

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 504**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

A61F 2/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2010** **E 10825421 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015** **EP 2490712**

54 Título: **Método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer utilizando chaperonas farmacológicas para aumentar la actividad de gangliosidasas**

30 Prioridad:

19.10.2009 US 252799 P

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

28.10.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WUSTMAN, BRANDON;
VALENZANO, KENNETH y
BOYD, ROBERT

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 549 504 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer utilizando chaperonas farmacológicas para aumentar la actividad de gangliosidasas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 La presente invención se refiere a una chaperona farmacológica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer aumentando la actividad de enzimas gangliosidasas implicadas en el catabolismo de gangliósidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La enfermedad de Alzheimer es una de las mayores cargas de salud socio-económicas. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por demencia progresiva e histopatológicamente por la presencia de ovillos neurofibrilares (NFTs) y placas neuríticas (seniles). Las placas consisten en una proteína denominada amiloide (A β) y los ovillos están formados por una proteína denominada Tau.

- 15 Placas amiloides y NFTs son ambas distintivos de la enfermedad de Alzheimer. Las mutaciones en la APP y presenilina conducen a formas de brote temprano de la enfermedad de Alzheimer, que apoyan la hipótesis de que el procesamiento de la APP también puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la AD (enfermedad de Alzheimer) esporádica. Además de ello, la "hipótesis amiloide" predice que la acumulación de A β en alguna forma tóxica es perjudicial para el cerebro. APP puede ser procesada por las vías de α - y β -secretasa. Hasta la fecha, la mayoría de los esfuerzos de investigación para desarrollar terapias de AD que retarden el progreso de la enfermedad se centran en la inhibición de la γ -secretasa y la β -secretasa y el metabolismo de APP para formar péptido A β o la activación del procesamiento de α -secretasa para aumentar la producción del péptido sAPP α neuroprotector al tiempo que reduce la producción de A β . El desarrollo de inhibidores específicos para la β -secretasa ha sido difícil, en parte debido a que parece que existe una relación no lineal entre la disminución de la actividad de β -secretasa *in vivo*, y una reducción de los péptidos A β en el cerebro. Una dificultad adicional es la baja penetración en el cerebro de la mayoría de los inhibidores. Inhibidores de γ -secretasa han estado plagados, además, de graves efectos secundarios GI (gastrointestinales) asociados con la inhibición de Notch, ya que la γ -secretasa procesa numerosos otros sustratos además de la APP, incluido el receptor Notch. Además, se ha demostrado que una deficiencia de la actividad de γ -secretasa provoca la neurodegeneración y puede asociarse con el brote temprano autosómico-dominante de la enfermedad de Alzheimer provocada por la mutación en presenilina 1 (un componente del complejo de γ -secretasa que contiene el sitio activo del complejo de γ -secretasa).

- 30 La mayoría de los esfuerzos destinados a tratar la enfermedad de Alzheimer (AD) se han centrado en reducir los síntomas de la AD. En particular, la identificación de una menor concentración de colina acetiltransferasa en neuronas afectadas de los prosencéfalos de pacientes con AD ha conducido a tratamientos dirigidos a inhibir la hidrólisis de la acetilcolina en la hendidura sináptica y a prolongar el nivel de acetilcolina en la sinapsis. Aunque esta estrategia ha dado como resultado al menos una corrección parcial de los niveles de neurotransmisores, los beneficios terapéuticos han sido pequeños.

- 35 Además, la AD se clasifica como una tauopatía. Tauopatías son provocadas por una hiperfosforilación anormal de tau fomentando su agregación y formación de ovillos neurofibrilares (NFTs). Dado que las mutaciones en tau y la APP provocan demencia, uno o ambos pueden contribuir a la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Se entiende bien que las mutaciones que conducen a un procesamiento alterado de la APP provocan la AD. Actualmente, no existen terapias aprobadas para ralentizar el progreso de la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de tratamientos de la AD más beneficiosos. Aunque la mayoría de las terapias en desarrollo se centran en la alteración del metabolismo de la APP (p. ej., inhibición de β -secretasa y γ -secretasa) o el bloqueo de la agregación de tau, la presente invención proporciona un tratamiento que utiliza chaperonas farmacológicas que se unen a una o más gangliosidasas y/o sialidasas y, con ello, aumentan la producción de sAPP α y reducen la producción de A β y tau hiperfosforilada.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

- 45 La presente invención se refiere a chaperonas para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde la chaperona farmacológica se une selectivamente a y estabiliza una gangliosidasa seleccionada del grupo que consiste en β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B y β -hexosaminidasa S.

- 50 De acuerdo con una realización, se proporciona a chaperonas para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde la chaperona farmacológica se une selectivamente a y estabiliza una gangliosidasa

seleccionada del grupo que consiste en β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B y β -hexosaminidasa S; y en donde la chaperona farmacológica se selecciona de:

- N-butil-desoxigalactonojirimicina (NB-DGJ)
- N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT)
- 5 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ)
- 2-acetamido-2-desoxinojirimicina (ADNJ)
- 6-acetamido-6-desoxicastanospermina
- Pirimetamina
- 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol (LABNAc)
- 10 N-bencil 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol (NBn-LABNAc)
- N-butil 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol (NBu-LABNAc)
- DABNAc
- hidrocloruro de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-acetamido-3,4-dihidroxi-5-hidroxi-metil-piperidinio; (GalNAc-isofagomina HCl)
- 15 Galactosa O-(2-acetamido-2-desoxi-d-glucopiranosilideno)-amino-N-fenilcarbamato; (Gal-PUGNAc)
- NAG-tiazolina (y sus derivados)
- PUGNAc (y sus derivados)
- 6-acetamido-2,6-didesoxi-2-C-hidroximetil-D-glucó- δ -lactama
- 20 2-acetamido-2-desoxi-d-glucono-d-lactama
- 2-acetamido-2-desoxi-d-glucono-desocinojirimicina
- derivados del ácido 3-hidroxipípecólico
- derivados de ácido 3,4,5-trihidroxipípecólico
- (3R,4R,5R,6R)-tetrahidroxiazepano
- 25 NAc-1-Cp
- NAc-1-(CH₃)₂
- (5R,6S,7S,8S)-8-acetamido-5,6,7,8-tetrahidro-5-(hidroximetil)-imidazol[1,2-a]piridina-6,7-triol
- 2-acetamido-1,2,5-tridesoxi-1,5-imino-D-glucitol
- 30 (2R,3R,4S,5R)-2-acetamido-5-aminometil-3,4-dihidroxi-piperidina
- (2R,3R,4S,5R)-2-acetamido-5-hidroximetil-3,4-dihidroxi-piperidina.

En una realización, la chaperona farmacológica es 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina o una sal, disolvente o profármaco de la misma farmacéuticamente aceptable.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La FIG. 1 muestra un esquema para el procesamiento de la APP.

La FIG. 2 muestra evidencia del metabolismo de la APP alterado y la fosforilación de tau en los cerebros de ratones deficientes en la actividad de β -hexosaminidasa.

La FIG. 3 muestra que fibroblastos derivados de pacientes de la enfermedad de Sandhoff secretan más sAPP β y A β y menos aAPP α en comparación con fibroblastos control y exhiben una hiperfosforilación de tau.

40 La FIG. 4 muestra el incremento en los niveles de β -hexosaminidasa de tipo salvaje endógena y la diseminación de sAPP α en neuroblastomas N2A de ratón tratados con las chaperonas farmacológicas NGT y AdDNJ

La FIG. 5 muestra los efectos de la dosis y de lavado sobre la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje endógena en los cerebros de ratones C57BL6 tratados con la chaperona farmacológica NGT y los niveles de fármacos correspondientes en el cerebro y plasma.

45 La FIG. 6 muestra una evolución en el tiempo de los efectos de la chaperona farmacológica NGT sobre niveles endógenos de tipo salvaje de la actividad de β -hexosaminidasa y niveles de sAPP α en los cerebros de ratones C57BL6.

La FIG. 7 muestra la mejora de los niveles de neuraminidasa 1 en fibroblastos debido a la chaperona farmacológica NB-DANA.

50 La FIG. 8 muestra el incremento en los niveles de neuraminidasa 3 en neuroblastomas SHSY-5Y debido a la chaperona farmacológica Zanamivir.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A β es un péptido de 38 a 43 aminoácidos hidrófobo, que se encuentra en todos los fluidos biológicos y que se deriva de la escisión enzimática de una proteína de membrana de tipo I más grande, la proteína precursora de amiloide (APP). Véase la Figura 1, que representa el procesamiento de la APP. Estudios de asociación de pacientes con la

AD familiares identificaron un cierto número de mutaciones en dos genes, APP y presenilina, asociadas con el metabolismo aberrante de APP y una producción incrementada de la agregación de formas de A β . Se piensa que A β forma oligómeros tóxicos que pueden desempeñar un papel importante en la patología de la enfermedad de Alzheimer (Shankar et al., 2008).

Los gangliósidos fomentan la generación de formas neurotóxicas de A β en el cerebro (es decir, oligómeros). Los gangliósidos son glucoesfingolípidos que contienen ácido siálico que se encuentran en la cara exterior de las membranas celulares, y son particularmente abundantes en la superficie celular de las neuronas. Se sabe que los gangliósidos existen en racimos y que forman microdominios en la superficie de la membrana plasmática. Esta localización específica de los gangliósidos les permite interactuar con una diversidad de bioefectores, incluyendo glicoproteínas, hormonas peptídicas y factores de crecimiento. Además, los gangliósidos (p. ej., el gangliósido GM1) puede fomentar la diferenciación celular, evitar la pérdida de la neurogénesis y desempeñar un papel neuroprotector en modelos *in vitro* e *in vivo* de lesión neuronal.

Los gangliósidos son más abundantes en el sistema nervioso y están implicados en una diversidad de funciones, incluyendo la mediación de la transducción de señales, la adhesión celular y la diferenciación celular. Mientras que más de 200 gangliósidos han sido identificados, la mayoría de los gangliósidos en las neuronas son catabolizados por una o más gangliosidasas y/o sialidasas.

Los productos de la actividad de α -secretasa, APP α soluble (sAPP α) y la actividad de β -secretasa, APP β soluble (sAPP β), se diferencian por la inclusión en sAPP α de los primeros 16 residuos de A β . Dado que la escisión de APP por parte de α -secretasa divide el dominio A β , ninguno de los productos de la reacción puede dar lugar a amiloide. Por lo tanto, se plantea la hipótesis de que la activación de la regulación positiva de la actividad de α -secretasa previene o reduce la formación de oligómeros A β tóxicos y placas amiloides, al tiempo que aumenta la diseminación de sAPP α neurotrófica y neuroprotectora. Curiosamente, la inhibición de la síntesis de glucoesfingolípidos y gangliósidos ha demostrado activar la diseminación de sAPP α (Sawamura et al, 2004).

Mutaciones en la APP también provocan la enfermedad de Alzheimer familiar y/o la angiopatía amiloide cerebral (CAA). Los gangliósidos GM2, GM3 y GD3 pueden modular la deposición regional de A β , ya que se expresan de una manera específica para la zona en el cerebro. (Yamamoto et al., 2006) han demostrado que el ensamblaje de A β s de tipo holandés y de tipo italiano de variante hereditaria, y A β de tipo flamenco fue acelerado por el gangliósido GM3 y el gangliósido GD3, respectivamente. De manera notable, las células de la musculatura lisa cerebrovascular, que componen la pared del vaso cerebral en donde se depositan los A β s de tipo holandés y de tipo italiano, expresan exclusivamente GM2 y GM3 (Yamamoto et al., 2006). Por lo tanto, el ensamblaje de variantes hereditarias A β puede acelerarse por factores medioambientales locales tales como la presencia de gangliósidos particulares en el cerebro.

La invención se dirige a chaperonas farmacológicas para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde la chaperona farmacológica se une a una enzima gangliosidasa asociada con la enfermedad de Alzheimer o asociada con los distintivos de la enfermedad de Alzheimer o cualquier enfermedad asociada con la acumulación de la proteína tau. La gangliosidasa es β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B o β -hexosaminidasa S.

En otra realización, la chaperona farmacológica aumenta el tráfico de la gangliosidasa desde el retículo endoplásmico (ER) a la ubicación final de las enzimas en una célula en donde realiza su función enzimática. En el caso de β -hexosaminidasa A y β -hexosaminidasa B, las chaperonas farmacológicas aumentan el tráfico de las enzimas desde el ER al lisosoma. La chaperona farmacológica puede aumentar la actividad de gangliosidasa mutante y/o de tipo salvaje. Además, la gangliosidasa puede catabolizar uno o más gangliósidos. La actividad de la enzima se puede aumentar hasta en un 5%. La actividad de la enzima también se puede aumentar hasta en un 10%, 20%, 40%, más del 50%, casi el 100% o incluso más del 100%.

En un aspecto de la invención, la chaperona farmacológica es N-tiazolina acetilglucosamina (NGT). En otro aspecto la chaperona farmacológica es N-butil-desoxigalactonojirimicina (NB-DGJ). En otro aspecto la chaperona farmacológica es 2-acetamido-2-desoxinojirimicina (AdDNJ).

En un aspecto de la invención, la chaperona farmacológica NB-DGJ también funciona para reducir la síntesis de gangliósidos mediante la inhibición de la glucosilceramida sintasa, la enzima que cataliza la primera etapa en la

síntesis de glucoesfingolípidos y gangliósidos. NB-DGJ es una chaperona farmacológica que también puede funcionar como un SRT. Otras chaperonas farmacológicas también tienen esta doble función.

- 5 En otro aspecto de la invención, una chaperona farmacológica puede combinarse con N-butildesoxinojirimicina (NB-DNJ), un inhibidor de glucosilceramida sintasa. La chaperona farmacológica y NB-DNJ se pueden dosificar simultáneamente al día, una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro días a la semana, cinco días a la semana o incluso menos o con más frecuencia, o según sea necesario. Una o más chaperonas farmacológicas y NB-DNJ también se pueden dosificar por separado o al mismo tiempo y cada una se puede dosificar una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana o cuatro o más veces por semana, o según sea necesario.
- 10 Muchas chaperonas farmacológicas diferentes se pueden utilizar para tratar la enfermedad de Alzheimer, incluyendo, pero no limitadas a, las enumeradas en la Tabla 1. Chaperonas farmacológicas adicionales que aumentan la actividad de una o más enzimas gangliosidasa o sialidasa se pueden encontrar en Tropak et al., The Journal of Biol. Chem. 279 (14), 13478-13487 (2.004), así como las estructuras químicas de muchos de los compuestos enumerados en las Tablas 1 y 2.

- 15 Tabla 1:

Enzima Diana	Chaperona Farmacológica
Beta-Hexosaminidasa A y B:	N-acetil-glucosamina-tiazolina; (NGT)
	2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ)
	2-acetamido-2-desoxinojirimicina (ADNJ)
	6-acetamido-6-desoxicastanospermina
	Pirimetamina
	Inhibidores identificados median te rastreo HTS en Chemistry & Biology 2007 14, 153-164
	2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol; (LABNAc)
	N-bencil-2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol; (NBn-LABNAc)
	N-butyl-2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol; (NBu-LABNAc)
	DABNAc
	Hidrocloreuro de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-acetamido-3,4-dihidroxi-5-hidroxi-metil-piperidinio; (GalNAc-isofagomina HCl)
	Galactosa O-(2-acetamido-2-desoxi-d-glucopiranosilideno)-amino-N-fenilcarbamato; (Gal-PUGNAc)
	Derivados de Gal-PUGNAc según se describe para PUGNAc
	NAG-tiazolina (y sus derivados)
	PUGNAc (y sus derivados)
	6-acetamido-2,6-didesoxi-2-C-hidroximetil-D-gluco-δ-lactama
	Derivado 5 de 1-N-amino-2-acetamidometilo
	2-acetamido-2-desoxi-d-glucoso-d-lactama
	2-acetamido-2-desoxi-d-glucono-desoxinojirimicina
	Derivados del ácido 3-hidroxipípecólico
	Derivados del ácido 3,4,5-trihidroxipípecólico
	Imidazopiridinas 14 y 15
	(3R,4R,5R,6R)-tetrahidroxiazepano
	NAc-1-Cp
	Nac-1-(CH ₃) ₂
	(5R,6S,7S,8S)-8-acetamido-5,6,7,8-tetrahidro-5-(hidroximetil)-imidazol[1,2-a]piridina -6,7-triol
	2-acetamido-1,2,5-tridesoxi-1,5-imino-D-glucitol
	(2R,3R,4S,5R)-2-acetamido-5-aminometil-3,4-dihidroxi-piperidina
	(2R,3R,4S,5R)-2-acetamido-5-hidroximetil-3,4-dihidroxi-piperidina

- 20 De acuerdo con la presente invención, los individuos a tratar pueden tener cualquier forma de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el brote temprano de la enfermedad de Alzheimer familiar. El individuo puede tener un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer o puede estar en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. El individuo ya puede haber sido diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer. Además, la persona puede no haber

sido diagnosticada, pero muestra distintivos de la enfermedad. El individuo puede tener o puede estar en riesgo de desarrollar parálisis supranuclear progresiva, degeneraciones córtico-basales y/o degeneración lobar frontotemporal (enfermedad de Pick). En una realización adicional, la enfermedad de Alzheimer es provocada por o está ligada al síndrome de Down.

Además, el tratamiento reivindicado puede incluir combinaciones de una o más chaperonas farmacológicas y también se puede combinar con otros tratamientos conocidos del Alzheimer o alguna afección relacionada con o resultante de la agregación patológica de la proteína tau. El tratamiento también puede incluir combinaciones de una, dos, tres o más chaperonas farmacológicas o una combinación de una, dos, tres o más chaperonas con uno o más inhibidores de glucosilceramida sintasa. Las terapias de combinación que incluyen una o más chaperonas con uno o más inhibidores de la glucosilceramida sintasa y puede aumentar la actividad de gangliósido y disminuir la actividad de glucosilceramida sintasa. El tratamiento también puede incluir combinaciones de una, dos, tres o más chaperonas farmacológicas con uno o más inhibidores de O-GlcNAcase (OGA). Ejemplos de combinaciones de chaperonas farmacológicas pueden incluir, por ejemplo:

NGT, zanamivir
AdDNJ, zanamivir

Ejemplos de combinaciones de chaperona farmacológica y la terapia de reemplazo del sustrato (SRT) pueden incluir, por ejemplo:

NGT, NB-DNJ
NGT, NB-DGJ
NGT, zanamivir, NB-DGJ
NGT, zanamivir, NB-DNJ
NB-DNJ, zanamivir
NB-DGJ, zanamivir
AdDNJ, NB-DNJ
AdDNJ, NB-DGJ
AdDNJ, zanamivir, NB-DNJ
AdDNJ, zanamivir, NB-DGJ

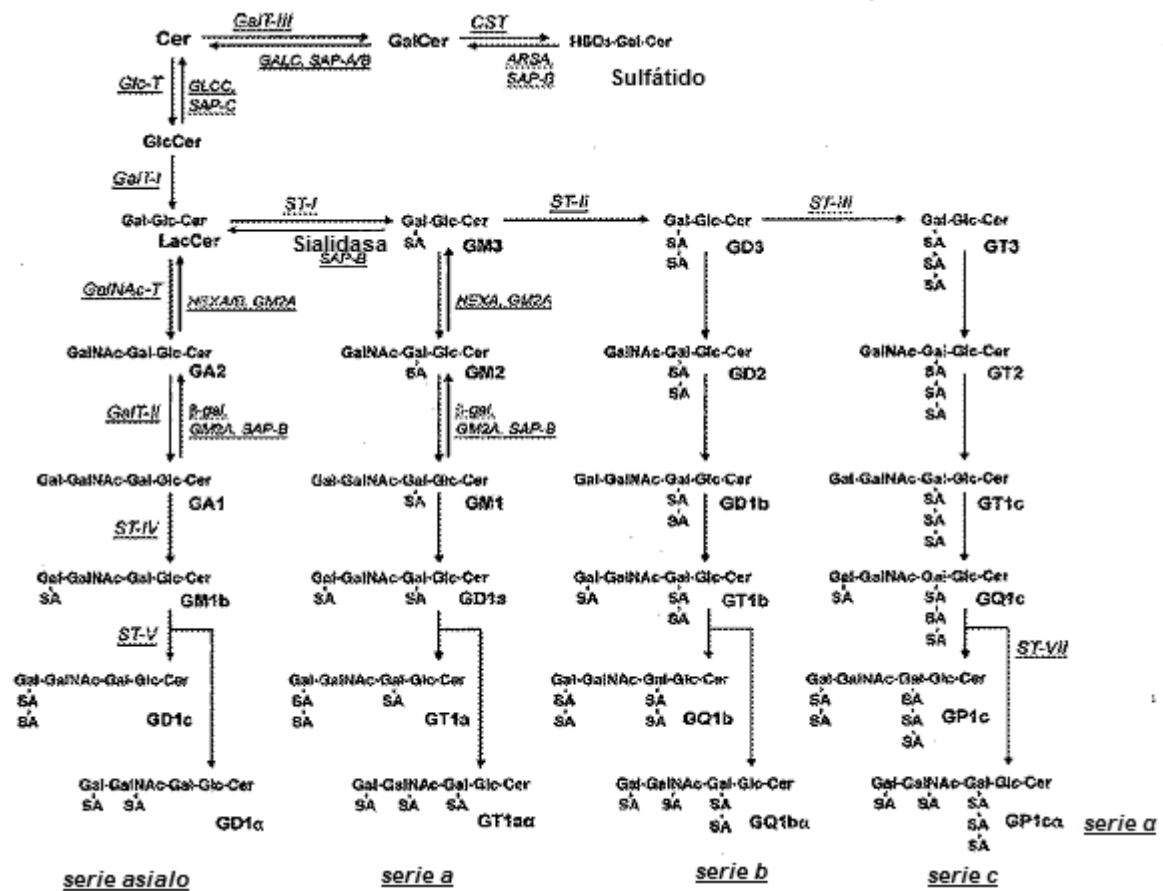
NGT es una de las chaperonas farmacológicas enumerados en la Tabla 1. NGT aumenta la actividad de β -hexosaminidasa mutante en células derivadas de pacientes y la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje endógena en ratones C57BL6. NGT tiene buenas propiedades de PK *in vivo*, incluyendo la penetración de la barrera hematoencefálica, es selectivo para β -hexosaminidasa y se tolera bien. NGT es estable, soluble en agua y tiene una buena biodisponibilidad oral. Aumenta selectivamente los niveles de la actividad de β -hexosaminidasa tipo salvaje en los cerebros de ratones C57BL6 y aumenta los niveles de sAPP α neurotrófico (Figuras 5 y 6).

Ácido n-butil-2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico es también una chaperona farmacológica enumerada en la Tabla 1. El ácido n-butil-2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico aumenta selectivamente la actividad de neuraminidasa de tipo salvaje 1 en los fibroblastos derivados de controles sanos (Figura 7).

Estudios han demostrado que ratones deficientes en β -hexosaminidasa tienen depósitos de tipo amiloide y una inmunorreactividad de pThr231-Tau. Estudios *in vitro* han demostrado que los gangliósidos purificados pueden inducir una oligomerización de A β y formación de fibrillas. Ratones *GLB1* KO acumulan gangliósidos GM1 y GA1 en todo el cerebro. Sango, *et al.*, Nat. Genet. 11(2):170-176 (1995). Mientras que los ratones *HEXB* KO acumulan gangliósidos GM2 y GA2 en las neuronas en todo el cerebro y la médula espinal. Hahn, *et al.*, Hum. Mol. Genet. 6(2): 205-211 (1997). Análisis IHC preliminares del cerebro y la médula espinal de ratones *HEXB* KO de 4 meses de edad reveló la presencia de depósitos que inmunorreaccionaban con A β anti-roedores. No se observaron depósitos A β inmunorreactivos de este tipo en los cerebros y médulas espinales de los ratones control de tipo salvaje de la misma edad.

NGT puede aumentar la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje endógena en cultivo celular y en los cerebros de los ratones C57BL6. La enzima β -hexosaminidasa es una de varias enzimas requeridas para el catabolismo de los gangliósidos, y su deficiencia provoca un trastorno del almacenamiento conocida como enfermedad de Sandhoff. Un modelo de ratón para la enfermedad de Sandhoff (*HEXB* KO) que acumula gangliósidos GA2 y GM2 en las neuronas en todo el cerebro también acumula inmunorreactividad de pThr231-tau (un componente principal de NFTs), y los depósitos que son inmunorreactivos con anticuerpos contra epítomos A β murinos, acumulación de pThr231-tau y secreción incrementada de sAPP β y A β 40 en los fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Sandhoff, indican que los defectos en la actividad de β -hexosaminidasa pueden conducir a alteraciones en el procesamiento de APP, tanto *in vivo* como *in vitro*.

La estructura y el metabolismo de los gangliósidos en el cerebro se pueden encontrar en Ariga, *et al.* ASBMB de 2008, 49:1157-1175.



Definiciones

Los términos y expresiones utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico donde se utiliza cada uno de los términos y expresiones. Determinados términos y expresiones se discuten más adelante, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una orientación adicional para el practicante en la descripción de la invención y cómo hacer y utilizar la invención.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "chaperona farmacológica" o, a veces "chaperona farmacológica específica" ("SPC"), se refiere a una molécula que se une específicamente a una o más gangliosidasas y/o sialidasas, o glucocerebrosidasa, y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) potencia la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) potencia el tráfico adecuado de la proteína del ER u otra ubicación celular, preferiblemente una ubicación celular nativa, es decir, la prevención de la degradación asociada al ER de la proteína; (iii) previene la agregación de proteínas conformacionalmente inestables, es decir, las proteínas erróneamente plegadas; (iv) restaurar o potenciar la función de tipo salvaje al menos parcial, la estabilidad y/o la actividad de la proteína; y/o (v) mejorar el fenotipo o función de la célula. Por lo tanto, una chaperona farmacológica para gangliosidasas o sialidasas es una molécula que se une a una o más gangliosidasas y/o sialidasas, dando como resultado el plegamiento apropiado, el tráfico, la no agregación y la actividad incrementada de la gangliosidasa y/o sialidasa. Incluye moléculas específicas de unión, p. ej., chaperonas específicas para el sitio activo, inhibidores, aglutinantes alostéricos, aglutinantes del sitio no activo que potencian la estabilidad de la proteína. Una chaperona farmacológica para la glucocerebrosidasa tendrá el mismo efecto.

La expresión "chaperonas farmacológicas" (PC) se refiere a moléculas pequeñas que se unen selectivamente y estabilizan proteínas diana para facilitar un plegamiento adecuado, reducen la degradación prematura y aumentan la eficiencia de la exportación del ER. Las moléculas pequeñas se denominan "chaperonas" porque ayudan a que las proteínas pasen de donde se sintetizan (el ER) a su ubicación prevista (p. ej., el lisosoma o la superficie de la célula). Las moléculas son aglutinantes reversibles que unen y estabilizan la diana proteína, ayudan a restablecer el tráfico adecuado y luego se disocian, por lo que la proteína puede llevar a cabo su función adecuada. El modificador

"farmacológico" designa la especificidad molecular: las moléculas están diseñadas para interactuar con y estabilizar sólo una única diana proteína pretendida, y las PCs generalmente no afectan a múltiples proteínas o a los procesos celulares tales como el tráfico de proteínas, el control de calidad del ER, la función del proteasoma o la actividad de chaperonas biológicas (tales como las proteínas de choque térmico). Este enfoque es ampliamente aplicable a enfermedades en las que se predice el aumento de la función de una proteína específica (mutante o de tipo salvaje) para proporcionar un beneficio terapéutico.

La retención y degradación prematura de las proteínas plegadas incorrectamente no se limita a las proteínas mutantes. Se ha demostrado que una fracción grande (de hasta 30%) de todas las proteínas recién sintetizadas está destinada a la degradación prematura por parte de los proteasomas. Estudios posteriores han demostrado que las chaperonas farmacológicas pueden aumentar los niveles celulares de muchas proteínas de tipo salvaje fomentando el plegamiento de proteínas, la estabilidad y la exportación del ER.

Chaperonas Moleculares Estabilizan la Conformación de Proteínas. En el cuerpo humano, las proteínas están implicadas en casi todos los aspectos de la función celular. Determinadas enfermedades humanas son el resultado de mutaciones que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína que reducen su estabilidad y puede prevenir que se pliegue correctamente. La mayoría de las mutaciones genéticas que conducen a la producción de las proteínas menos estables o erróneamente plegadas se denominan mutaciones de sentido erróneo. Estas mutaciones dan como resultado la sustitución de un solo aminoácido por otro en la proteína. Debido a este error, las mutaciones de sentido erróneo resultan a menudo en proteínas que tienen un nivel reducido de actividad biológica. Además de las mutaciones de sentido erróneo, existen también otros tipos de mutaciones que pueden resultar en proteínas con actividad biológica reducida.

Las proteínas generalmente se pliegan en una región específica de la célula conocida como el retículo endoplásmico, o ER. La célula tiene mecanismos de control de calidad que aseguran que las proteínas se plieguen en su forma tridimensional correcta antes de que puedan pasar del ER al destino apropiado en la célula, un proceso conocido generalmente como tráfico de proteínas. Proteínas erróneamente plegadas y/o proteínas inestables son eliminadas a menudo por los mecanismos de control de calidad después de haber sido inicialmente retenidas en el ER. En determinados casos, las proteínas erróneamente plegadas pueden acumularse en el ER antes de ser eliminadas.

La retención de proteínas erróneamente plegadas en el ER interrumpe su tráfico apropiado, y la actividad biológica reducida resultante puede conducir a una función celular alterada y, en última instancia, a una enfermedad. Además, la acumulación de proteínas erróneamente plegadas en el ER puede conducir a diversos tipos de estrés en las células, que también pueden contribuir en la disfunción celular y la enfermedad.

Chaperonas moleculares endógenas están presentes en prácticamente todos los tipos de células y en la mayoría de los compartimientos celulares. Algunas están implicadas en el transporte de proteínas y permiten que las células sobrevivan bajo estrés tales como el choque térmico y la inanición de glucosa. Entre las chaperonas endógenas (chaperonas moleculares), BiP (proteína de unión a inmunoglobulina de cadena pesada, GRP78) es la chaperona mejor caracterizada del ER. Al igual que otras chaperonas, BiP interactúa con muchas proteínas secretoras y de la membrana dentro del ER a lo largo de su maduración. Cuando el plegamiento de proteínas naciente prosigue sin inconvenientes, esta interacción es normalmente débil y de corta duración. Una vez que se logra la conformación de la proteína nativa, la chaperona molecular ya no interactúa con la proteína. La unión de BiP a una proteína que no se pliega, ensambla o no es glicosilada adecuadamente se vuelve estable, y habitualmente conduce a la degradación de la proteína a través de la vía de degradación asociada al ER. Este proceso sirve como un sistema de "control de calidad" en el ER, lo que garantiza que sólo las proteínas correctamente plegadas y ensambladas sean transportadas fuera del ER para su posterior maduración, y proteínas inadecuadamente plegadas o proteínas inestables queden retenidas por la subsiguiente degradación. Debido a las acciones combinadas de la ineficiencia del proceso de plegamiento de proteínas termodinámico y del sistema de control de calidad del ER, sólo una fracción de algunas proteínas de tipo salvaje es plegada en una conformación estable y sale con éxito del ER.

Chaperonas Farmacológicas Derivadas de Inhibidores de Enzimas Específicas Rescatan Enzimas Mutantes y Potencian Enzimas de Tipo Salvaje. La unión de inhibidores de pequeñas moléculas de enzimas asociadas con enfermedades de almacenamiento lisosomal (LSDs), por ejemplo, puede aumentar la estabilidad tanto de enzimas mutantes como de la correspondiente enzima de tipo salvaje (véanse las patentes de EE.UU. N°s 6.274.597; 6.583.158; 6.589.964; 6.599.919; 6.916.829 y 7.141.582, todas ellas incorporadas en esta memoria como referencia). En particular, se descubrió que la administración de derivados de moléculas pequeñas de glucosa y galactosa, que son inhibidores competitivos específicos, selectivos para varias enzimas lisosomales diana, aumentó de manera efectiva la estabilidad de las enzimas en las células *in vitro* y, por lo tanto, aumentó el tráfico de las enzimas al lisosoma. Por lo tanto, mediante el aumento de la cantidad de enzima en el lisosoma, se espera que aumente la hidrólisis de los sustratos de enzimas. Dado que la proteína enzimática mutante es inestable en el ER, la proteína enzimática se retarda en la vía de transporte normal (ER → aparato de Golgi → endosomas → lisosoma) y

se degrada prematuramente. Por lo tanto, determinados compuestos que se unen a y aumentan la estabilidad de una enzima mutante pueden servir como "chaperonas" para la enzima y aumentar la cantidad que puede salir del ER y desplazarse a los lisosomas.

Dado que se conoce que algunos inhibidores de enzimas se unen específicamente al centro catalítico de la enzima (el "sitio activo"), lo que resulta en la estabilización de la conformación de la enzima *in vitro*, se propuso que estos inhibidores, un tanto paradójicamente, eran chaperonas eficaces que podrían ayudar a restaurar la salida del ER, el tráfico a los lisosomas, actividad hidrolítica. Estas chaperonas farmacológicas específicas fueron designadas "chaperonas específicas para el sitio activo (ASSCs)" o "chaperonas farmacológicas específicas", ya que se unen con el sitio activo de la enzima de una manera específica. La terapia con chaperonas farmacológicas tiene ventajas potenciales frente a la terapia de sustitución enzimática (ERT), ya que una molécula pequeña puede ser administrada por vía oral y puede tener una biodistribución superior en comparación con las terapias a base de proteínas.

Además de rescatar las enzimas mutantes, las chaperonas farmacológicas potencian la secreción del ER y la actividad de enzimas de tipo salvaje. Por lo tanto, un compuesto que induce una conformación molecular estable de una enzima durante el plegamiento sirve como un "chaperona" para estabilizar la enzima en una conformación adecuada para la salida del ER. Chaperonas farmacológicas de gangliosidasas y/o sialidasas incluyen, pero no se limitan a las proporcionadas en las Tablas 1 y 2. Una orientación adicional para los términos y expresiones utilizados en esta memoria se proporciona más adelante.

El término "gangliósido" o "sialogangliósidos" se refiere a glucoesfingolípidos que consisten en N-acilesfingosina y una cadena de oligosacáridos que porta uno o más residuos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico, NeuAc).

El término "asialogangliósidos" se refiere a gangliósidos sin residuos ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico, NeuAc) e incluyen LacCer, GA2 y GA1 (Ariga et al.).

El término "gangliosidasa" se refiere a sialidasas y exoglucosidasas que separan residuos ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico, NeuAc) y de azúcar individuales secuencialmente de la unidad terminal no reductora de los gangliósidos y asialogangliósidos. Esta degradación se produce principalmente a través de la vía lisosoma-endosoma-endocitosis. Ejemplos de gangliosidasas incluyen sialidasa 2 (neuraminidasa 2; NEU2), sialidasa 3 (neuraminidasa 3; NEU3), sialidasa 4 (neuraminidasa 4; NEU4), β -galactosidasa (GLB1), β -hexosaminidasa A (HEXA/HEXB), β -hexosaminidasa B (HEXB) y β -hexosaminidasa S (HEXS).

El término "sialidasas" se refiere a enzimas que separan residuos ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico, NeuAc) individuales procedentes de la unidad terminal no reductora de los gangliósidos, oligosacáridos y glicoproteínas. El término "sialidasas" incluye las enzimas sialidasa 2 (neuraminidasa 2), sialidasa 3 (neuraminidasa 3) y sialidasa 4 (neuraminidasa 4), que separan residuos de ácido N-acetilneuramínico individuales a partir de gangliósidos en la vía endosoma-lisosoma, y sialidasa 1, que separa los residuos de ácido N-acetilneuramínico individuales de oligosacáridos y glicoproteínas. Residuos de ácido N-acetilneuramínico en gangliósidos han demostrado que aumentan la afinidad de unión A β y aumentan la tendencia a inducen una conformación de la lámina β . Recientemente se ha informado que la inactivación de la disialogangliósido sintasa (GD3S) en ratones *APP/PSEN* (*APP^{swe} + PSEN1 Δ E9*) impidió tanto la acumulación de A β como el subsiguiente desarrollo de los déficits de memoria que son característicos de ratones *APP/PSEN*. Bernardo, et al., *Neurobiology of Aging*. En prensa, Prueba corregida, "Elimination of GD3 synthase improves memory and reduces amyloid- [beta] plaque load in transgenic mice". GD3S enlaza ácido siálico a ácido siálico a través de un enlace α -2,8 y se requiere para la síntesis de gangliósidos de las series b y c (Tabla 3). Estos resultados sugieren que la disminución del contenido de ácido siálico en los gangliósidos podría ser beneficiosa en el tratamiento de la AD.

La enzima lisosomal " β -galactosidasa" es una exohidrolasa que separa β 1,3-galactosa del extremo no reductor de asialo- y sialo-gangliósidos. Mutaciones en el gen que codifica β -galactosidasa, *GLB1*, provoca el trastorno de almacenamiento lisosomal gangliosidosis GM1, que resulta de una deficiencia en la actividad de β -galactosidasa y la acumulación de gangliósidos GA1 y GM1. Beutler, E. et al., *Biol. Chem.* 247(22):7195-200 (1972). El gangliósido GM1 es un componente principal de los microdominios que fomentan la generación y el ensamblaje de A β en cultivo celular, y se ha encontrado que A β unido a GM1 (GA β) en cerebros exhiben etapas tempranas de la patología de la AD.

Las enzimas lisosomales β -hexosaminidasa A y B hidrolizan N-acetilgalactosamina enlazada a β (GalNAc) desde el extremo no reductor de asialo- y sialo-gangliósidos. Mientras que los gangliósidos GM1 han recibido la mayor atención, otros gangliósidos de la serie a (GD1A, GM2 y GM3) también se unen y fomentan el ensamblaje de A β *in vitro*.

Existen dos isoenzimas de β -hexosaminidasa, *HEXA* y *HEXB*. *HEXA* consiste en una subunidad α y una subunidad β ($\alpha\beta$), mientras que *HEXB* consiste en dos subunidades β ($\beta\beta$). *HEXA* codifica la subunidad α de *HEXA* y *HEXB* codifica la subunidad β de *HEXA* y *HEXB*. Mutaciones en *HEXA* provocan la enfermedad de Tay-Sachs del trastorno de almacenamiento lisosomal, que resulta de una deficiencia en la actividad *HEXA* y la acumulación de GM2.

Mutaciones en *HEXB* provocan la enfermedad de Sandhoff del trastorno de almacenamiento lisosomal, que resulta de una deficiencia en las actividades de *HEXA* y *HEXB* y la acumulación de GM2 y GA2.

Ratones deficientes en la actividad de β -galactosidasa (*GLB1* KO) y la actividad de β -hexosaminidasa (*HEXB* KO) acumulan gangliósidos en las neuronas en todo el cerebro. La acumulación de inmunorreactividad pThr231-tau con un mAb (anticuerpo monoclonal) específico, y depósitos de material que son inmunorreactivos con anticuerpos contra epítopos A β murinos en los ratones deficientes de β -hexosaminidasa.

Ratones *HEXB* KO revelaron la presencia de depósitos de tipo amiloide que inmunorreaccionaban con anti-A β de roedores. Se observó una inmunorreactividad similar en todos los cerebros de los ratones NEU1 KO (Tabla 3), pero no se observaron depósitos A β -inmunorreactivos de este tipo en los cerebros y médulas espinales de ratones de control de tipo salvaje emparejados en la edad (Tabla 3). Ratones *HEXB* KO demostraron también una inmunorreactividad AT180 incrementada, un antisuero específico para tau que está fosforilado en Thr231, en todo el cerebro y la médula espinal. No se observó inmunorreactividad AT180 significativa en el cerebro o la médula espinal de ratones de tipo salvaje emparejados en la edad. La acumulación de P(Thr231)-tau, la sAPP α disminuida y secreción de A β también se observó en fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Sandhoff (Figura 3), lo que indica que defectos en la actividad de β -hexosaminidasa pueden conducir a alteraciones en el procesamiento de APP y la fosforilación de tau tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tabla 3. Acumulación primaria y secundaria de glucoesfingolípidos y proteínas en los cerebros de ratones deficientes en neuraminidasa 1 o β -hexosaminidasa. No se detectó una inmunorreactividad para los controles emparejados en la edad.

Tabla 3

modelos de ratón	Acumulación secundaria			Acumulación primaria de sustratos de enzimas
	A-sinucleína	A β	P(Thr231)-tau	
deficiente en neuraminidasa 1 (<i>NEU1</i> -/-)	Sí	Sí	No	oligosacáridos con ácido siálico terminal glicoproteínas con ácido siálico terminal
deficiente en β -hexosaminidasa A y B (<i>HEXB</i> -/-)	Sí	Sí	No	gangliósidos GM2 gangliósidos GA2 oligosacáridos con β -GlcNAc terminal glicoproteínas con β -GlcNAc terminal

MÉTODOS PARA LA GENERACIÓN DE DATOS RERSUMIDOS EN LA TABLA 3: Cerebros de ratones *HEXB* -/- de 4 meses de edad y los controles emparejados en la edad se embebieron en bloques de parafina y se cortaron coronalmente en serie con un grosor de corte de 5 μ m. Ratones control *NEU1* -/- de cuatro meses de edad y emparejados en la edad fueron perfundidos de forma transcardial con solución salina fisiológica (al 0,9%) y los cerebros se retiraron rápidamente y se hemi-seccionaron. Los hemisferios derecho de todos los ratones se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4%/PBS (pH 7,4) recientemente producida durante una hora a temperatura ambiente. Los cerebros fueron luego transferidos a sacarosa al 15% en solución de PBS durante 24 horas para asegurar una crioprotección. Al día siguiente, los cerebros se congelaron en isopentano líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización para investigaciones histológicas. El hemisferio derecho se eligió para las investigaciones histológicas y cinco rebanadas por hemisferio del cerebro derivado de cinco capas diferentes sagitales se criocortaron y se tiñeron inmunohistoquímicamente. La inmunorreactividad tipo amiloide y pThr231-tau como se evaluó cualitativamente después de IHC utilizando anti-A β de roedores (Abcam®, ab14220) o anti-pThr231-tau (Thermo Scientific, AT180) (desarrollados con HistoGreen (Linaris®). Rebanadas de detección de amiloide de roedores fueron pretratadas con tampón citrato durante 15 minutos a 95°C en una olla a vapor para desenmascarar el antígeno, después se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-beta-amiloide primario (Abcam®, ab14220) en la relación 1:500 durante una hora a la temperatura ambiente, y posteriormente se fijó como objetivo un

anticuerpo de detección de IgG de conejo biotinilado, seguido de un desarrollo HistoGreen (Linaris®). Para la detección de PHF-TAU (AT180) rebanadas de parafina fueron pretratadas con tampón citrato durante 15 minutos a 95°C en una olla a vapor para desenmascarar el antígeno, después se incubaron con un anticuerpo monoclonal PHF-Tau anti-humano (diluido en la relación 1:100 en diluyente MOM; Pierce Endogen®, N° de Cat. MN1040) durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se fijó como objetivo un anticuerpo de detección de IgG de ratón biotinilado, seguido de un desarrollo HistoGreen (Linaris®). Se omitió un tratamiento previo con tampón citrato en rebanadas crio-cortadas.

Tabla 4: Selectividad Comparativa de Chaperonas Farmacológicas

	NB-DANA	DANA	Fenil DANA	NGT	pirimetamina	AdDNJ	Zanamivir
Diana	Neu1	Neu1-4	Neu1	Hex A/B	Hex A/B	Hex A/B	Neu 3
CI50							
B-HEX				0,3**	13*	0,7**	
Neu1	10	143*	13*				2713*
Neu2	> 1000*	43*	865*				16*
Neu3	> 1000*	61*	320*				7*
Neu4	> 1000*	74*	810*				690*

* Valores reseñados en la bibliografía

** Valores reseñados como Ki

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con gangliosidas y/o sialidasas, o glucocerebrosidasas, específicamente, una interacción con los residuos de aminoácidos de una gangliosida y/o una sialidasa, o glucocerebrosidasa, que participa directamente en el contacto con la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína diana, p. ej., β -hexosaminidasa B, para ejercer un efecto de chaperona sobre la enzima y no un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los residuos de aminoácidos de β -hexosaminidasa que interactúan con cualquier chaperona farmacológica dada pueden o pueden no estar dentro del "sitio activo" de la proteína. La unión específica puede evaluarse a través de ensayos de unión rutinarios (p. ej., inhibición, estabilidad térmica) o a través de estudios estructurales, p. ej., co-cristalización, RMN, y similares.

Tal como se utiliza en esta memoria, las expresiones "potencian la estabilidad" o "aumentan la estabilidad" se refieren al aumento de una resistencia de las enzimas a la inactivación irreversible *in vitro* o en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para gangliosidas y/o sialidasas, o para glucocerebrosidasas, en relación con gangliosidas y/o sialidasas (preferiblemente del mismo tipo de células o de la misma célula, p. ej., en un momento anterior), o para glucocerebrosidasas, que no están en contacto con la chaperona farmacológica. El aumento de la estabilidad de la proteína incrementa la semivida de la proteína en el ER y la cantidad de proteína funcional que transita desde el ER. En un aspecto de la invención, la estabilidad de una gangliosida o sialidasa de tipo salvaje, o glucocerebrosidasa, se potencia o aumenta. En otro aspecto de la invención, la estabilidad conformacional de un gangliosida o sialidasa o glucocerebrosidasa mutante se ha potenciado o incrementado.

Tal como se utiliza esta memoria, las expresiones "potenciar el tráfico" o "aumentar el tráfico" se refieren al aumento de la eficiencia del transporte de una gangliosida y/o sialidasa o glucocerebrosidasa al citosol (sialidasa 2) o los endosomas y lisosomas de una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para una o más gangliosidas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas, en relación con la eficiencia del transporte de un gangliosida y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa en una célula (preferiblemente del mismo tipo de células o de la misma célula, p. ej., en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para una gangliosida y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa.

Tal como se utiliza esta memoria, las expresiones "potenciar la actividad" o "aumentar la actividad" se refieren al aumento de la actividad de gangliosidas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas, según se describe en esta memoria, en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para una o más gangliosidas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas, en relación con la actividad de gangliosidas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas en una célula (preferiblemente del mismo tipo de células o la misma célula, p. ej., en un momento anterior) no puesta en contacto con la chaperona farmacológica específica para una o más gangliosidas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas. Chaperonas farmacológicas de la presente invención también pueden aumentar la actividad de la enzima mediante el aumento de la cantidad total de enzima en la célula y/o mediante el aumento de la actividad específica de una enzima.

La expresión "actividad específica" se refiere a la cantidad de sustrato que una enzima convierte por miligramo de proteína en una preparación enzimática, por unidad de tiempo.

Tal como se utiliza esta memoria, las expresiones "mejorar el nivel" o "aumentar el nivel" se refieren a aumentar el nivel de una o más gangliosidasas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para una o más gangliosidasas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas, en relación con el nivel de gangliosidasas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas en una célula (preferiblemente del mismo tipo de células o la misma célula, p. ej., en un momento anterior) no en contacto con la chaperona farmacológica específica para una o más gangliosidasas y/o sialidasas o glucocerebrosidasas.

La expresión "estabilizar una conformación apropiada" se refiere a la capacidad de una chaperona farmacológica gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa de inducir o estabilizar una conformación de una gangliosidasa mutada o de tipo salvaje y/o sialidasa o enzima glucocerebrosidasa que es funcionalmente idéntica a la conformación de la gangliosidasa de tipo salvaje y/o sialidasa o glucocerebrosidasa que realiza su función prevista.

La expresión "funcionalmente idéntico" significa que mientras que puede haber pequeñas variaciones en la conformación (casi todas las proteínas exhiben cierta flexibilidad conformacional en su estado fisiológico), la flexibilidad conformacional no da lugar a (1) la agregación de proteínas, (2) la eliminación a través de la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico, (3) el deterioro de la función de la proteína, p. ej., la actividad metabólica de APP y/o (4) un transporte inadecuado dentro de la célula, p. ej., la localización al citosol, en un grado mayor o menor que el de la proteína de tipo salvaje.

La expresión "conformación molecular estable" se refiere a una conformación de una proteína, es decir, una gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa, inducida por una chaperona farmacológica que proporciona una función de tipo salvaje, al menos parcial, en la célula o para potenciar la función de tipo salvaje. Por ejemplo, una conformación molecular estable de una gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa sería uno en la cual la gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa abandona el ER y transita al citosol, en lugar de experimentar un plegamiento erróneo y ser degradada y/o de no realizar su función pretendida. Además, una conformación molecular estable de una gangliosidasa mutada y/o sialidasa o glucocerebrosidasa también puede poseer actividad total o parcial. Sin embargo, no es necesario que la conformación molecular estable tenga todos los atributos funcionales de la proteína de tipo salvaje.

El término "actividad" se refiere a la función fisiológica normal pretendida de una gangliosidasa de tipo salvaje y/o sialidasa o glucocerebrosidasa en una célula. Por ejemplo, la actividad de una gangliosidasa y/o sialidasa incluye el catabolismo de gangliósidos y la actividad de glucocerebrosidasa incluye el catabolismo del glucoesfingolípido glucosilceramida. Dicha funcionalidad puede ser sometida a ensayo por cualquier medio conocido para establecer la funcionalidad.

La expresión "catabolismo del gangliósido" se refiere a la separación de residuos de ácido siálico y de azúcar individuales secuencialmente desde la unidad terminal no reductora de asialo- y sialo-gangliósidos por parte de sialidasas y exoglucosidasas con la formación de ceramida. Esta degradación se produce principalmente a través de la vía de endocitosis-endosoma-lisosoma con la excepción de sialidasa 2, que se encuentra en el citosol.

En una realización no limitante, un polipéptido de gangliosidasa y/o sialidasa, o glucocerebrosidasa puede ser codificado por cualquier molécula de ácido nucleico que exhibe un 50%, 60%, 70%, 80% y hasta 100% de homología con moléculas de ácido nucleico que codifican una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa de tipo salvaje, y cualesquiera secuencias que se hibridan en condiciones estándares para estas secuencias. En otra realización no limitante, cualquier otra secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa (que tiene las mismas propiedades funcionales y afinidades de unión que las secuencias de polipéptidos antes mencionadas) tales como variantes alélicas en individuos normales, que tienen la capacidad de lograr una conformación funcional en el ER, consigue una localización adecuada dentro de la célula, y exhiben una actividad de tipo salvaje.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa "mutante" se refiere a un polipéptido de gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa traducido a partir de un gen que contiene una mutación genética que da como resultado una secuencia de aminoácidos alterada de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa. En una realización, la mutación resulta en una proteína gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa que no consigue una conformación nativa en las condiciones normalmente presentes en el ER, cuando se compara con una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa de tipo salvaje, o exhibe una estabilidad o actividad disminuida en comparación con una gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa de tipo salvaje. A este tipo de mutación se le alude en esta memoria como una "mutación conformacional", y a la proteína que porta una mutación de este tipo se le alude como un "mutante conformacional". El fracaso para lograr esta conformación resulta en una proteína gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa que está degradada o agregada, en lugar de ser transportada a través de una vía normal en el sistema de transporte de proteínas a su ubicación nativa en la célula o en el entorno extracelular. En algunas realizaciones, puede

- 5 producirse una mutación en una parte no codificante del gen que codifica una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa que resulta en la expresión menos eficiente de la proteína, p. ej., una mutación que afecta a la eficiencia de la transcripción, la eficiencia del corte y empalme, la estabilidad del ARNm, y similares. Al potenciar el nivel de expresión de tipo silvestre, así como variantes mutantes conformacionales de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa, la administración de una chaperona farmacológica gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa puede mejorar un déficit resultante de dicha expresión ineficiente de la proteína.
- 10 Determinados ensayos pueden evaluar los atributos de una proteína que pueden o no corresponder a su actividad real *in vivo*, pero, no obstante, son sustitutos adecuados de la funcionalidad de la proteína, y el comportamiento de tipo salvaje en esos ensayos demuestra la evidencia para apoyar las técnicas de rescate o de mejora del plegamiento de proteínas de la invención. Una de estas actividades de acuerdo con la invención es el transporte adecuado de una gangliosidasa funcional y/o una sialidasa desde el retículo endoplásmico al citosol.
- 15 Las expresiones "expresión endógena" y "expresado de forma endógena" se refiere a la expresión fisiológica normal de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa en las células en un individuo que no tiene o se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno asociado con una deficiencia de gangliosidasa y/o sialidasa o glucocerebrosidasa, la sobre-expresión de un mutante dominante negativo, u otro defecto tal como una mutación en una secuencia de ácido nucleico o polipéptido de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa que altera, p. ej., inhibe, su expresión, actividad o estabilidad. Esta expresión también se refiere a la expresión de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa en células o tipos de células en las que se expresa normalmente en individuos sanos, y no incluye la expresión de una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa en las células o tipos de células, p. ej., células tumorales, en el que una gangliosidasa y/o una sialidasa o glucocerebrosidasa no se expresa en individuos sanos.
- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "gangliósido elevado" se refiere a un individuo, paciente o población de pacientes que tengan niveles incrementados de gangliósidos en el cerebro. Los niveles de gangliósidos pueden ser elevados en las membranas en las células y también dentro de microdominios. El término "microdominios" o la expresión "balsas de lípidos" se refiere a zonas resistentes al detergente que se encuentran dentro de las membranas celulares que están enriquecidas en colesterol, glucosfingolípidos y gangliósidos. En el aspecto de esta invención, chaperonas farmacológicas se utilizan para disminuir los niveles de gangliósidos en microdominios o balsas de lípidos mediante el aumento de la actividad de enzimas que se sabe que catabolizan gangliósidos en el cerebro.
- 25 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "eficiencia de transporte" se refiere a la capacidad de una proteína de ser transportada fuera del retículo endoplásmico a su ubicación nativa dentro de la célula, la membrana celular, o en el entorno extracelular.
- 30 Un "inhibidor competitivo" de una enzima puede referirse a un compuesto que se asemeja estructuralmente a la estructura química y la geometría molecular del sustrato de la enzima de unir la enzima en aproximadamente la misma ubicación que el sustrato. Por lo tanto, el inhibidor compete por el mismo sitio activo que la molécula de sustrato, aumentando así la K_m . La inhibición competitiva es habitualmente reversible si están disponibles suficientes moléculas de sustrato para desplazar el inhibidor, es decir, inhibidores competitivos se pueden unir de forma reversible. Por lo tanto, la cantidad de inhibición de la enzima depende de la concentración de inhibidor, la concentración de sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y sustrato para el sitio activo.
- 35 Una inhibición competitiva no clásica se produce cuando el inhibidor se une de forma remota al sitio activo de una enzima, creando un cambio conformacional en la enzima de manera que el sustrato ya no puede unirse a la misma. En la inhibición competitiva no clásica, la unión de sustrato en el sitio activo impide la unión del inhibidor en un lugar separado, y viceversa. Esto incluye la inhibición alostérica.
- 40 Un "inhibidor lineal de tipo mixto" de una enzima es un tipo de inhibidor competitivo que permite que el sustrato se una, pero reduce su afinidad, por lo que la K_m se incrementa y la $V_{máx}$ disminuye.
- 45 Un "inhibidor no competitivo" se refiere a un compuesto que forma enlaces fuertes con una enzima y no puede ser desplazado por la adición de sustrato en exceso, es decir, los inhibidores no competitivos pueden ser irreversibles. Un inhibidor no competitivo puede unirse en, cerca de, o a distancia del sitio activo de una enzima o proteína, y en relación con enzimas, no tiene efecto alguno sobre la K_m , pero disminuye la $V_{máx}$. Inhibición no competitiva se refiere a una situación en la que inhibidor se une sólo al complejo enzima-sustrato (ES). La enzima se vuelve inactiva cuando se une el inhibidor. Esto difiere de los inhibidores competitivos no clásicos que pueden unirse a la enzima en ausencia de sustrato.
- 50

El término "V_{máx}" se refiere a la velocidad inicial máxima de una reacción catalizada por enzimas, es decir, a niveles saturantes de sustrato. El término "K_m" es la concentración de sustrato requerida para lograr ½ V_{máx}.

Un "potenciador" de enzimas es un compuesto que se une a una gangliosidasa y/o una sialidasa y aumenta la velocidad de reacción enzimática.

- 5 Las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a una cantidad suficiente para potenciar el procesamiento de la proteína en el ER (permitiendo una conformación funcional), sin inhibir la proteína ya expresada en la localización celular apropiada (en el caso de un antagonista), o sin la inducción de la internalización del receptor mediada por ligando de proteína a partir de la ubicación celular apropiada (en el caso de un agonista), y potenciar la actividad de la proteína diana, lo que resulta en una respuesta terapéutica en un sujeto.
- 10 Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que un usuario (por ejemplo, un médico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, incluyendo los síntomas anteriores y sustituyendo marcadores clínicos. Por lo tanto, una respuesta terapéutica será generalmente una mejora o inhibición de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno, p. ej., la enfermedad de Alzheimer.

- 15 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o cualquier vehículo con el que se administra el
- 20 compuesto. Vehículos farmacéuticos de este tipo, por ejemplo, pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites. Agua o disoluciones salinas en disolución acuosa y dextrosa acuosa y glicerol se emplean preferiblemente como soportes, particularmente para disoluciones inyectables. Soportes farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin, 18ª Edición, u otras ediciones.

- 25 La expresión "alrededor de" y el término "aproximadamente" generalmente significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o la precisión de las mediciones. Grados de error a modo de ejemplo típicos están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor dado o intervalo de valores. Alternativamente, y particularmente en los sistemas biológicos, la expresión "alrededor de" y el término "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
- 30 numéricas dadas en esta memoria son aproximadas, a menos que se indique lo contrario, lo que significa que la expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" se puede deducir cuando no se indique expresamente.

- Tal como se utiliza en esta memoria, el término "aislado" significa que el material referenciado se separa del entorno en el que se encuentra normalmente. Así, un material biológico aislado puede estar libre de componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que se encuentra o produce el material. En el caso de moléculas de
- 35 ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de la PCR, una banda de ARNm en un gel, un ADNc o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se escinde preferiblemente del cromosoma en el que puede encontrarse, y más preferiblemente ya no está unido a las regiones no reguladoras, no codificantes, o a otros genes, situados aguas arriba o aguas abajo del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En aún otra realización, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Los ácidos nucleicos aislados incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Por lo tanto, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un
- 40 ácido nucleico aislado. Una proteína aislada puede estar asociada con otras proteínas o ácidos nucleicos, o ambos, con los que se asocia en la célula, o con membranas celulares si es una proteína asociada a la membrana. Un orgánulo, célula o tejido aislado se retira del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material
- 45 aislado puede estar, pero no necesita estar purificado.

- El término "purificado", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un material, tal como un ácido nucleico o polipéptido de una gangliosidasa y/o sialidasa que ha sido aislado bajo condiciones que reducen o eliminan materiales no relacionados, es decir, contaminantes. Por ejemplo, una proteína purificada está de preferencia
- 50 sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente libre" se utiliza operacionalmente, 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 aún más preferiblemente al menos 99% puro. La pureza puede ser evaluada por medios convencionales, p. ej., cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica.

El término "tauopatía" se refiere a cualquier estado resultante de la agregación patológica de proteína tau que forma los ovillos neurofibrilares (NFT) en el cerebro humano, e incluye (pero no se limita a) enfermedades tales como la demencia frontotemporal, enfermedad de Alzheimer, parálisis supranuclear progresiva, degeneraciones cortico-basales y la degeneración lobar frontotemporal (enfermedad de Pick).

5 La expresión "enfermedad de Alzheimer" o "AD" se refiere a un estado caracterizado por demencia lentamente progresiva y atrofia cortical cerebral tosca. La presencia de placas β -amiloides neuríticas, ovillos neurofibrilares intraneuronales y angiopatía amiloide son distintivos de la AD y se observan en el examen post mortem. La AD puede ser hereditaria en una manifestación familiar, o puede ser esporádica. En esta memoria, la AD incluye familiar, esporádica, así como intermedios y subgrupos de los mismos sobre la base de manifestaciones fenotípicas.

10 La AD familiar tiene típicamente un brote temprano (antes de los 65 años), mientras que la AD esporádica normalmente es de un brote tardío (edad de 65 años en adelante). En una realización no limitante, la AD familiar puede estar asociada con mutaciones en uno o más genes seleccionados del grupo que comprende presenilina 1 (presenilina 1 humana, N°s de Acceso a GenBank NM_000021, NM_007318 y NM_007319; presenilina 1 murina, N° de Acceso a GenBank NM_008943; y presenilina 1 de rata, N° de Acceso a GenBank NM_019163), presenilina 2

15 (presenilina 2 humana, N°s de Acceso a GenBank NM_000447 y NM_012486; presenilina 2 murina, N° de Acceso a GenBank NM_011183; y presenilina 2 de rata, N° de Acceso a GenBank NM_031087), y Proteína Precursora de Amiloide (APP) (APP humana, N°s de Acceso a GenBank NM_201414, NM_201413 y NM_000484; murino APP, N° de Acceso a GenBank NM_007471; y APP de rata, N° de Acceso a GenBank NM_019288). La AD esporádica no puede someterse a ensayo de forma directa, pero determinados factores de riesgo pueden aumentar la

20 susceptibilidad de un individuo de desarrollar AD esporádica. En una realización no limitante, los individuos con al menos una copia del alelo e4 de la apolipoproteína E (APOE) (APOE humana, N° de Acceso a GenBank NM_000041; APOE murina, N° de Acceso a GenBank NM_009696; y APOE de rata, N° de Acceso a GenBank NM_138828) están en riesgo de desarrollar AD esporádica de brote tardío.

25 Esta expresión también incluye individuos con trisomía 21 o síndrome de Down (DS), desarrollan demencia que es idéntica a las características clínicas y neuropatológicas de AD (en su tercera o cuarta década), incluyendo placas de amiloide cerebral (A β) y ovillos neurofibrilares (NFTs), las lesiones características de la enfermedad de Alzheimer (AD). Estudios recientes han demostrado que A β 42 es la forma más antigua de esta proteína depositada en cerebros con síndrome de Down, y puede ser visto en los sujetos de tan sólo 12 años de edad, y que A β soluble puede ser detectado en los cerebros de los sujetos DS ya en una edad gestacional tan temprana como de 21

30 semanas, precediendo a la formación de placas A β . Gyure *et al.*, Archives of Pathology and Laboratory Medicine 125:489-492 (2000).

Para los fines de la presente invención, un "trastorno neurológico" se refiere a cualquier enfermedad del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (PNS) que está asociada con el procesamiento β -amiloidogénico de Proteína Precursora de Amiloide. Esto puede dar lugar a defectos de células neuronales o glia, que incluyen, pero no se limitan a la pérdida neuronal, degeneración neuronal, desmielinización neuronal, gliosis (es

35 decir, astrogliosis), o la acumulación neuronal o extraneuronal de proteínas o toxinas aberrantes (p. ej. amiloide- β).

Un trastorno neurológico a modo de ejemplo es la angiopatía amiloide cerebral (CAA) a la que también se alude como angiopatía congofílica. Este trastorno es una forma de angiopatía en la que la misma proteína amiloide que se asocia con la enfermedad de Alzheimer, β -amiloide (A β), se deposita en las paredes de las leptomeninges y en los

40 vasos sanguíneos cerebrales corticales superficiales del cerebro. La deposición amiloide predispone estos vasos sanguíneos a un fallo, aumentando el riesgo de un accidente cerebrovascular hemorrágico. Dado que es la misma proteína amiloide que se asocia con la demencia de Alzheimer, tales hemorragias cerebrales son más comunes en las personas que sufren Alzheimer, pero también pueden ocurrir en los que no tienen un historial de demencia. La hemorragia en el cerebro queda habitualmente confinada a un lóbulo en particular y esto es ligeramente diferente en

45 comparación con hemorragias cerebrales que se producen como consecuencia de una alta presión arterial (hipertensión) - una causa más común de un accidente cerebrovascular hemorrágico (o hemorragia cerebral). La CAA también se asocia con ataques isquémicos transitorios, hemorragia subaracnoidea, síndrome de Down, necrosis post-irradiación, esclerosis múltiple, leucoencefalopatía, encefalopatía espongiiforme y demencia pugilística.

La expresión "paciente individual" o "población de pacientes" se refiere a una o más personas a las que se ha diagnosticado la enfermedad de Alzheimer o que están en riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, los individuos son diagnosticados, o están en riesgo de desarrollar la AD familiar. En otro caso, el individuo es diagnosticado que tiene o está en riesgo de desarrollar la AD esporádica. El diagnóstico de la AD puede realizarse con base en características genotípicas o fenotípicas mostradas por el individuo. Por ejemplo, un individuo con una variante mutante de presenilina 1, presenilina 2 o APP está en riesgo de desarrollar la AD familiar. En otro

50 ejemplo no limitativo, los individuos con la variante E4 de APOE están en riesgo de desarrollar la AD esporádica.

Un individuo puede ser diagnosticado que tiene la AD o que está en riesgo de desarrollar la AD, al exhibir fenotipos asociados con la AD. Fenotipos asociados con la AD pueden ser cognitivos o psiquiátricos. Ejemplos de fenotipos

cognitivos incluyen, pero no se limitan a amnesia, afasia, apraxia y agnosia. Ejemplos de síntomas psiquiátricos incluyen, pero no se limitan a cambios de personalidad, depresión, alucinaciones y delirios. Como un ejemplo no limitativo, Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders, 4ª edición (DSM-IV-TR) (publicado por la Asociación Americana de Psiquiatría) contiene el siguiente conjunto de criterios para la demencia del tipo Alzheimer:

- 5 A. El desarrollo de múltiples déficits cognitivos que se manifiesta por deterioro de la memoria y uno o más de afasia, apraxia, agnosia y alteraciones en el funcionamiento ejecutivo;
- B. Los déficits cognitivos representan como disminución de la actividad previa y provocan un deterioro significativo de la actividad social o laboral;
- C. El curso se caracteriza por un brote gradual y un continuo descenso;
- 10 D. Los déficits cognitivos no se deben a otros estados del sistema nervioso central, sistémicos o inducidos por sustancias que provocan déficits progresivos en la memoria y la cognición; y
- E. La alteración no se explica mejor por otro trastorno psiquiátrico.

Otro ejemplo no limitativo son los criterios para la enfermedad de Alzheimer del The National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorder Association (NINDS-ADRDA) Criterios y comunicativas y la enfermedad de Alzheimer y Stroke- Asociación trastorno relacionado (NINDS-ADRDA) como sigue:

- 15 A. Enfermedad de Alzheimer definitiva: cumple los criterios para la probable enfermedad de Alzheimer y tiene evidencia histopatológica de la enfermedad de Alzheimer por medio de autopsia o biopsia
- 20 B. Probable enfermedad de Alzheimer: demencia establecida por examen clínico y neuropsicológico e implica
 - (a) déficits progresivos en dos o más zonas de cognición, incluyendo la memoria,
 - (b) brote entre las edades de 40 y 90 años, y
 - (c) ausencia de enfermedades cerebrales sistémicas o de otro tipo capaces de producir un síndrome de demencia, incluyendo delirio
- 25 C. Posible enfermedad de Alzheimer: un síndrome de demencia con un brote atípico, presentación o progreso y sin una etiología conocida; no se piensa que sea la causa cualquier enfermedad co-mórbida capaz de producir demencia
- D. Improbable enfermedad de Alzheimer: un síndrome de demencia con cualquiera de los siguientes: brote súbito, signos neurológicos focales o convulsiones o trastornos de la marcha temprana en el curso de la enfermedad.

- 30 Manifestaciones fenotípicas de la AD también pueden ser físicas tales como por la detección directa (formación de imágenes) o indirecta (bioquímica) de las placas de amiloide- β . La cuantificación de amiloide- β (1-40) en la sangre periférica se ha demostrado utilizando la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas en tándem en una trampa de iones lineal (Du *et al.*, J Biomol Tech. 16 (4): 356-63 (2005). También se ha descrito la detección de agregados de proteínas individuales β -amiloide en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de Alzheimer mediante espectroscopia de correlación de fluorescencia (Pitschke *et al.*, Nature Medicine 4: 832-834 (1998). La patente de EE.UU. 5.593.846 describe un método para detectar amiloide- β soluble. También se ha descrito la detección indirecta de péptido amiloide- β y el receptor para los productos finales de glicación avanzada (RAGE) utilizando anticuerpos. Por último, la detección bioquímica de la actividad BACE-1 incrementada en el líquido cefalorraquídeo utilizando sustratos cromogénicos también se ha postulado como un indicador de diagnóstico o pronóstico de la AD (Verheijen *et al.*, Clin Chem. 13 de abril [Epub.] (2006).
- 35

- 40 La formación de imágenes *in vivo* de β -amiloide se puede lograr utilizando derivados de flavona radioyodados como agentes de formación de imágenes, Ono *et al.*, J Med Chem. 48(23):7253-60 (2005), y con tintes de unión a amiloide tales como putresceína conjugados con un péptido radioyodado A de 40 residuos (proporcionando ^{125}I -PUT-A 1-40), que demostró cruzar la barrera hematoencefálica y unirse a placas $\alpha\beta$. Wengenack *et al.*, Nature Biotechnology. 18(8):868-72 (2000). La formación de imágenes de β -amiloide también fue demostrada utilizando estilbena SB-13 y el benzotiazol 6-OH-BTA-1 (también conocido como PIB). Nicholaas *et al.*, Am J Geriatr Psychiatry, 12:584-595 (2004).
- 45

Ejemplos

La Figura 1 representa el procesamiento de APP y muestra cómo APP madura es metabolizada por 2 vías competitivas, la vía de la α -secretasa que genera sAPP α y C83 (izquierda) y la vía de la β -secretasa que genera sAPP β y C99 (derecha). Fragmentos carboxi terminales C83 y C99 son sustratos para la γ -secretasa, generando el dominio intracelular de APP (AICD) y los péptidos secretados p3 (izquierda) y A β (derecha). Los péptidos A β pueden oligomerizarse, formar placas y fomentar la hiperfosforilación de tau, mientras que sAPP α fomenta el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis y suprime la hiperfosforilación de tau asociada con la activación de CDK5.

Los datos mostrados en la Figura 2 se generaron como sigue. El tejido cerebral de ratones *HEXB* *+/+* (~ 4,5 meses de edad), ratones *HEXB* *+/-* (~ 4,5 meses de edad) y ratones *HEXB* *-/-* (~ 4,5 meses de edad) se troceó y se mezcló con 10 veces el volumen (1 ml/100 mg de tejido) de tampón de homogeneización de tejido frío (THB: sacarosa 250 mM, Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, más inhibidores de proteasa). A continuación, el tejido cerebral se homogeneizó utilizando un homogeneizador de rotor-estator. El homogeneizado de cerebro se transfirió a un tubo de ultracentrífuga limpio, se colocó en un rotor RP70-AT pre-enfriado rápidamente y se centrifugó a 50.000 rpm (~ 100.000 g) durante 1 h a 4°C. La fracción soluble (sobrenadante) se utilizó para determinar los niveles de sAPP mediante inmunotransferencia utilizando el anticuerpo 22C11 (Millipore). Para la medición de los niveles de A β 40 y A β 42, la fracción soluble (sobrenadante) se extrajo con dietilamina (DEA). El homogeneizado de DEA se centrifugó a 50.000 rpm (~ 100.000 g) durante 1 h a 4°C, y el sobrenadante se neutralizó mediante la adición de 0,1X volumen Tris 0,5 M pH 7. El extracto de DEA neutralizado se utilizó luego para la medición de los niveles de A β 40 y A β 42 mediante kits ELISA (Wako). Para obtener la fracción de membrana, tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1% en TBS más inhibidores de proteasa) se añadió al sedimento de la membrana en el tubo de ultracentrífuga. Las membranas se solubilizaron en el tampón RIPA mediante incubación en hielo durante 30 min. Membranas solubilizadas en RIPA se obtuvieron mediante centrifugación a 25.000 rpm durante 15 min a 4°C. Las fracciones de membrana se inmunotransfirieron utilizando el anticuerpo policlonal APP-CT (Covance) para determinar los niveles de APP, α -CTF y β -CTF. Para el análisis de los niveles de tau, se prepararon fracciones de membrana según se describe anteriormente, y se inmunotransfirieron utilizando anticuerpo AT180 (Thermo Scientific) para determinar los niveles de p-Tau (Thr231), anticuerpo AT8 (Thermo Scientific) para determinar los niveles de p-Tau (Ser 202), anticuerpo total tau (Thermo Scientific) para determinar los niveles de tau totales. El nivel de p-Tau (Thr181) en las fracciones de membrana se determinó mediante la realización de un ensayo ELISA (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Para los análisis histológicos, corteza del cerebro de un ratón *HEXB* KO fue embebida en bloques de parafina. La inmunoreactividad de tipo amiloide y pThr231-tau se evaluó cualitativamente después de IHC utilizando anticuerpo FC3542 (Calbiochem) que reconoce específicamente A β 42 o utilizando anticuerpo AT8 (Thermo Scientific) que reconoce específicamente p-Tau (Thr202).

Tal como se muestra en la Figura 2, ratones *HEXB* inactivados con Sandhoff (*HEXB* *-/-*) y ratones heterocigotos *HEXB* de Sandhoff (*HEXB* *+/-*) acumulan fragmentos C-terminales (CTF) derivados de la proteína precursora amiloide (APP) y péptidos A β y tienen niveles incrementados de tau fosforilado. La Figura 2A) representa la densitometría normalizada de borrones de Western que muestran niveles de CTF y A β incrementados en homogeneizados de cerebro total de ratones *HEXB* *-/-* y *HEXB* *+/-* de 4 meses de edad (n = 4). La Figura 2B) muestra el análisis histológico que muestra una acumulación de A β 42 intraneuronal en la corteza de ratones *HEXB* *-/-*. La Figura 2C) representa un ELISA (p-Tau [Thr181]) y densitometría normalizada de transferencias Western (p-Tau [Thr231] y p-Tau [Ser202], tau total) que muestran niveles elevados de p-Tau en ratones *HEXB* *-/-* y *HEXB* *+/-* en relación con ratones *HEXB* *+/+* emparejados en la, pero no hay diferencias significativas en los niveles totales de tau. La Figura 2D) muestra el análisis histológico que muestra acumulación de p-Tau (202) en el bulbo raquídeo y la médula espinal (datos no mostrados) de ratones *HEXB* *-/-*.

Los datos mostrados en la Figura 3 se generaron como sigue. Una línea celular de fibroblastos de tipo salvaje (san) (CRL2076; Coriell) y una línea celular de fibroblastos de un paciente de Sandhoff (GM11707; Coriell) se cultivaron durante la noche en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%), seguido de incubación durante la noche en medios exentos de suero. Las proteínas secretadas se recogieron mediante precipitación con TCA (12,5%) de los medios de crecimiento y se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando el anticuerpo 6E10 (Covance) para determinar los niveles de sAPP α . Para determinar los niveles de sAPP β secretados, los fibroblastos (CRL2076 y GM 11707) se cultivaron en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%) durante 5 días, seguido por inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo monoclonal biotinilado contra APP (1G6; Covance), y transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal contra sAPP β (Covance) purificado por afinidad. Para medir los niveles de A β 40 secretada en los medios, los fibroblastos (CRL2076 y GM11707) se cultivaron durante la noche en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%) (3 pocillos/muestra; 1 ml de medios/pocillo), seguido de una incubación durante la noche en medios exentos de suero. Los 3 pocillos/muestra se combinaron y se mezclaron con 0,3 ml de metanol, 30 μ l de TFA (ácido trifluoroacético) al 10%. Las muestras se pre-concentraron utilizando una columna Sepak C18 (Waters) y luego se utilizaron en un ensayo ELISA (Covance) para determinar los niveles de A β 40. Para determinar los niveles de APP de longitud completa, los fibroblastos (CRL2076 y GM 11707) se cultivaron durante la noche en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%). Las células se rasparon, se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se solubilizó utilizando tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1%

en TBS más inhibidores de proteasa). El lisado celular se inmunotransfirió utilizando el anticuerpo APP-CT (Covance) para determinar los niveles de APP de longitud completa. Para determinar los niveles de ADAM10, los fibroblastos (CRL2076 y GM 11707) se cultivaron durante la noche en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%). Las células se rasparon, se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se solubilizó utilizando tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1% en TBS más inhibidores de la proteasa). El lisado celular se inmunotransfirió utilizando un anticuerpo policlonal de conejo específico para ADAM10 (Abcam). Para determinar los niveles de BACE1, los fibroblastos (CRL2076 y GM 11707) se cultivaron durante la noche en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%). Las células se rasparon, se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se solubilizó utilizando tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1% en TBS más inhibidores de la proteasa). El lisado celular se inmunotransfirió utilizando un anticuerpo policlonal de conejo específico para BACE1 (Abcam). Para determinar los niveles de pThr231-tau, los fibroblastos (CRL2076 y GM11707) se cultivaron durante la noche en medio de crecimiento DMEM (más FBS al 10%). Las células se rasparon, se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se solubilizó utilizando tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1% en TBS más inhibidores de la proteasa). El lisado celular se inmunotransfirió utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón específico para pThr231-tau (AT180; Thermo Scientific). Fibroblastos sanos (CRL2076; Coriell) fueron tratados con 0, 100 o 1000 μ M de N-butil-desoxigalactonojirimicina (NB-DGJ) durante 5 días, seguido de una incubación durante la noche en medios exentos de suero. Las proteínas secretadas se recogieron por precipitación con TCA (al 12,5%) de los medios de crecimiento y se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando anticuerpo 6E10 (Covance) para determinar los niveles de sAPP α .

Tal como se muestra en la Figura 3, fibroblastos derivados de pacientes de Sandhoff secretan más sAPP β y A β y menos sAPP α comparación con fibroblastos control y exhiben una hiperfosforilación de tau. Borriones de Western comparan los niveles de sAPP α (A), sAPP β (B), A β (C) ADAM10 (D), BACE1 (E), APP de longitud completa (F) y pThr231-tau (G) en fibroblastos derivados de controles sanos y un paciente de Sandhoff utilizando los siguientes anticuerpos: 6E10 para la detección de sAPP α y APP de longitud completa; APP(CT) policlonal (ProSci Inc.) para la detección de APP de longitud completa; anti-ADAM10 policlonal de conejo (Calbiochem); anti-BACE1 policlonal de conejo (Abcam, ab23796); AT180, mAb específico contra pThr231-tau (Thermo Scientific); y HT7, mAb específico contra tau humana (Thermo Scientific). El tratamiento de fibroblastos de Sandhoff (5 días) con la chaperona farmacológica N-butil-desoxigalactonojirimicina aumenta la producción de sAPP α en un 35-40% (H), demostrando que la reducción de los niveles de gangliósidos puede restaurar al menos parcialmente el procesamiento de APP normal. Fibroblastos de Sandhoff secretaban menos sAPP α en el medio en comparación con fibroblastos control, a pesar de que los niveles de ADAM10 y BACE1 eran similares a los controles. Los fibroblastos se cultivaron en DMEM exento de suero durante 20 horas y concentraciones de A β 40 sobrenadante se midieron mediante ELISA (Covance BetaMark x-40) después de la concentración utilizando columnas C18 Sep-Pak (Waters, Inc.). Las concentraciones de A β 40 se normalizan a la proteína total (BCA, Pierce) a partir de lisados celulares de fibroblastos a partir de los cuales se derivaron los sobrenadantes.

Los datos mostrados en la Figura 4 se generaron como sigue. Neuroblastomas de ratón N2A fueron tratados durante 3 días ya sea con ningún compuesto o con 10 μ M de AdDNJ, 10 μ M de NGT o 10 μ M de DGJ. Las células se rasparon, se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se solubilizó utilizando tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1% en TBS más inhibidores de la proteasa). El lisado celular se inmunotransfirió utilizando un anticuerpo policlonal de conejo específico para HEXB (Abcam). Los niveles de sAPP α se determinaron inmunotransfiriendo una pequeña fracción (30 μ l) de los medios de crecimiento utilizando anticuerpo 22C11 (Millipore).

Como se muestra en la Figura 4, β -hexosaminidasa (β -Hex), fijó como objetivo las chaperonas farmacológicas N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT) y 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ), aumenta los niveles celulares de β -Hex de tipo salvaje y aumenta la diseminación de sAPP α neurotrófico. Figura 4A) El tratamiento de neuroblastomas de ratón N2A con 10 μ M de NGT y AdDNJ aumentó los niveles celulares de β -Hex de tipo salvaje, mientras que desoxigalactonojirimicina (DGJ), una chaperona farmacológica para la enzima lisosomal α -galactosidasa ácida, no tuvo efecto alguno sobre los niveles de β -Hex. Figura 4B) El tratamiento de neuroblastomas de ratón N2A con 10 μ M de NGT y AdDNJ también aumentó la diseminación de sAPP α neurotrófico.

Los datos mostrados en la Figura 5 se generaron como sigue. Para el estudio de respuesta a la dosis, ratones C57BL6 fueron tratados con 0,3 mg/kg, 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg o 300 mg/kg de NGT (agua potable) durante 7 días. Después de la dosificación, los ratones fueron sacrificados y el tejido del cerebro se recuperó para las mediciones de la actividad enzimática. El tejido del cerebro se cortó en partes alícuotas de 20-30 mg y cada una de las partes alícuotas se homogeneizó en tampón de lisis (fosfato de sodio dibásico 82,4 mM, ácido cítrico 58,8 mM, sal sódica del ácido taurocólico hidrato al 0,25%, TX-100 al 0,5%). El homogeneizado de tejido del cerebro se centrifugó a 25.000 rpm, 4°C durante 15 min. El sobrenadante (lisado del cerebro) resultante se utilizó para medir la actividad total de β -hexosaminidasa utilizando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma). Para el estudio de lavado, ratones C57BL6 fueron tratados con 100 mg/kg de NGT (agua potable) durante

7 días, seguido de 1, 2, 3, 5 y 7 días de lavado (sin fármaco administrado). Después de la fase de lavado, los ratones fueron sacrificados y el tejido cerebral se recuperó para las mediciones de la actividad enzimática. El tejido del cerebro se cortó en rebanadas en partes alícuotas de 20-30 mg y cada una de las partes alícuotas se homogeneizó en tampón de lisis (fosfato de sodio dibásico 82,4 mM, ácido cítrico 58,8 mM, sal sódica del ácido taurocólico hidrato al 0,25%, TX-100 al 0,5%). El homogeneizado de tejido del cerebro se centrifugó a 25.000 rpm, 4°C durante 15 min. El sobrenadante (lisado del cerebro) resultante se utilizó para medir la actividad total de β -hexosaminidasa utilizando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma). Los niveles de NGT en cerebro y plasma se midieron mediante LC-MSMS.

Tal como se muestra en la Figura 5, la chaperona farmacológica N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT) aumenta selectivamente la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje endógena en ratones C57BL6. La chaperona N-acetil-glucosamina-tiazolina está disponible por vía oral, penetra en el cerebro y aumenta selectivamente la actividad de β -hexosaminidasa endógena en los cerebros de ratones C57BL6. El tratamiento con NGT (A) demostró un aumento dependiente de la dosis en la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje en los cerebros de C57BL6 y la actividad de β -hexosaminidasa se mantenía elevada (B) por encima de niveles sin tratar durante un máximo de 1 semana después de retirar el fármaco. Niveles de N-acetil-glucosamina-tiazolina en plasma (C) y en el cerebro (D) después de la administración ad lib de 3, 10, 30, 100 ó 300 mg/kg de N-acetil-glucosamina-tiazolina.

Los datos mostrados en la Figura 6 se generaron como sigue. NGT se administró diariamente a través del agua potable a razón de 30 y 100 mg/Kg a ratones C57BL6 de tipo salvaje. Los animales fueron sacrificados los días 2, 4, 6, 8 y 15 (que representan 1, 3, 5, 7 y 14 días de dosificación, respectivamente). Para cada momento en este experimento de transcurso en el tiempo, también hubo un grupo de ratones que no recibió NGT (control no tratado). Después de la dosificación, los ratones fueron sacrificados y el tejido del cerebro se recuperó para las mediciones de la actividad enzimática. El tejido del cerebro se cortó en rebanadas en partes alícuotas de 20-30 mg y cada una de las partes alícuotas se homogeneizó en tampón de lisis (fosfato de sodio dibásico 82,4 mM, ácido cítrico 58,8 mM, sal sódica del ácido taurocólico hidrato al 0,25%, TX-100 al 0,5%). El homogeneizado de tejido del cerebro se centrifugó a 25.000 rpm, 4°C durante 15 min. El sobrenadante (lisado del cerebro) resultante se utilizó para medir la actividad total de β -hexosaminidasa utilizando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma). Para determinar los niveles de sAPP en las muestras de cerebro en el experimento de transcurso en el tiempo, 40-50 mg de tejido cerebral se trocearon y se mezclaron con 10 veces el volumen (1 ml/100 mg de tejido) de tampón de homogeneización de tejido frío (THB: sacarosa 250 mM, Tris 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, más inhibidores de la proteasa). A continuación, el tejido del cerebro se homogeneizó utilizando un homogeneizador de rotor-estator. El homogeneizado de cerebro se transfirió a un tubo de ultracentrífuga limpio, se colocó en un rotor RP70-AT pre-enfriado rápidamente y se centrifugó a 50.000 rpm (~ 100.000 g) durante 1 h a 4°C. La fracción soluble (sobrenadante) se utilizó para determinar los niveles de sAPP mediante inmunotransferencia utilizando el anticuerpo 22C11 (Millipore).

Tal como se muestra en la Figura 6, la chaperona farmacológica N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT) aumenta selectivamente la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje endógena en ratones C57BL6. La chaperona N-acetil-glucosamina-tiazolina está disponible por vía oral, penetra en el cerebro y aumenta selectivamente la actividad de β -hexosaminidasa endógena en los cerebros de ratones C57BL6. El tratamiento con NGT aumentó la actividad de β -hexosaminidasa de tipo salvaje (A) y los niveles de sAPP α neurotrófico (B) en casi 3 veces en los cerebros de ratones C57BL6 en el espacio de 7 días de tratamiento. El tratamiento con NGT no tuvo efecto alguno sobre los niveles de APP de longitud completa o sobre la expresión de genes (no mostrado).

Los datos mostrados en la Figura 7 se generaron como sigue. Fibroblastos control sanos fueron tratados durante 5 días, ya sea con NB-DANA o IFG. Las células se rasparon, se recogieron por centrifugación y el sedimento celular se solubilizó utilizando tampón RIPA (TX100 al 1%, taurodesoxicolato al 0,5% y SDS al 0,1% en TBS más inhibidores de la proteasa). El lisado celular se inmunotransfirió utilizando un anticuerpo policlonal específico para Neu1 (Novus).

Tal como se muestra en la Figura 7, la chaperona farmacológica ácido n-butil-2-desoxi-2,3-deshidro-N-acetilneuramínico (NB-DANA) aumenta selectivamente los niveles de neuraminidasa 1 endógena de tipo salvaje en fibroblastos derivados de individuos sanos. (A) La chaperona farmacológica NB-DANA aumentó los niveles de neuraminidasa 1 endógena de tipo salvaje de tipo salvaje hasta en 2 veces. (B) isofagomina (IFG), una chaperona farmacológica para la glucocerebrosidasa, no aumenta los niveles de neuraminidasa 1 de tipo salvaje en los fibroblastos. Los fibroblastos derivados de individuos sanos fueron tratados con NB-DANA o IFG durante 5 días y la actividad enzimática se midió en los lisados celulares utilizando el sustrato NANA-4-MU. La actividad enzimática se expresó como nmol de 4-MU generado por mg de proteína por hora.

Tal como se muestra en la Figura 8, la chaperona farmacológica Zanamivir aumenta los niveles de neuraminidasa 3 (Neu3) endógena de tipo salvaje en células de neuroblastoma SHSY-5Y. Los datos mostrados en la Figura 8 se generaron como sigue. Células SHSY-5Y fueron tratadas con dosis crecientes de Zanamivir o vehículo (PBS) según

- 5 se indica durante 72 horas. Las células se recogieron después de 72 horas de tratamiento, se lisaron en TBS + CHAPS al 2% y el material insoluble se separó mediante centrifugación a 40°C (20.000 rpm x 10 minutos; centrífuga Eppendorf). Se separaron los sobrenadantes, y la proteína se midió mediante BCA. Cantidades equivalentes de proteína se cargaron en un gel NuPage al 4-12% y se resolvieron por electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y la membrana se sondeó con un anticuerpo policlonal contra Neu3. Bandas Neu3-positivas se cuantificaron por densitometría. El borrón se separó y se volvió a sondar con un anticuerpo monoclonal contra tubulina como control de carga de proteínas.

REIVINDICACIONES

1. Una chaperona farmacológica para uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en donde la chaperona farmacológica se une selectivamente a y estabiliza una gangliosidasa seleccionada del grupo que consiste en β -hexosaminidasa A, β -hexosaminidasa B y β -hexosaminidasa S; y en donde la chaperona farmacológica se selecciona de:
 - 5 N-butil-desoxigalactonojirimicina (NB-DGJ)
 - N-acetil-glucosamina-tiazolina (NGT)
 - 2-acetamido-1,2-didesoxinojirimicina (AdDNJ)
 - 2-acetamido-2-desoxinojirimicina (ADNJ)
 - 10 6-acetamido-6-desoxicastanospermina
 - Pirimetamina
 - 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol (LABNAc)
 - N-bencil 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol (NBn-LABNAc)
 - N-butil 2-acetamido-1,4-imino-1,2,4-tridesoxi-L-arabinitol (NBu-LABNAc)
 - 15 DABNAc
 - hidrocloruro de (2R, 3R, 4S, 5R)-2-acetamido-3,4-dihidroxi-5-hidroxi-metil-piperidinio; (GalNAc-isofagomina HCl)
 - Galactosa O-(2-acetamido-2-desoxi-d-glucopiranosilideno)-amino-N-fenilcarbamato; (Gal-PUGNAc)
 - NAG-tiazolina (y sus derivados)
 - PUGNAc (y sus derivados)
 - 20 6-acetamido-2,6-didesoxi-2-C-hidroximetil-D-glucó- δ -lactama
 - 2-acetamido-2-desoxi-d-glucono-d-lactama
 - 2-acetamido-2-desoxi-d-glucono-desocinojirimicina
 - derivados del ácido 3-hidroxipípecólico
 - derivados de ácido 3,4,5-trihidroxipípecólico
 - 25 (3R,4R,5R,6R)-tetrahidroxiazepano
 - NAC-1-Cp
 - NAC-1-(CH₃)₂
 - (5R,6S,7S,8S)-8-acetamido-5,6,7,8-tetrahidro-5-(hidroximetil)-imidazol[1,2-a]piridina-6,7-triol
 - 2-acetamido-1,2,5-tridesoxi-1,5-imino-D-glucitol
 - 30 (2R,3R,4S,5R)-2-acetamido-5-aminometil-3,4-dihidroxi-piperidina
 - (2R,3R,4S,5R)-2-acetamido-5-hidroximetil-3,4-dihidroxi-piperidina.
2. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la chaperona se une a β -hexosaminidasa B.
3. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la chaperona farmacológica aumenta el tráfico de la gangliosidasa desde el retículo endoplásmico al citosol o desde el retículo endoplásmico al endosoma y la membrana plasmática.
4. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la chaperona farmacológica aumenta la actividad mutante y/o de tipo salvaje de la gangliosidasa.
5. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la gangliosidasa cataboliza gangliósidos; y en donde la gangliosidasa es β -hexosaminidasa B y los gangliósidos son GA2 y GM2.
6. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la chaperona farmacológica es 2-acetamido-1,2-dihidroxinojirimicina.
7. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la chaperona farmacológica es N-acetil-glucosamina-tiazolina.
8. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la chaperona farmacológica es N-butil-desoxigalactonojirimicina.
9. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la enfermedad de Alzheimer es la enfermedad de Alzheimer familiar de brote temprano.
10. Una chaperona farmacológica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la enfermedad de Alzheimer es provocada por el síndrome de Down.

Figura 1

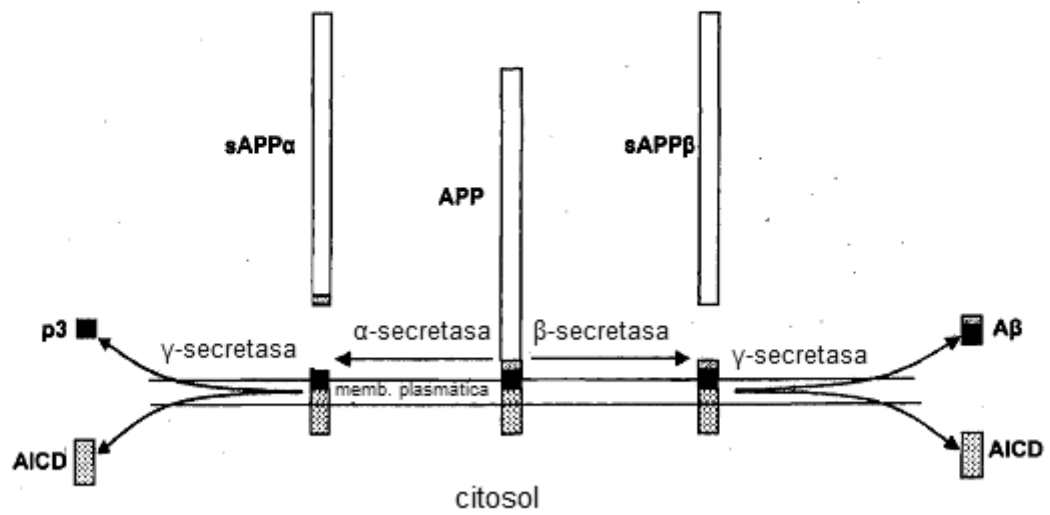


Figura 2

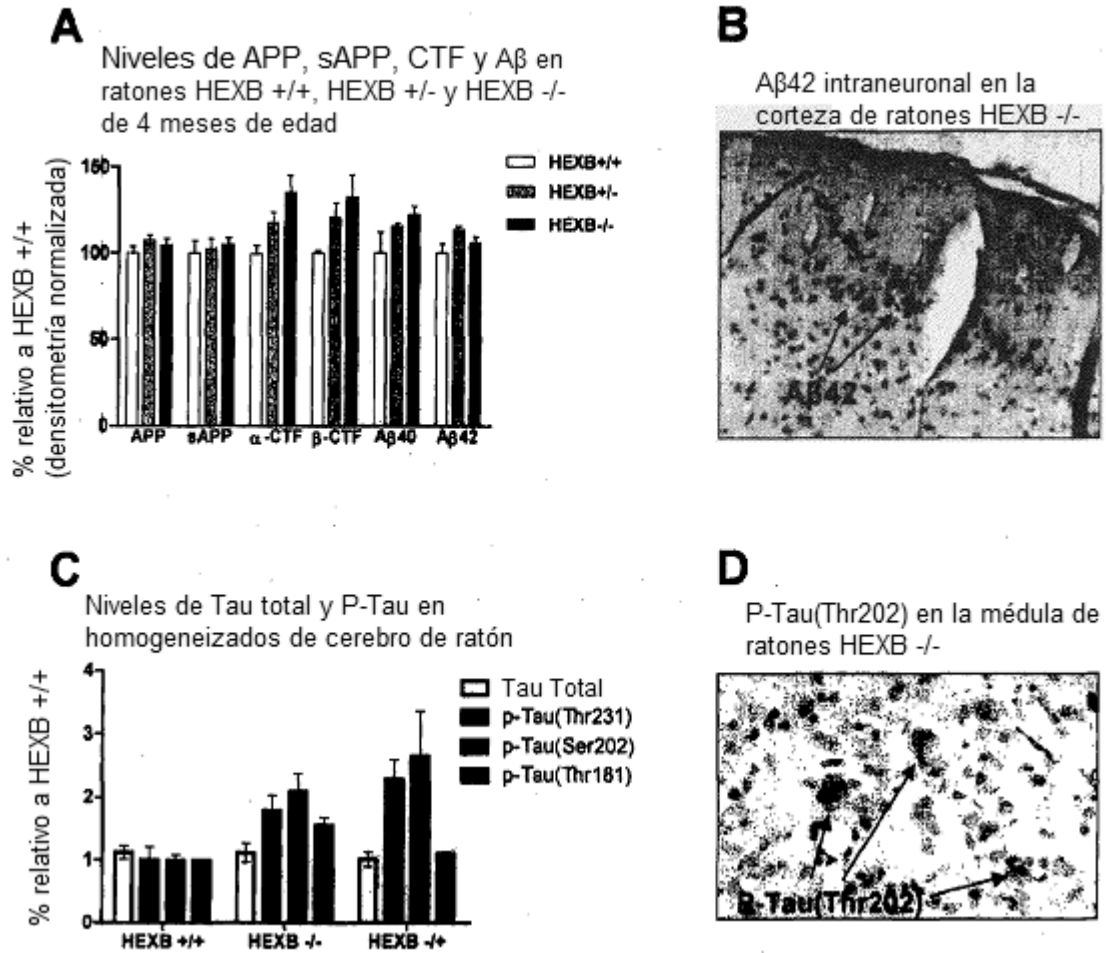


Figura 3

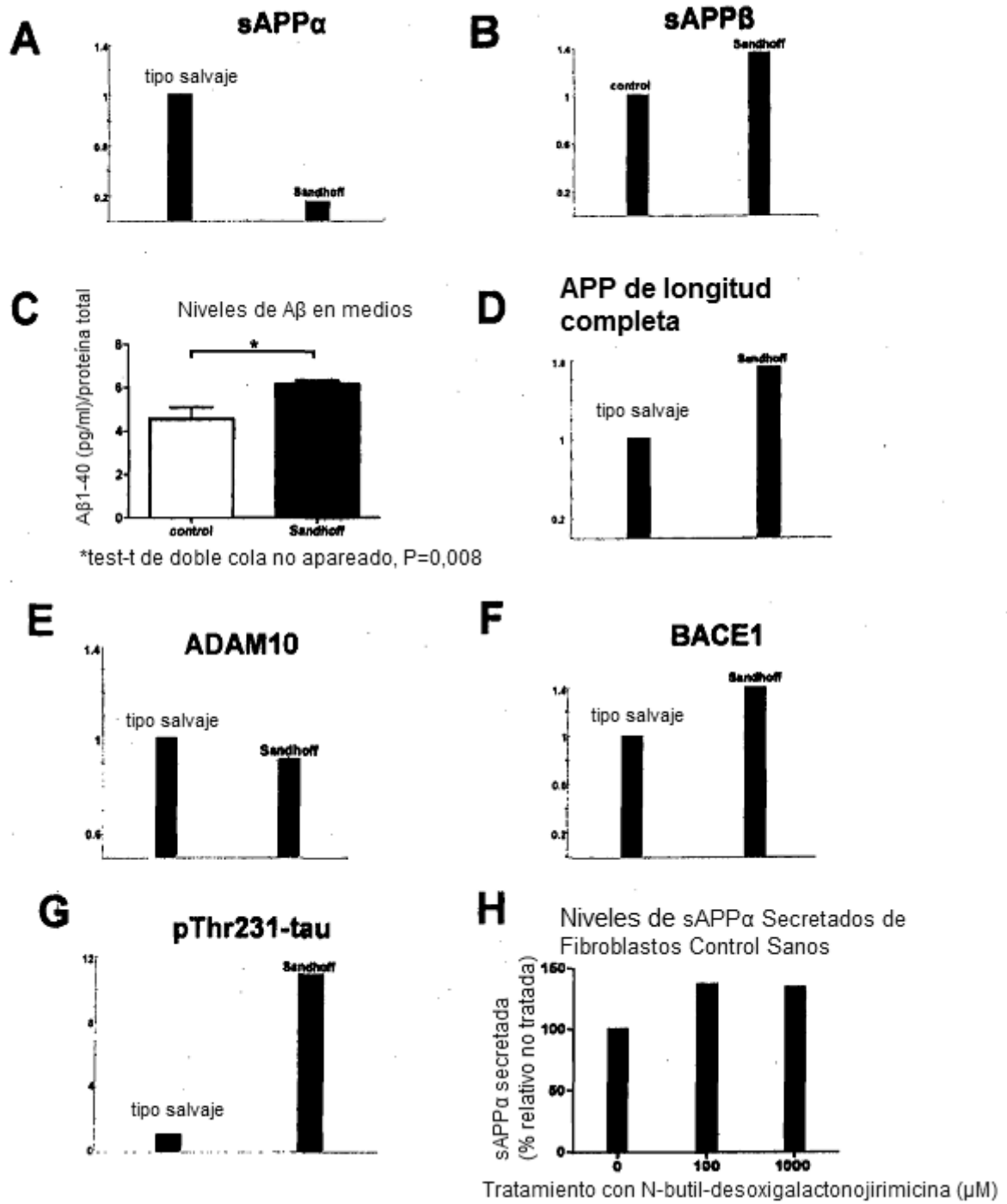
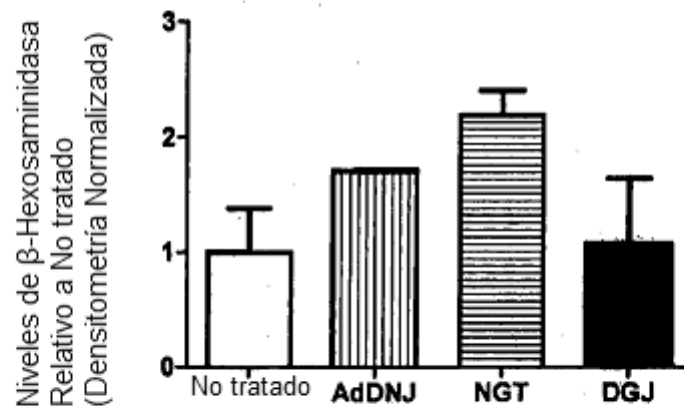


Figura 4

A

Niveles de β -Hex en Neuroblastomas de Ratón N2A
(tratados 3 días con 10 μ M de AdDNJ, NGT o DGJ)

**B**

Niveles de sAPP α en Neuroblastomas de Ratón N2A (tratados 3 días con 10 μ M de AdDNJ o NGT)

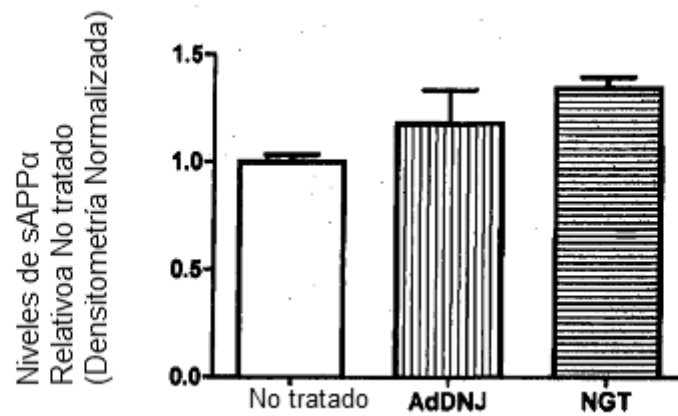


Figura 5

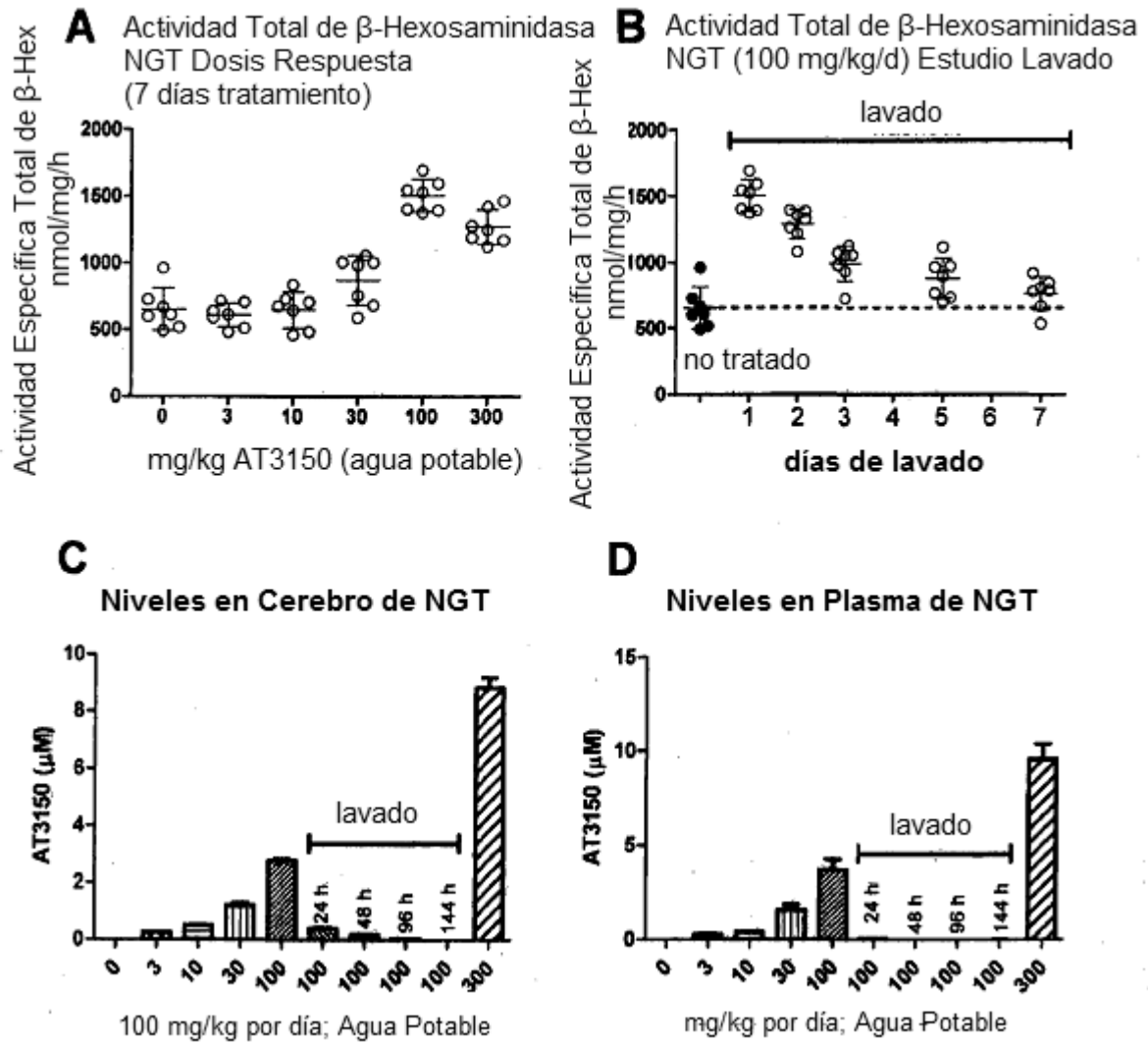


Figura 6

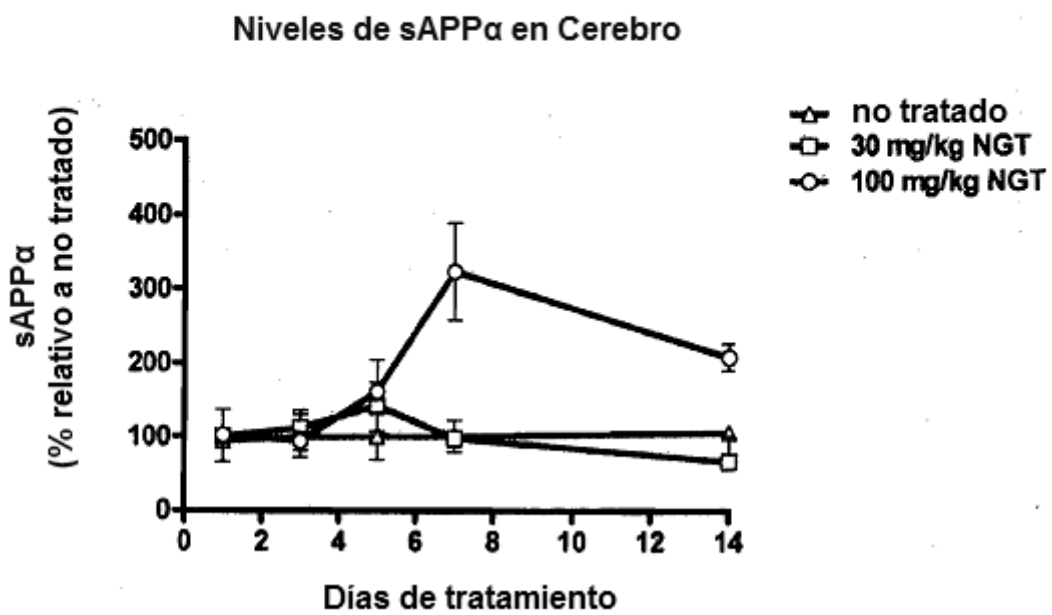
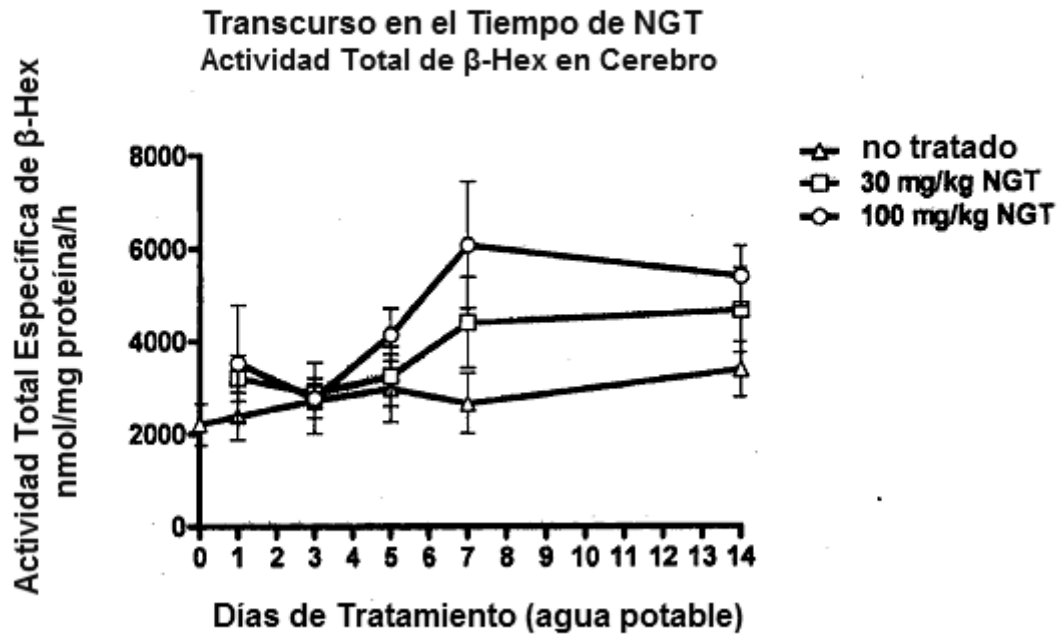


Figura 7

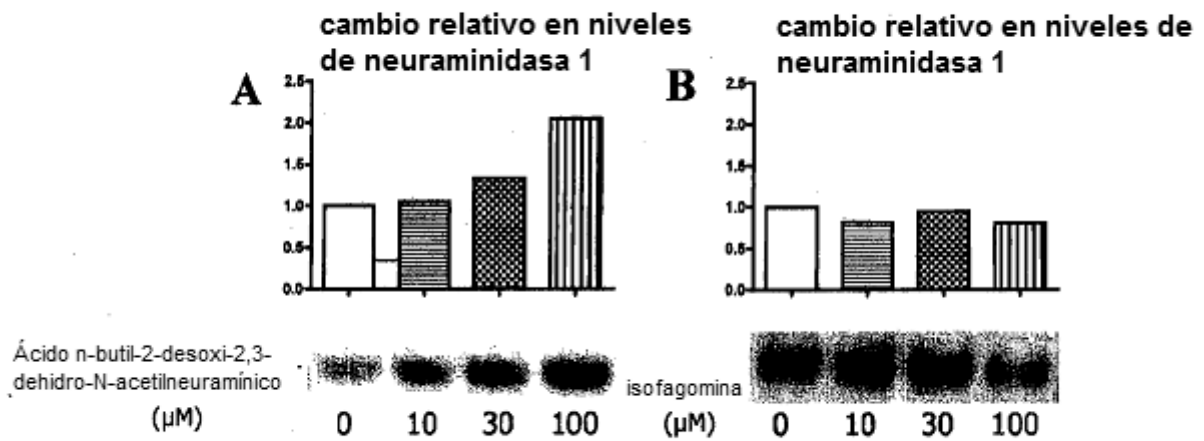


Figura 8

