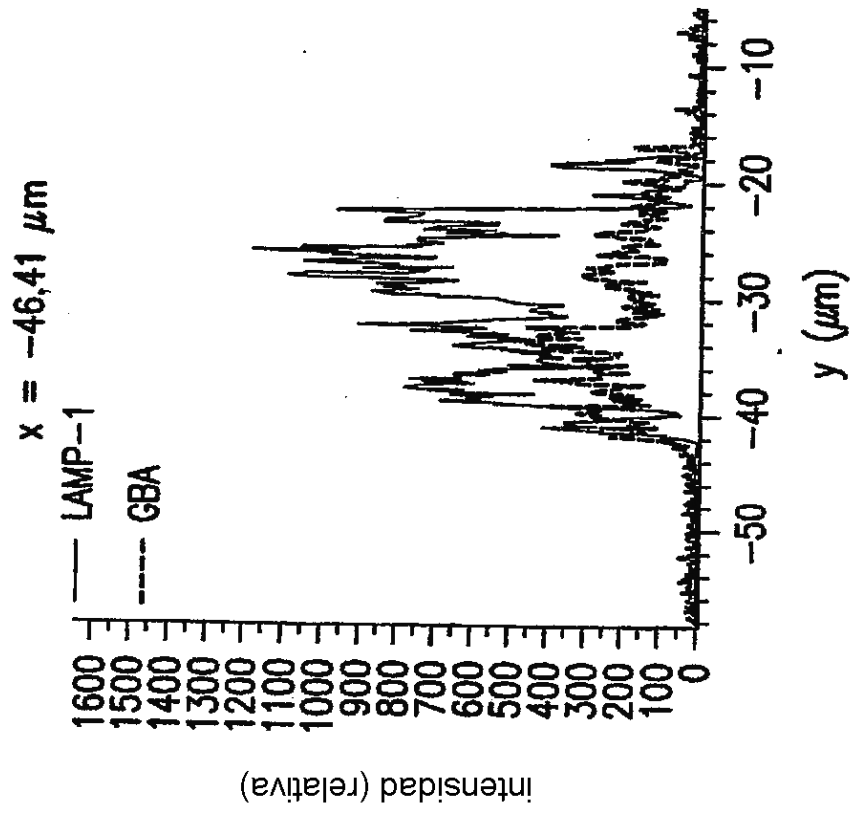


FIG.2F



FIG.2E

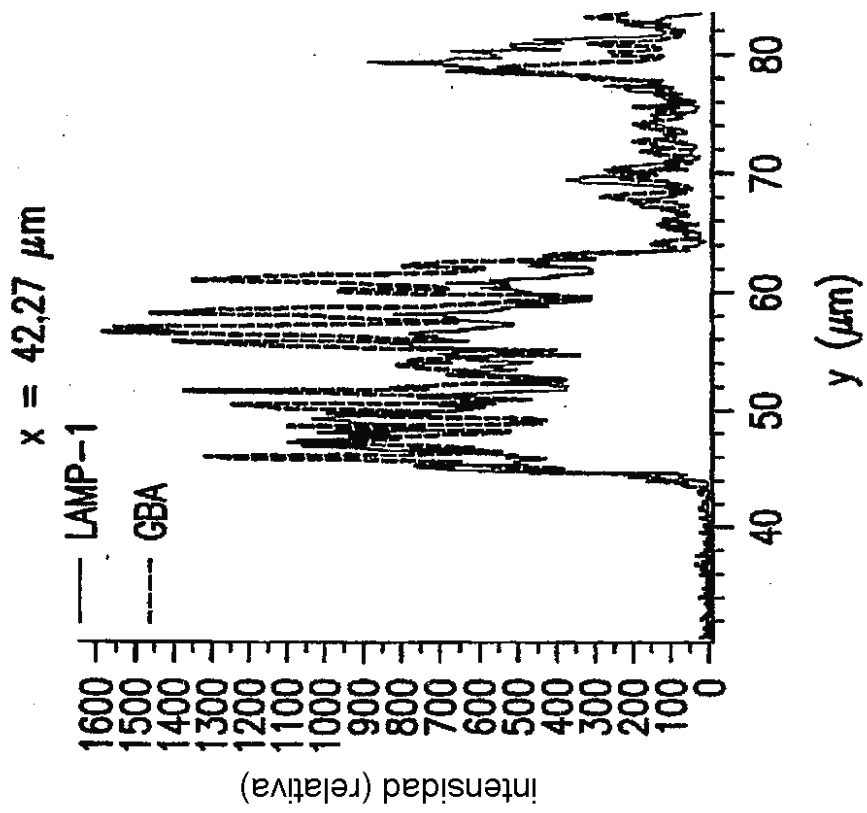


FIG.2H



FIG.2G

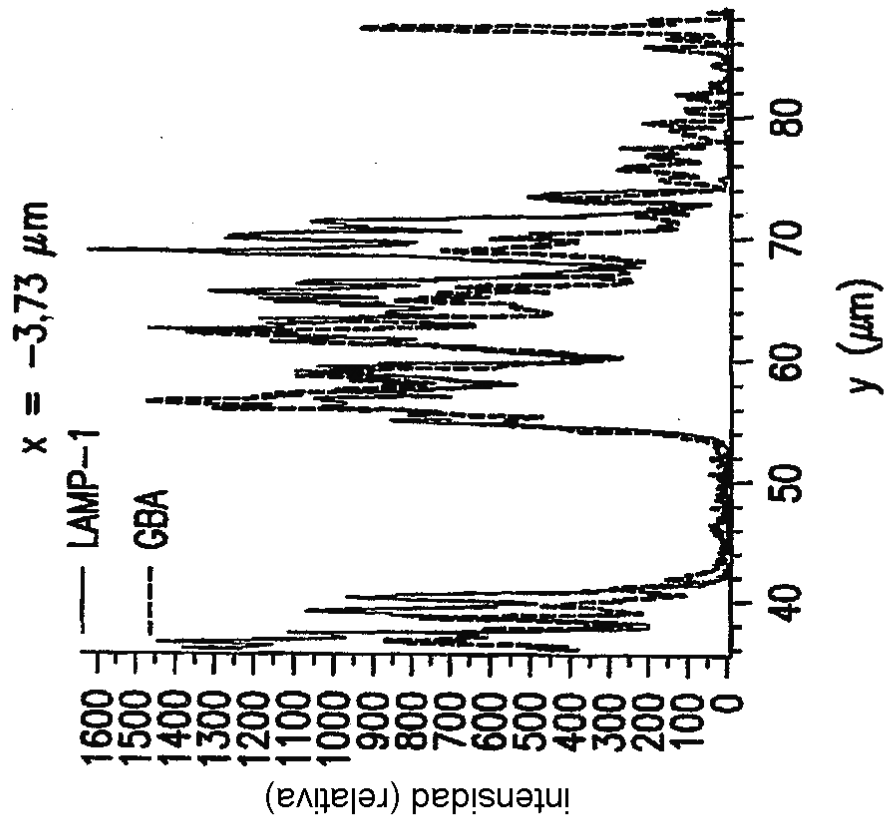


FIG.2J

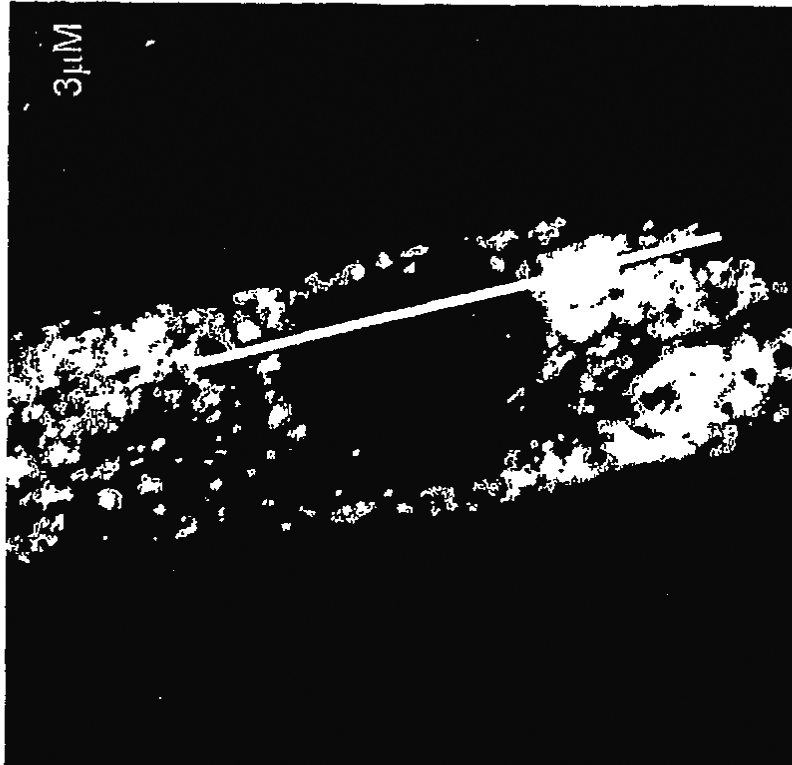


FIG.2I

control solamente de AB secundario

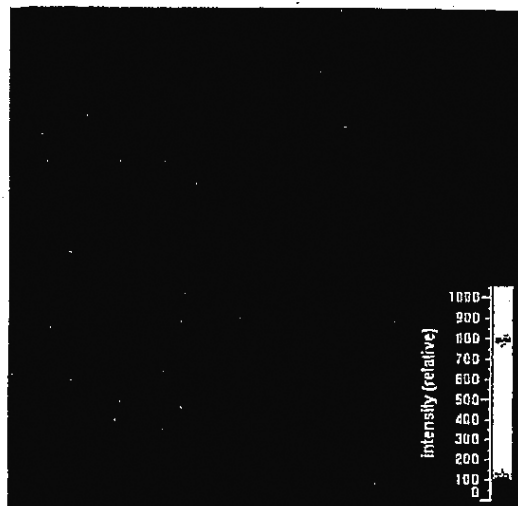


FIG.2K

intensidad (relativa)

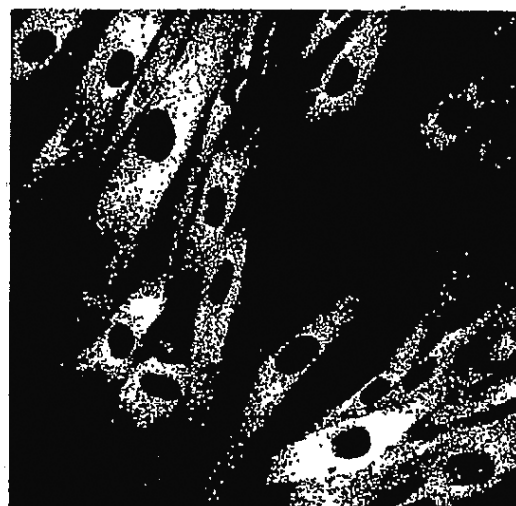


FIG.2L

30 μ M



FIG.2M

3 μ M

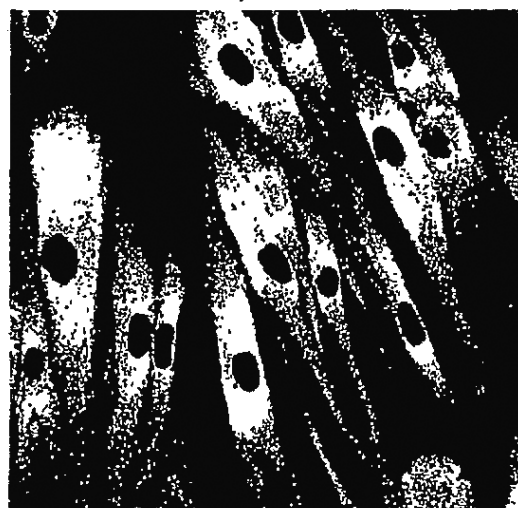


FIG.2N

anti-proteína
poliubiquitinada

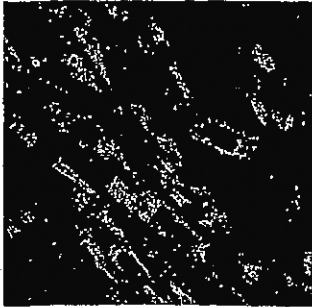


FIG.3A

Anti-GBA

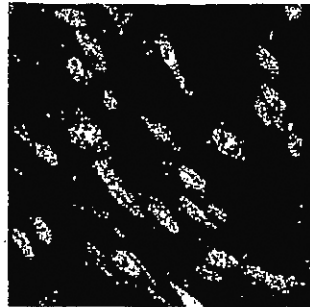


FIG.3B

superposición

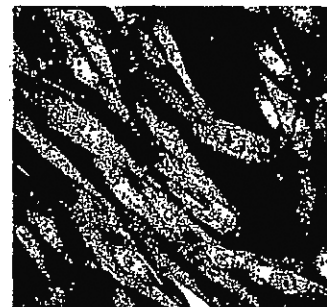


FIG.3C

anti-proteína
poliubiquitinada

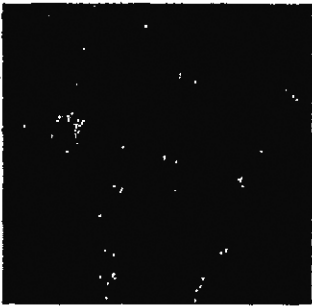


FIG.3D

Anti-GBA



FIG.3E

superposición



FIG.3F

anti-proteína
poliubiquitinada

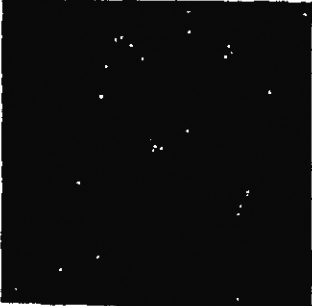


FIG.3G

Anti-GBA

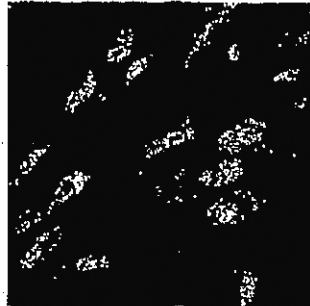


FIG.3H

superposición

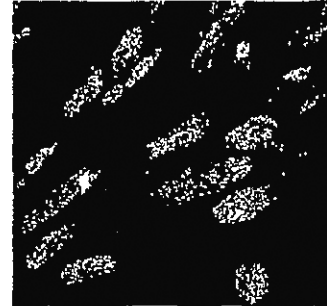


FIG.3I

SEC ID NO: 1 (ACCESO GENBANK J03059)

```

1  tctagaaaga cttcactgag atcattttaa gaacaaaaag gatggctggg gtccagcgca
61  gtggctcatg cctgtaatcc cagcactttc ggataccaag gcagcagatc acctgaggtc
121 cagagtttca gaccagcctg gccaacatag tgaaacccca tctctactaa aaataaaaaa
181 attagctgag catgttggag ggcacctgta atcccagcta cttgggaggc tgaggcagga
241 gaatcactcg aaccaggag gtggagggtg cagtgaagcca agatcacgcc actgcactcc
301 agcctgggca acagagttag actctgtctc aaaaaacaac aacaacaaaa aatacaaaaa
361 agagacaagt agttcccagg tgcctacca gtggtcaggc actgcactta cctcactgac
421 tgcagtaacc accctttgag gttgtggcat tgcctccatt ttccaggcaa ggaaatgggc
481 tgagagctgg gattagtcag gtcactgact tgtgtgccac tcccgtataa tctcatttga
541 tgtggttcat gaggccacac catggacagc ttctctcttg tgtccactga ggatatggct
601 ttgtacaaca ctttggtttt ttgaacgact ttacaaacct ccctgtcttg tgaggaagga
661 agaacagtta ttaccatctg catctgatga tgaaacaagg gacgtgcag aggagccgca
721 ctgaccactc cctccctcca gtcctgtcat cccactgcca gtgtcccacc ctcttggtcc
781 ctgcacttca ctggctaata acccccctca ctttttcctc tgtgaagcca tcctggataa
841 ttccccaccc acgaatgggc cctcctcatc tcagagagct ctccatgcac acctgttacc
901 gtttctgtct ttatctgtaa atatctgtgt gtctgacttc catgcctcac acacctctat
961 agggcaaaga ctgtctttaa catcttggtg gtgtcagtat tttgcacagt gaagtttttt
1021 tttttaaatt atatcagctt tatttgtacc tttttgacat ttctatcaaa aaagaagtgt
1081 gcctgctgtg gttcccatcc tctgggattt aggagcctct accccattct ccatgcaaatt
1141 ctgtgttcta ggctcttctt aaagtgtgca cccatacatg ccctccagag ttttataggg
1201 catataatcg taacagatga gaggaagcca attgcccttt agaaatatgg ctgtgattgc
1261 ctcaacttct gtgtcatgtg acgtccttag tcatcacatg acccatccac atcggaagc
1321 cggaattact tgcagggcta acctagtgcc tatagctaag gcaggtagct gcatccttgt
1381 ttttgttttag tggatcctct atccttcaga gactctggaa cccctgtggt cttctcttca
1441 tctaattgacc ctgaggggat ggagttttca agtccttcca gagaggtaag agagagagct
1501 cccaatcagc attgtcacag tgcttctgga atcctggcac tggaaattta tgaatgacag
1561 actctctttg aatccagggc catcatggct ctttgagcaa ggcacagatg gagggagggg
1621 tcgaagttag aatgggtggg aagagtgggt gggagcatcc tgatttgggg tgggcagaga
1681 gttgtcatca gaagggttgc agggagagct gcacccaggt ttctgtgggc cttgtcctaa
1741 tgaatgtggg agaccgggcc atgggcaccc aaaggcagct aagccctgcc caggagagta
1801 gttgaggggt ggagaggggc ttgcttttca gtcattcctc attctgtcct caggaatgtc
1861 ccaagccttt gagtagggta agcatcatgg ctggcagcct cacaggattg cttctacttc
1921 aggcagtgtc gtgggcatca ggtgagttag tcaaggcagt ggggaggtag cacagagcct
1981 cccttctgcc tcatagtcct ttggtagcct tccagtaagc tgggtgtaga cttttagtag
2041 gtgtcaata aatccttttg agtgactgag accaactttg gggtaggat tttgtttttt
2101 ttcttttgaa acagagtctt actctgttgc ctgggctgga gtgcagtggg gcaattttgg

```

```

2161 ctcatcccaa cctctgcctc ccagattcaa gcgattctct tgcttcagct tcccaggtag
2221 ctgggattac aggcggccac cactacgccc agctaatttt tgtattttta gtagagacgg
2281 ggtttcacca tgctggcaag gcaggctcga aactcctcac ctccaggtgat ccgcccacct
2341 cggcctccta aagtgtcagg attacagggtg tgagcccctg cggccggcca aggggtgagg
2401 aattttgaaa ccgtgttcag tctctcctag cagatgtgtc cattctccat gtcttcatca
2461 gacctcactc tgcttgactc cctccctcc cagggtgccc cccctgcata cctaaaagct
2521 tcggctacag ctccgtggtg tgtgtctgca atgccacata ctgtgactcc tttgaccccc
2581 cgacctttcc tgcccttggg accttcagcc gctatgagag tacacgcagt gggcgacgga
2641 tggagctgag tatggggccc atccaggcta atcacacggg cacaggtaac cattacaccc
2701 ctacccccct gggccaggct gggctcctct agaggtaaata ggtgtcagtg atcaccatgg
2761 agtttcccg cgggtactga tacccttatt ccctgtggat gtcctcaggc ctgctactga
2821 ccctgcagcc agaacagaag ttccagaaag tgaagggtatt tggagggggc atgacagatg
2881 ctgctgctct caacatcctt gccctgtcac cccctgccc aaatttgcta cttaaactcg
2941 acttctctga agaagggtgag gaggaagggg acaagatgac atagagccat tgaaactttt
3001 cgtttttctt ttcttttttt aaaatttttt tgaggcagaa tctcactctg cccattctgt
3061 cggcgagaca ggagtgcagt ggtgtgatct cccctcacag caacctctgc ctcccaggct
3121 atagtgatcc tcttgcctca gcctcctgag tagctggaat tataggcgtg cgccactacc
3181 acctggctaa tttttgtatt tttagtagag acagggtttc atcatgttga ccaggctagt
3241 cttaaactcc tgacctcaaa tgatatacct gccttggcct cccgaagtgc tgggaattaca
3301 agtgtgagcc accgagccca gcagacactt ttcttttttc tttttttttt tttgagacag
3361 agtctcgac tgacccag gctggagtgc agtggcaca tctcagctca ctgcaacctc
3421 cacctcccgg gttcagggtg ttctcctgtc tcagcctctc gaggacctgg gattacagg
3481 gcctgccacc acgcccggct aattttttgt attttttagt gagacagggt ttcactatgt
3541 tggccaggat gattgcgaac tctgacctc gtgatctgcc cacatcggcc tcccaaagt
3601 ctgggattac atgcgtgagc cactgacact ttcttttgcc ctttctttgg accctgactt
3661 ctgcccattc ctgacatttg gttcctgttt taatgccctg tgaaataaga tttcgccgcc
3721 tatcatctgc taactgctac ggactcaggc tcagaaaggc ctgcgcttca cccagggtgc
3781 agcctccaca ggttccaacc caggagccca agttcccttt ggccctgact cagacactat
3841 taggactggc aagtgataag cagagtccca tactctccta ttgactcgga ctaccatata
3901 ttgatcatcc ttttctgtag gaatcggata taacatcatc cgggtaccca tggccagctg
3961 tgacttctcc atccgcacct acacctatgc agacaccct gatgatttcc agttgcacaa
4021 ctccagcctc ccagaggaag ataccaagct caaggtaggc attctagctt tttcaggccc
4081 tgaggggcct gatgtctggg ggttgagaaa ctgtagggtg ggtctgcttg tacagacatt
4141 ttgtcccctg ctgttttgct ctgggggtgg gaggggtgg gctaattggct gaaccggatg
4201 cactggttgg gctagtatgt gttccaaactc tgggtgcttc tctcttact acctttgtct
4261 ctgataccc ctgattcacc gagccctgca gttggcccag cgtcccgttt cactccttgc
4321 cagcccctgg acatcaccca cttggctcaa gaccaatgga gcggtgaatg ggaaggggtc
4381 actcaagga cagcccggag acatctacca ccagacctgg gccagatact ttgtgaagta

```

FIG.4 (CONTINUACIÓN)

```

4441 agggatcagc aaggatgtgg gatcaggact ggcctcccat ttagccatgc tgatctgtgt
4501 cccaaccctc aacctagttc cacttccaga tctgcctgtc ctcagctcac ctttctacct
4561 tctgggcctt tcagccttgg gctgtcaat cttgccact ccatcaggct tcctgttctc
4621 tcggtctggc ccactttctt tttatttttc ttcttttttt tttttttgag aaggagtctc
4681 tctctctgtc acccaggctg gagtgtgtgt gcgccatctt cactcactgt aacctctgcc
4741 tcctgagttc aagcaattct cctgcctcag ccttccaagt agctgggatt ataggcgcct
4801 gccaccaggc ccagctgatt tttctatttt tagtagagac ggggtttcgc caggctgttc
4861 tcgaactcct gaactcaagt gatccacctg cctcggcttc ccaaagtgtc gggattacag
4921 gtgtgagcca ccacaccag ctggtctggg ccactttctt ggccggatca ttcattgacct
4981 ttctcttgcc aggttcctgg atgcctatgc tgagcacaag ttacagttct gggcagtgac
5041 agctgaaaat gagccttctg ctgggtgtgt gagtggatac cccttccagt gcctgggctt
5101 caccctgaa catcagcgag acttcattgc cctgaccta ggtcctaccc tcgccaacag
5161 tactcaccac aatgtccgcc tactcatgct ggatgaccaa cgcttgctgc tgccccactg
5221 ggcaaagggt gtaaggcctg gacctccatg gtgctccagt gaccttcaa tccagcatcc
5281 aaatgactgg ctcccaaact tagagcgatt tctctacca actatggatt cctagagcac
5341 cattcccctg gacctccagg gtgccatgga tcccacagtt gtcgcttgaa acctttctag
5401 gggctgggcg aggtggctca ctcatgcaaa cccagcactt tgggaagccg aggcgggtga
5461 tcacctgagg tcaggagttt aagaccaccc tggccaacgt gttgaaaccc tgtgtctact
5521 aaaatacaaa aaaaaaaaaat tatctgggca tgatggtggg tgtctgtaat ccagctact
5581 caggaggctg agaagggaga atcagttgaa cccgggagat ggtggttgcg gtgagccgag
5641 atcgcgccac tgcactccag cctgggaggc tgagcgagac tccatctcga aacaaaacaa
5701 aacaaaacta tctaggctgg ggggtggtgt tcatgtatgt atgtgtatat acatatatat
5761 gtgtttatat gtatatatat atacacacac acacatacat acacacacat acacacacaa
5821 attagctggg tgtggcaccc gtgtagtccc agctactcag gaggctaatt tgggaggatc
5881 agttgaccct aggaagtcaa ggctgcagtg agtcgtgatt gcgccactgt actccagccc
5941 gagtgcagaa gtgacatcct gtctcaaaaa caaaaaaaaa tctcccaaaa cctctctagt
6001 tgcattcttc ccgtcaccca actccaggat tcctacaaca ggaactagaa gttccagaag
6061 cctgtgtgca aggtccagga tcagttgtct ttcctttgca ggtactgaca gaccagaag
6121 cagctaaata tgttcatggc attgctgtac attggtacct ggactttctg gctccagcca
6181 aagccaccct aggggagaca caccgcctgt tccccaacac catgctcttt gcctcagagg
6241 cctgtgtggg ctccaagttc tgggagcaga gtgtgcggct aggtccttg gatcgagga
6301 tgcagtacag ccacagcatc atcacggtaa gccaccccag tctcccttcc tgcaaagcag
6361 acctcagacc tcttactagt ttcaccaaag actgacagaa gcccttcttg tccagctttc
6421 cccagctagc ctgccctttt gagcaactct ggggaaccat gattccctat cttccctttc
6481 cttcacaggt ctgcacacct cattgccctt tttgcaacta ctgaggcact tgcagctgcc
6541 tcagacttct cagctcccct tgagatgcct ggatcttcac accccaact ccttagctac
6601 taaggaatgt gccctcaca gggctgacct acccacagct gcctctcca catgtgacct
6661 ttacctacac tctctgggga ccccagtggt tgagcctttg tctctttgcc tttgtcctta

```

FIG.4 (CONTINUACIÓN)

6721 ccctagaacc tcctgtacca tgtggtcggc tggaccgact ggaaccttgc cctgaacccc
 6781 gaaggaggac ccaattgggt gcgtaacttt gtcgacagtc ccatcattgt agacatcacc
 6841 aaggacacgt tttaaaaca gcccatgttc taccaccttg gccacttcag gtgagtggag
 6901 ggcgggcacc cccattccat accaggccta tcatctccta catcggtatg cttacatcac
 6961 tctacaccac gagggagcag gaaggtgttc aggggtggaac ctcggaagag gcacacccat
 7021 ccccttttgc accatggagg caggaagtga ctaggtagca acagaaaacc ccaatgcctg
 7081 aggctggact gcgatgcaga aaagcagggt cagtgccag cagcatggct ccaggcctag
 7141 agagccaggg cagagcctct gcaggagtta tggggtgggt ccgtgggtgg gtgacttctt
 7201 agatgagggt ttcattggag gtaccccgag ggactctgac catctgttcc cacattcagc
 7261 aagttcattc ctgagggttc ccagagagtg gggctggtt ccagtcagaa gaacgacctg
 7321 gacgcagtgg cactgatgca tcccgatggc tctgctgttg tggctgtgct aaaccgggtga
 7381 gggcaatggg gaggtctggg aagtgggctg aagacagcgt tgggggcctt ggcaggatca
 7441 cactctcagc ttctcctccc tgctccctag ctctctaaag gatgtgcctc ttaccatcaa
 7501 ggatcctgct gtgggcttcc tggagacaat ctacactggc tactccattc acacctacct
 7561 gtggcgctgc cagtgtgga gcagatactc aaggaggcac tgggctcagc ctgggcatta
 7621 aagggacaga gtcagctcac acgtgtctg tgactaaaga gggcacagca gggccagtgt
 7681 gagcttacag cgacgtaagc ccaggggcaa tggtttgggt gactcacttt cccctctagg
 7741 tgggtgccagg ggctggaggc ccctagaaaa agatcagtaa gccccagtgt cccccagcc
 7801 cccatgctta tgtgaacatg cgctgtgtgc tgcttgcttt ggaaactggg cctgggtcca
 7861 ggcctagggt gagctcactg tccgtacaaa cacaagatca gggctgaggg taaggaaaag
 7921 aagagactag gaaagctggg cccaaaactg gagactgttt gtctttcctg gagatgcaga
 7981 actgggccccg tggagcagca gtgtcagcat caggggcgaa gccttaaagc agcagcggtg
 8041 gtgcccaggc acccagatga ttctatggc accagccagg aaaaatggca gctcttaaag
 8101 gagaaaatgt ttgagcccag tcagtgtgag tggctttatt ctgggtggca gcaccccggt
 8161 tccggctgta ccaacaacga ggaggcacgg gggcctcttg aatgcatgag agtagaaaaa
 8221 ccagtcttgg gagcgtgagg acaaatcatt cctcttcac ctcctcagcc atgcccaggg
 8281 tccgggtgcc tggggcccga gcaggcgttg cccgctggat ggagacaatg ccgctgagca
 8341 aggcgtagcc caccatggct gccagtcctg ccagcacaga taggatctgg ttccggcgcc
 8401 ggtatggctc ctctcagtc tctgggcctg ctggtgtctg gcgttgcggt ggtacctcag
 8461 ctgagggtca aggaaggaag gtgtgttagg agaactagtt cttggatccc tgcccactct
 8521 cccaggggt gccctccca tctgcccctt acctccatcc caggggaagt agagactgag
 8581 aatgtgggta caataggcac agaggttggt cagcccacgc aggtggacct gcagcttccc
 8641 actgggcagc ttgctctgca gcagcagggc caagtagctg aagacgaagg cgtccaagga
 8701 ggcagggtct gagcagagag agaaggggtg gatggaggag aaccactggg gtagaagggg
 8761 taaagatgga gctggaggaa gagtcagcct tgggaggtgg gctctgggca gcaaggcgcc
 8821 accaggaagg acaggacaca cagttctaga

FIG.4 (CONTINUACIÓN)

SEC ID NO: 2 (ACCESO GENBANK J03059)

MEFSSPSREECPKPLSRVSIMAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFGYSSVVCNATYCDSFDPPTFPA
TFSRYESTRSGRRMELSMGPIQANHTGTGLLLTLQPEQKFQKVGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLS
SEEGIGYNIIRVPMASCDFSIRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTS
WLKTNGAVNGKGSLLKGQPGDIYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEH
DFIARDLGPTLANSTHHNVRLMLDDQRLLLPWAKVVLTDPEAAKYVHGIHVHLYDFLAPAKATLGETHR
PNTMLFASEACVGSKFWEQSVRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPWVRNFVDSPII
ITKDTFYKQPMFYHLGHFSKFIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVVLRSSKDVPLTIKDPV
LETISPGYSIHTYLWRRQ

FIG.5

SEC ID NO: 3 (ACCESO GENBANK M16328)

```

1  cattaggcc tatgaattat aagatacagt cactttaaaa tccactggaa ggctgaagag
61  tgagttaaac ctcttataat gaatatacag tgaaccagat agaggcattt tatttagggg
121 tcctacaaga aagtgcctaa atagcatcga cgcctacatg ctacatcctg ttcagtctct
181 gcctctgtga tgcagttggc cagcaaatat cctccaagtc atcatttgca tagtgctagg
241 gataaaatga ggagcaatac caaatgctat acctgccctt atgggtctta tagtccaacg
301 ggagaaaaag atattataca aataatcacg gaaaataaat agaaaacgca tccttggttt
361 tgttttagtg atcctctatc cttcagagac tctggaaccc ctgtggtctt ctcttcatct
421 aatgaccctg aggggatgga gttttcaagt ccttcagag aggaatgtcc caagcctttg
481 agtagggtaa gcatcatggc tggcagcctc acaggtttgc ttctacttca ggcagtgtcg
541 tgggcatcag gtgcccggcc ctgcatccct aaaagcttcg gctacagctc ggtggtgtgt
601 gtctgcaatg ccacatactg tgactccttt gacccccga ctttctctgc cttggttacc
661 ttcagccgct atgagagtac acgcagtggg cgacggatgg agctgagtat ggggcccatc
721 caggctaate acacgggcac aggcctgcta ctgaccctgc agccagaaca gaagttccag
781 aaagtgaagg gatttgagg ggccatgaca gatgctgctg ctctcaacat ccttgccctg
841 tcacccctg cccaaaattt gctacttaaa tegtacttct ctgaagaagg aatcgatat
901 aacatcatcc gggtagccat ggccagctgt gacttctcca tccgcaccta cacctatgca
961 gacaccctg atgatttcca gttgcacaac ttcagcctcc cagaggaaga taccaagctc
1021 aagatacccc tgattcaccg agccctgcag ttggcccagc gtcccgtttc actccttgcc
1081 agcccctgga catcaccacac ttggctcaag accaatggag cggatgaatg gaaggggtca
1141 ctcaagggac agcccggaga catctaccac cagacctggg ccagatactt tgtgaagttc
1201 ctggatgcct atgctgagca caagttacag ttctgggcag tgacagctga aaatgagcct
1261 tctgctgggc tgttgagtgg atacccttc cagtgcctgg gcttaccacc tgaacatcag
1321 cgagacttca ttgcccgtga cctaggtcct accctcgcca acagtactca ccacaatgtc
1381 cgcctactca tgctggatga ccaacgcttg ctgctgcccc actgggcaaa ggtggtactg
1441 acagaccag aagcagctaa atatgttcat ggcattgctg tacattggta cctggacttt
1501 ctggctccag ccaaagccac ctagggggag acacaccgcc tgttcccaa caccatgctc
1561 titgcctcag aggcctgtgt gggctccaag ttctgggagc agagtgtgcg gctaggctcc
1621 tgggatcgag ggatgcagta cagccacagc atcatcacga acctcctgta ccatgtggtc
1681 ggctggaccg actggaacct tgccctgaac cccgaaggag gacccaattg ggtgcgtaac
1741 tttgtcgaca gtcccatcat tgtagacatc accaaggaca cgttttacaa acagcccatg
1801 ttctaccacc ttggccactt cagcaagttc attcctgagg gctcccagag agtggggctg
1861 gttgccagtc agaagaacga cctggacgca gtggcactga tgcattccga tggctctgct
1921 gttgtggctg tgctaaaccg ctctctaaag gatgtgcctc ttaccatcaa ggatcctgct
1981 gtgggcttcc tggagacaat ctacctggc tactccattc acacctacct gtggcatcgc
2041 cagtgatgga gcagatactc aaggaggcac tgggctcagc ctgggcatta aaggacaga

```

FIG.6

```

2101 gtcagctcac acgctgtctg tgactaaaga gggcacagca gggccagtgt gagcttacag
2161 cgacgtaagc ccaggggcaa tggtttgggt gactcacttt cccctctagg tgggtgccag
2221 ggctggaggc ccctagaaaa agatcagtaa gccccagtgt cccccagcc cccatgctta
2281 tgtgaacatg cgctgtgtgc tgcttgcttt ggaaactngc ctgggtccag gcctaggggtg
2341 agctcactgt ccgtacaaac acaagatcag ggctgagggt aaggaaaaga agagactagg
2401 aaagctgggc ccaaaactgg agactgtttg tctttcctag agatgcagaa ctgggcccgt
2461 ggagcagcag tgtcagcatc agggcggaag ctttaaagca gcagcgggtg tgcccaggca
2521 cccagatgat tcctatggca ccagccagga aaaatggcag ctcttaaagg agaaaatggt
2581 tgagccc

```

FIG.6 (CONTINUACIÓN)

SEC ID NO: 4 (ACCESO GENBANK M16328)

MAGSLTGLLLLQAVSWASGARPCIPKSFGYSSVVCVCNATYCDSFDPPTFPALGTFSRYESTRSGRRMELSMGP
IQANHGTGLLLLTLQPEQKFQKVKGFGGAMTDAAALNILALSPPAQNLLLKSYFSEEGIGYNIIRVPMASCDFS
IRTYTYADTPDDFQLHNFSLPEEDTKLKIPLIHRALQLAQRPVSLASPWTSPTWLKTNGAVNGKGSLLKGQPGD
IYHQTWARYFVKFLDAYAEHKLQFWAVTAENEPSAGLLSGYPFQCLGFTPEHQDFIARDLGPTLANSTHHNVR
LLMLDDQRLLLPHWAKVVLTDPEAAKYVHGIAVHWYLDLAPAKATLGETHRLFNTMLFASEACVGSKFWEQS
VRLGSWDRGMQYSHSIITNLLYHVVGWTDWNLALNPEGGPNNVRNFVDSPIIVDITKDTFYKQPMFYHLGHFSK
FIPEGSQRVGLVASQKNDLDAVALMHPDGSVVVVLNRSSKDVPLTIKDPVGFLETISPGYSIHTYLWHRQ

FIG.7