

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 908**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2009** **E 13178928 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2659904**

54 Título: **Uso de Hsp70 como regulador de la actividad enzimática**

30 Prioridad:

**26.06.2008 DK 200800885**

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

**11.01.2016**

73 Titular/es:

**ORPHAZYME APS (100.0%)  
c/o COBIS A/S Ole Maaløes Vej 3  
2200 Copenhagen N, DK**

72 Inventor/es:

**JENSEN, THOMAS KIRKEGAARD y  
JAATTELA, MARJA HELENA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 555 908 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

Uso de Hsp70 como regulador de la actividad enzimática

Esta solicitud es una solicitud no provisional de la solicitud de patente de DK PA 2008 00885 presentada el 26 de junio de 2008, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Todas las referencias de patente y no patente citadas en la solicitud provisional, o en la presente solicitud, también se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

### Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la modulación de la actividad enzimática aprovechando la interacción entre la chaperona molecular Hsp70 y el fosfolípido lisosómico bis(monoacilglicero)fosfato (BMP, también conocido con el nombre de LBPA). La interacción de Hsp70-BMP modula la actividad de enzimas del compartimento lisosómico que interaccionan con BMP y, por tanto, la presente invención proporciona un medio para revertir la patología de enfermedades de almacenamiento lisosómico.

### Antecedentes de la invención

Las chaperonas moleculares se encuentran en todos los compartimentos de una célula donde se producen reordenamientos conformacionales de proteínas y, aunque la síntesis de proteínas es la fuente principal de péptidos no plegados en la célula, la exposición de la célula a temperatura alta u otros estímulos que puedan hacer a las proteínas estructuralmente lábiles y, por lo tanto, propensas a no plegarse y agregarse, se supera con una respuesta celular específica que implica la producción de proteínas protectoras. Esta respuesta es un fenómeno observado en todos los tipos de células, desde las procariotas hasta las eucariotas, y se hace referencia a ella como la respuesta de choque térmico o de estrés. Las proteínas inducidas por esta respuesta se conocen como las proteínas de choque térmico (HSP), de las cuales existen varias familias.

Un ejemplo principal de una familia de chaperonas son las proteínas Hsp70. Esta familia se ha implicado recientemente en otros aspectos de la homeostasis celular además de funcionar como chaperona, principalmente a través de sus características anti-apoptóticas, sus funciones en inmunidad y la aparente dependencia de las células cancerosas de la regulación por incremento de Hsp70. Además, la Hsp70 puede desempeñar un papel de protección de la integridad lisosómica. Sin embargo, su mecanismo molecular ha permanecido sin aclarar.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades raras, caracterizadas por la acumulación de sustancias en el compartimento lisosómico y su consiguiente desestabilización, con un efecto resultante devastador para los individuos afectados. Las sustancias se acumulan en el compartimento lisosómico debido a deficiencias en las enzimas implicadas en su catabolismo.

Hasta el momento, no se dispone de ningún tratamiento para la mayoría de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. La causa subyacente de este grupo de enfermedades es la incapacidad de enzimas lisosómicas específicas de catabolizar de manera eficaz sustancias lisosómicas específicas tales como lípidos. Por lo tanto, el uso del tratamiento de restitución de enzimas (ERT), proporcionando al paciente la enzima recombinante, se ha empleado para un subconjunto de estas enfermedades, incluidas las enfermedades de Gaucher y de Fabry. Sin embargo, el ERT es una forma muy cara de tratamiento, lo que puede limitar su uso en algunas zonas, y también es eficaz solo frente al tipo específico de enfermedad para la que se ha producido la enzima recombinante. La presente invención tiene como objetivo proporcionar nuevos medios para tratar los trastornos de almacenamiento lisosómico.

### Sumario de la invención

En la presente invención, se divulgan las bases moleculares de la contribución de la Hsp70 a la estabilidad de la membrana lisosómica, proporcionando una interpretación de las bases moleculares para la asociación entre Hsp70 y las membranas celulares, en particular las membranas plasmáticas y lisosómicas.

Se conoce por la literatura que la Hsp70 puede desempeñar un papel en la protección de la integridad lisosómica. Sin embargo, su mecanismo molecular ha permanecido sin aclarar. Además, la cuestión de si esta cualidad es específica para la Hsp70 inducible por estrés principal (HspA1A/A1B - denominada Hsp70 a lo largo de este estudio) o si otros miembros de la familia Hsp70 podrían tener la misma característica tampoco se había abordado.

Estas preguntas sin responder inspiraron uno de los principales objetivos de esta invención, que era estudiar las bases moleculares del efecto protector de lisosomas de Hsp70. Con este fin, se ideó un procedimiento para la producción de la Hsp70 recombinante y sus mutantes, así como un protocolo de fraccionamiento subcelular a base de ultracentrifugación con un gradiente de iodixanol. Se estableció un ensayo para la evaluación directa de la integridad de la membrana lisosómica basado en la permeabilización de lisosomas inducida por fotooxidación, lo que permitió un enfoque microscópico en tiempo real para evaluar el efecto de Hsp70 y otros componentes con respecto a su capacidad para sensibilizar o proteger las membranas lisosómicas. La interacción de Hsp70 recombinante y mutantes con diversos lípidos se estudió en diferentes sistemas *in vitro*, incluyendo medidas de dispersión de luz a 90° de liposomas, desplazamientos de fluorescencia por triptófano y resonancia de plasmón superficial (BIAcore).

La creación de un modelo conceptual para la interacción de Hsp70-BMP se facilitó mediante modelización de superficie electrostática de Hsp70 *in silico*. Con el fin de comprobar la importancia *in vivo* de la interacción de lípidos observada en los sistemas *in vitro*, se marcó la interacción de BMP-Hsp70 con respecto a ambos componentes. Para demostrar adicionalmente la factibilidad de aprovechar este mecanismo, se caracterizó el modo de muerte celular inducida por la administración de cisplatino y se marcó la Hsp70 en este sistema de muerte celular en líneas celulares tanto cancerosas como no transformadas.

Con el fin de abordar las bases moleculares para la contribución de la Hsp70 a la estabilidad de la membrana lisosómica, los inventores trataron de establecer un sistema que eliminara la influencia de la Hsp70 citosólica, es decir, fue necesario dirigir la Hsp70 directamente a los lisosomas. Las imágenes de microscopía electrónica por Nylandsted et al. mostraron que la Hsp70 podría estar presente dentro de los lisosomas y, por tanto, se decidió establecer un procedimiento para la producción de Hsp70 humana recombinante (rHsp70) con la esperanza de aprovechar la maquinaria endocítica como ruta de administración de la rHsp70 directamente a los lisosomas. Los presentes inventores sortearían de este modo la necesidad de añadir señales de clasificación lisosómica a la Hsp70, alterando potencialmente la función y evitando complicaciones que podrían surgir debido a la sobreexpresión. Además, un enfoque endocítico permitiría una valoración de las cantidades de rHsp70 y en una perspectiva a más largo plazo, abre posibilidades para estudiar el mecanismo de incorporación de Hsp70 extracelular.

Una vez establecido el procedimiento de producción de Hsp70, se marcó con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Hsp70-AF488) con el fin de comprobar su endocitosis. La formación de imágenes confocales reveló que, en efecto, la rHsp70 podía dirigirse a lisosomas de esta manera. Con el fin de evaluar el impacto sobre la estabilidad de las membranas lisosómicas, los inventores idearon un procedimiento para cuantificar la permeabilización de la membrana lisosómica a nivel de lisosomas solos y utilizaron este procedimiento para evaluar el efecto de la rHsp70 endocitada. Estos procedimientos constituyeron la base para los ejemplos 1 y 2, en los que los inventores muestran que la Hsp70 potencia la supervivencia celular mediante la estabilización de los lisosomas a través de una unión de alta afinidad dependiente de pH al fosfolípido aniónico endolisosómico bis(monoacilglicero)fosfato (BMP). El dominio ATPasa cargado positivamente de la Hsp70 es responsable de la unión, pero el dominio de unión de sustrato también es necesario para la estabilización eficaz de los lisosomas. Es interesante el hecho de que esta interacción, y la protección que ofrece, dependen del triptófano 90, que se sitúa en la cuña cargada positivamente del dominio ATPasa. Es importante el hecho de que el efecto citoprotector podría obtenerse mediante la administración de rHsp70 endocítica y revertirse mediante administración extracelular de anticuerpos frente a BMP o inhibidores de Hsp70.

Además de esto, los inventores también trataron de acoplar el mecanismo de la protección de la Hsp70 de membranas lisosómicas a los acontecimientos de tumorigénesis y muerte celular programada. Así, los inventores caracterizaron la muerte celular programada iniciada por la administración de un agente quimioterapéutico común, cisplatino, y descubrieron que era independiente de las caspasas, pero se caracterizaba por la liberación lisosómica de proteasas. La Hsp70 transgénica, así como la endocitada, puede potenciar la supervivencia celular ante la exposición a cisplatino mediante la estabilización de las membranas lisosómicas. Es interesante el hecho de que los inventores muestran que dirigir la propia Hsp70 lisosómica o su compañero de interacción lisosómica bis(monoacilglicero)fosfato (BMP), sensibilizó líneas celulares prostáticas transformadas, pero no las no transformadas, frente a cisplatino, lo que proporciona pruebas experimentales para aprovechar la interacción de BMP-Hsp70 como diana farmacológica en el tratamiento del cáncer.

Es interesante el hecho de que la Hsp70-2, aunque comparte el 86 % de homología de aminoácidos con la Hsp70, no pudo proteger las membranas lisosómicas directamente. Sin embargo, la disminución de la Hsp70-2 también da como resultado la permeabilización de las membranas lisosómicas y la subsiguiente muerte celular programada. Este efecto no depende de una interacción directa entre la Hsp70-2 y el compartimento lisosómico, sino que más bien se controla por medio de la regulación por disminución del factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino (LEDGF), en respuesta a la disminución de la Hsp70-2.

Los procedimientos y resultados de esta investigación se abordan más detalladamente en la sección de ejemplos.

Habiendo elucidado en el presente documento las bases moleculares del efecto citoprotector de la Hsp70 por medio de la interacción con el BMP lisosómico para promover la estabilización lisosómica, estos hallazgos proporcionan la base para dirigir el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico.

Se ha demostrado ahora que, sorprendentemente, proporcionar Hsp70 recombinante a células revierte de manera eficaz la patología de las enfermedades de almacenamiento lisosómico, como se muestra en el presente documento para la enfermedad de Niemann-Pick y la enfermedad de Farber. Además, proporcionar el inductor de Hsp70 alcohol bencílico a células revierte de manera eficaz la patología de enfermedades de almacenamiento lisosómico como se muestra en el presente documento para la enfermedad de Niemann-Pick.

La presente invención proporciona así un procedimiento para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico mediante el incremento directo o indirecto de la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70 en individuos que lo necesitan, proporcionando un inductor o coinductor de Hsp70.

La presente invención se refiere en un aspecto a un agente bioactivo capaz de incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70 para su uso como medicamento o para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.

En una realización, dicho agente bioactivo es un inductor o coinductor de Hsp70.

- 5 También es un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención a un individuo que lo necesita.

En una realización, dicho tratamiento es profiláctico, curativo o de mejora.

- 10 En una realización, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Farber, la enfermedad Krabbe, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, sialidosis, leucodistrofia metacromática y deficiencia de saposina.

En otra realización, dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico se caracteriza por tener actividad enzimática residual de la enzima defectuosa implicada en la patología de la enfermedad.

- 15 La presente invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento.

- 20 También se divulga un procedimiento para modular la actividad enzimática de una enzima, en el que dicha enzima interacciona con BMP, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, en una forma adecuada para permitir la interacción entre BMP y Hsp70, o dicho fragmento o variante funcional de la misma, y de este modo modular la actividad enzimática de una enzima que interacciona con BMP.

También se divulga un procedimiento para incrementar la incorporación de un compuesto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar dicho compuesto junto con Hsp70 o un fragmento o variante funcional de la misma.

- 25 Una realización de la invención se refiere a un procedimiento para la regulación por incremento de una actividad enzimática de una enzima asociada con un trastorno de almacenamiento lisosómico, tal como los de Niemann-Pick, de Gaucher, de Farber, de Krabbe, de Fabry y la sialidosis. Preferentemente, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es el de Niemann-Pick.

- 30 Dado que los trastornos de almacenamiento lisosómico son provocados por una actividad enzimática insuficiente, el objetivo de la invención es incrementar la actividad enzimática con el fin de aliviar o curar el trastorno.

- 35 Se ha demostrado que la Hsp70 interaccionan con BMP. Dado que el BMP actúa como cofactor para otras proteínas diversas, la interacción entre la Hsp70 y el BMP pueden modular la función de estas otras proteínas diversas. Por ejemplo, el BMP actúa como cofactor para la aSMasa. Por tanto, la interacción entre la Hsp70 y el BMP puede incrementar la actividad de la aSMasa. Dado que el trastorno de Niemann-Pick se asocia con una actividad reducida de la aSMasa, la Hsp70 puede aliviar o curar el trastorno de Niemann-Pick incrementando la actividad de la aSMasa. Del mismo modo, el BMP actúa como un cofactor para la saposina A, la saposina B, la saposina C y la saposina D. Estas proteínas saposinas están implicadas en otros trastornos de almacenamiento lisosómico y, por lo tanto, la Hsp70 puede aliviar o curar otros trastornos de almacenamiento lisosómico incrementando la actividad de una saposina o de una enzima asociada con dicha saposina.

- 40 En una realización de la invención, el agente bioactivo se administra junto con tratamiento de restitución de enzimas en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico. De este modo, la cantidad de enzima necesaria puede reducirse significativamente debido al efecto activador de la enzima de la Hsp70.

También se divulga Hsp70 usada para facilitar la incorporación de enzimas en el tratamiento de restitución de enzimas, incrementando de este modo la cantidad de enzima que se ha incorporado por las células pertinentes.

#### 45 Definiciones y abreviaturas

- |              |  |
|--------------|--|
| aSMasa / ASM | Esfingomielinasa ácida                       |
| ADD70:       | Señuelo derivado del AIF para Hsp70          |
| AIF:         | Factor inductor de la apoptosis              |
| AO:          | Naranja de acridina                          |
| 50 Apaf-1:   | Factor activador de la proteasa apoptótica 1 |

## ES 2 555 908 T3

	Bag-1:	Atanógeno asociado a Bcl-2 1
	Bcl-2:	Linfoma/leucemia de linfocitos B 2
	Bid:	Agonista de muerte de dominio de interacción BH3
	BMP:	Bis(monoacilglicero)fosfato
5	CARD:	Dominio de reclutamiento de caspasas
	Caspasa:	Proteasa específica de aspartato y cisteína
	CHIP:	Proteína de unión al extremo carboxilo de Hsp70
	CytC:	Citocromo C
	DD:	Dominio de muerte
10	DED:	Dominio efector de muerte
	ARNds:	ARN bicatenario
	eHsp70:	Hsp70 extracelular
	RE:	Retículo endoplásmico
	ERT	Tratamiento de restitución de enzimas
15	FADD:	Proteína que contiene un dominio de muerte asociado a Fas
	HIP:	Proteína que interacciona con Hsp70
	HRP:	Peroxidasa de rábano picante
	HS:	Choque térmico/estrés
	HSE:	Elemento de choque térmico
20	HSF:	Factor de choque térmico
	Hsp:	Proteína de choque térmico
	HspBP1:	Proteína de unión a proteína de choque térmico 1
	IAP:	Proteína inhibidora de la apoptosis
	iMEF	Fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados
25	JNK:	Quinasa c-jun NH2-terminal
	LAMP-1/-2:	Proteína de membrana asociada a lisosomas -1/-2
	LBPA:	Ácido lisobisfosfatídico
	LEDGF:	Factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino
	LMP:	Permeabilización de membrana lisosómica
30	MIC-1:	Citoquina inhibidora de macrófagos 1
	MOMP:	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
	MPR	Receptor de manosa 6-fosfato
	MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
	NPD	Enfermedad de Niemann-Pick
35	NPDA	Enfermedad de Niemann-Pick, tipo A
	NPDB	Enfermedad de Niemann-Pick, tipo B
	NPDC	Enfermedad de Niemann-Pick, tipo C

	NPDD	Enfermedad de Niemann-Pick, tipo D
	PCD:	Muerte celular programada
	PKC:	Proteína quinasa C
	POPC:	Palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina
5	POPS:	Palmitoil-oleoil-fosfatidilserina
	ARNi:	ARN de interferencia
	ROS:	Especies reactivas de oxígeno
	DE:	Desviación estándar
	siARN:	ARN corto de interferencia
10	Smac/Diablo:	Segundo activador de caspasas de origen mitocondrial
	tBid:	Bid truncado
	TNF:	Factor de necrosis tumoral
	TNFR:	Receptor de TNF
	TRADD:	Proteína con dominio de muerte asociado a TNRF
15	TRAF:	Factor asociado al TNFR

Trastorno de almacenamiento lisosómico (LSD): Los términos “trastorno de almacenamiento lisosómico” y “enfermedad de almacenamiento lisosómico” se usan como sinónimos.

Fragmento funcional de Hsp70: El término “fragmento funcional de Hsp70” debe interpretarse con el significado de cualquier fragmento de Hsp70 que tenga la función deseada. En relación con la modulación de la actividad enzimática, un fragmento funcional es un fragmento capaz de modular la actividad enzimática. En relación con el incremento de la incorporación de una sustancia, un fragmento funcional de Hsp70 es un fragmento capaz de incrementar la incorporación de dicha sustancia. Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto del fragmento funcional puede ser diferente del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, el fragmento funcional, de hecho, puede ser más eficaz que la molécula de longitud completa. Además, el uso de fragmentos en lugar de moléculas de longitud completa puede ser ventajoso en vista del menor tamaño de los fragmentos.

Variante funcional de Hsp70: El término “variante funcional de Hsp70” debe interpretarse con el significado de cualquier variante de Hsp70 que tenga la función deseada. En relación con la modulación de la actividad enzimática, una variante funcional es una variante capaz de modular la actividad enzimática. En relación con el incremento de la incorporación de una sustancia, una variante funcional de Hsp70 es una variante capaz de incrementar la incorporación de dicha sustancia. Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto de la variante funcional puede ser diferente del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, la variante funcional, de hecho, puede ser más eficaz que la molécula de longitud completa.

Un “agente bioactivo” (es decir, una sustancia/agente biológicamente activo) es cualquier agente, fármaco, compuesto, composición de materia o mezcla que proporcione algún efecto farmacológico, frecuentemente beneficioso, que pueda demostrarse *in vivo* o *in vitro*. Como se usa en el presente documento, este término incluye adicionalmente cualquier sustancia fisiológicamente o farmacológicamente activa que produzca un efecto localizado o sistémico en un individuo. Los ejemplos adicionales de agentes bioactivos incluyen, pero no se limitan a, agentes que comprenden o que consisten en un oligosacárido, agentes que comprenden o que consisten en un polisacárido, agentes que comprenden o que consisten en un péptido opcionalmente glucosilado, agentes que comprenden o que consisten en un polipéptido opcionalmente glucosilado, agentes que comprenden o que consisten en un ácido nucleico, agentes que comprenden o que consisten en un oligonucleótido, agentes que comprenden o que consisten en un polinucleótido, agentes que comprenden o que consisten en un lípido, agentes que comprenden o que consisten en un ácido graso, agentes que comprenden o que consisten en un éster de ácido graso y agentes que comprenden o que consisten en metabolitos secundarios. Puede usarse de manera profiláctica, terapéutica, en relación con el tratamiento de un individuo, tal como un ser humano o cualquier otro animal. Como se usa en el presente documento, un agente bioactivo es una sustancia capaz de incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de la Hsp70.

Los términos “fármaco” o “medicamento” como se usan en el presente documento incluyen sustancias biológicamente, fisiológicamente o farmacológicamente activas que actúan localmente o sistémicamente en el organismo de un ser humano o un animal.

Los términos “tratar”, “tratamiento” y “terapia” como se usan en el presente documento se refieren por igual al tratamiento profiláctico o preventivo y al tratamiento de mejora o paliativo. El término incluye un enfoque para obtener resultados fisiológicos beneficiosos o deseados, que pueden establecerse clínicamente. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitarse a, alivio de síntomas, disminución del alcance de la enfermedad, afección estabilizada (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión o el empeoramiento de la afección/los síntomas, mejora o paliación de la afección o los síntomas y remisión (sea parcial o total), sean detectables o indetectables. El término “paliación” y sus variaciones, como se usan en el presente documento, significa que el grado y/o las manifestaciones indeseables de una afección o síntoma fisiológicos se reducen y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o se alarga, en comparación con no administrar composiciones de la presente invención.

Un “efecto de tratamiento” o “efecto terapéutico” se manifiesta si se produce un cambio en la afección que se está tratando, medido mediante los criterios que constituyen la definición de los términos “tratar” y “tratamiento”. Se produce un “cambio” en la afección que se está tratando si existe al menos el 5 % de mejoría, preferentemente el 10 % de mejoría, más preferentemente al menos el 25 %, incluso más preferentemente al menos el 50 %, tal como al menos el 75 %, y más preferentemente al menos el 100 % de mejoría. El cambio puede basarse en la mejora de la gravedad de la afección tratada en un individuo o en una diferencia en la frecuencia de afecciones mejoradas en las poblaciones de individuos con y sin tratamiento con el agente bioactivo o con el agente bioactivo en combinación con una composición farmacéutica de la presente invención.

“Cantidad farmacológicamente eficaz”, “cantidad farmacéuticamente eficaz” o “cantidad fisiológicamente eficaz” de un “agente bioactivo” es la cantidad de un agente activo presente en una composición farmacéutica como se describe en el presente documento necesaria para proporcionar un nivel deseado de agente activo en el torrente circulatorio o en el sitio de acción en un individuo (p. ej., los pulmones, el aparato gástrico, el aparato colorrectal, la próstata, etc.) que se va a tratar para proporcionar una respuesta fisiológica anticipada cuando se administra dicha composición. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, p. ej., el agente activo, la actividad de la composición, el dispositivo de administración empleado, las características físicas de la composición, el uso pretendido para el paciente (es decir, el número de dosis administradas al día), las consideraciones del paciente y similares, y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en el presente documento. Una “cantidad eficaz” de un agente bioactivo puede administrarse en una administración o por medio de varias administraciones de una cantidad que sumen una cantidad eficaz, preferentemente en un periodo de 24 horas. Puede determinarse usando procedimientos clínicos estándar para determinar las cantidades y la pauta de administración adecuadas. Se entiende que la “cantidad eficaz” puede ser el resultado de la determinación empírica y/o individualizada (caso por caso) por parte del profesional sanitario encargado del tratamiento y/o del individuo.

Los términos “potenciar” y “mejorar” un efecto beneficioso y sus variaciones, como se usan en el presente documento, se refieren al efecto terapéutico del agente bioactivo frente a placebo o a un incremento del efecto terapéutico de un tratamiento médico del estado de la técnica superior al obtenido normalmente cuando se administra una composición farmacéutica sin el agente bioactivo de esta invención. “Un incremento de los efectos terapéuticos” se manifiesta cuando existe una aceleración y/o un incremento de la intensidad y/o el alcance de los efectos terapéuticos obtenido como consecuencia de administrar el/los agente(s) bioactivo(s). También incluye la prolongación de la duración de los beneficios terapéuticos. También puede manifestarse cuando se necesita una cantidad menor de la composición farmacéutica para obtener los mismos beneficios y/o efectos cuando se coadministra con agente(s) bioactivo(s) proporcionados por la presente invención en comparación con la administración de una mayor cantidad de la composición farmacéutica en ausencia de agente bioactivo. Preferentemente, aunque no necesariamente, el efecto potenciador da lugar al tratamiento de síntomas agudos para los que la composición farmacéutica sola no es terapéuticamente eficaz o es menos eficaz. La potenciación se logra cuando existe un incremento de al menos el 5 % de los efectos terapéuticos, tal como un incremento de al menos el 10 % de los efectos terapéuticos cuando un agente bioactivo de la presente invención se coadministra con una composición farmacéutica en comparación con la administración de la composición farmacéutica sola. Preferentemente, el incremento es de al menos el 25 %, más preferentemente de al menos el 50 %, incluso más preferentemente de al menos el 75 %, lo más preferentemente de al menos el 100 %.

“Coadministrar” o “coadministración” de agente(s) bioactivo(s) o de agentes bioactivos y medicamentos del estado de la técnica, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de uno o más agentes bioactivos de la presente invención o a la administración de uno o más agentes bioactivos de la presente invención y una composición farmacéutica del estado de la técnica en un periodo de tiempo determinado. Preferentemente, el periodo de tiempo es de menos de 72 horas, tal como de 48 horas, por ejemplo, de menos de 24 horas, tal como de menos de 12 horas, por ejemplo, de menos de 6 horas, tal como de menos de 3 horas. Sin embargo, estos términos también significan que el agente bioactivo y una composición terapéutica pueden administrarse juntos.

El término “individuo” se refiere a vertebrados, en particular a un miembro de una especie de mamíferos, preferentemente primates, incluidos seres humanos. En una realización preferida, un individuo como se usa en el presente documento es un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad.

Un “individuo que lo necesita” se refiere a un individuo que puede beneficiarse de la presente invención. En una

realización, dicho individuo que lo necesita es un individuo enfermo, en la que dicha enfermedad es una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

El término “nucleótido natural” o “nucleótido” se refiere a cualquiera de los cuatro desoxirribonucleótidos, dA, dG, dT y dC (que constituyen el ADN) y los cuatro ribonucleótidos, A, G, U y C (que constituyen el ARN), que se encuentran en la naturaleza. Cada nucleótido natural comprende o consiste esencialmente en un resto de azúcar (ribosa o desoxirribosa), un resto de fosfato y un resto de base natural/estándar. Los nucleótidos naturales se unen a nucleótidos complementarios de acuerdo con normas de apareamiento de bases bien conocidas (Watson y Crick), donde la adenina (A) se aparea con timina (T) o uracilo (U); y donde la guanina (G) se aparea con citosina (C), en las que los pares de bases correspondientes forman parte de hebras de nucleótidos antiparalelas complementarias. El apareamiento de bases da como resultado una hibridación específica entre nucleótidos predeterminados y complementarios. El apareamiento de bases es la base por la que las enzimas pueden catalizar la síntesis de un oligonucleótido complementario al oligonucleótido molde. En esta síntesis, los bloques de construcción (normalmente los trifosfatos de ribo o desoxirriboderivados de A, T, U, C o G) son dirigidos por un oligonucleótido molde para formar un oligonucleótido complementario con la secuencia complementaria correcta. El reconocimiento de una secuencia de oligonucleótidos por su secuencia complementaria está mediada por las bases correspondientes que interaccionan y forman pares de bases. En la naturaleza, las interacciones específicas que dan lugar al apareamiento de bases vienen determinadas por el tamaño de las bases y el patrón de dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno de las bases. A base de purina grande (A o G) se aparea con una base de pirimidina pequeña (T, U o C). Adicionalmente, el reconocimiento de pares de bases entre bases está influido por los enlaces de hidrógeno formados entre las bases. En la geometría del apareamiento de bases de Watson-Crick, un anillo de seis elementos (una pirimidina de oligonucleótidos naturales) se yuxtapone a un sistema de anillos compuesto por un anillo de seis elementos condensado y un anillo de cinco elementos (una purina de oligonucleótidos naturales), con un enlace de hidrógeno intermedio enlazando dos átomos de anillo y enlaces de hidrógeno en cualquiera de los lados uniendo los grupos funcionales unidos a cada uno de los anillos, con los grupos dadores apareados con los grupos aceptores.

Como se usa en el presente documento, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fragmentos generados por cualquiera de ligadura, escisión, acción endonucleasa y acción exonucleasa. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos naturales (tales como ADN y ARN) o análogos de nucleótidos naturales (p. ej., formas alfa-enantioméricas de nucleótidos naturales) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener modificaciones en restos de azúcar y/o restos de bases de pirimidina o purina. Las modificaciones de azúcares incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azida o pueden funcionalizarse los azúcares como éteres o ésteres. Además, puede reemplazarse todo el resto de azúcar con estructuras estéricamente y electrónicamente similares, tales como análogos de aza-azúcares y azúcares carbocíclicos. Los ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden enlazarse mediante enlaces fosfodiéster o análogos de tales enlaces. Los análogos de los enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato y similares. El término “molécula de ácido nucleico” también incluye, p.ej., los llamados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácido nucleico naturales o modificadas unidas a un esqueleto de poliamida. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

El término “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' (SEQ ID NO: 5) es complementaria a 5' CCCGTGCAT 3' (SEQ ID NO: 6).

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que se ha aislado a partir de una especie en particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

Una “construcción de molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, ya sea mono o bicatenaria, que se ha modificado por medio de la intervención humana para que contenga segmentos de ácido nucleico combinados y yuxtapuestos en una disposición que no existe en la naturaleza.

“ADN lineal” se refiere a moléculas de ADN no circulares con los extremos 5' y 3' libres. El ADN lineal puede prepararse a partir de moléculas de ADN circulares cerradas, tales como plásmidos, por digestión enzimática o alteración física.

“ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenario que se forma a partir de un molde de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Normalmente, se emplea un cebador complementario a porciones de ARNm



para el inicio de la transcripción inversa. Los expertos en la técnica también usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN bicatenario que consiste en una molécula de ADN monocatenario y su hebra de ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc que se sintetiza a partir de un molde de ARN.

- 5 “ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o una población de moléculas de ADN que no existen de forma natural en una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogas para una célula huésped determinada pueden contener ADN derivado de la especie de la célula huésped (es decir, ADN endógeno) siempre que el ADN del huésped se combine con ADN que no es del huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN que no es del huésped que codifica un polipéptido unido de manera
- 10 funcional a un segmento de ADN del huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera una molécula de ADN heterólogo. Por el contrario, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen endógeno unido de forma funcional con un promotor exógeno. Como otro ejemplo, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula natural se considera ADN heterólogo si esa molécula de ADN se introduce en una célula mutante que carece del gen silvestre.
- 15 Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácido preferentemente unidos exclusivamente por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintéticamente. Un polipéptido producido mediante la expresión de una molécula de ADN que no es del huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”. El término “polipéptido” como se usa en el presente documento abarca proteínas, péptidos y polipéptidos, en el que dichos polipéptidos, péptidos o proteínas pueden o no haber sufrido modificaciones postraduccionales. La modificación postraduccional puede ser,
- 20 por ejemplo, fosforilación, metilación y glucosilación.

El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un gen o un producto génico.

- “Hibridar” significa alinear hebras de ácidos nucleicos de diferentes fuentes; esto es, formar pares de bases entre regiones complementarias de dos hebras de ADN que no estaban apareadas originalmente. El término “hibridación bajo condiciones rigurosas” se define de acuerdo con Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold
- 25 Spring Harbor, Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. Preferentemente, la hibridación bajo condiciones rigurosas significa que, después de un lavado durante 1 h con SSC 1 vez y SDS al 0,1 % a 50 grados C, preferentemente a 55 grados C, más preferentemente a 62 grados C y lo más preferentemente a 68 grados C, en particular durante 1 h en SSC 0,2 veces y SDS al 0,1 % a 50 grados C, preferentemente a 55 grados C, más preferentemente a 62 grados C y lo más preferentemente a 68 grados C, se observa una señal de hibridación positiva.

- 30 Un tramo de “homología total” se define como una coincidencia de nucleótidos apareados a lo largo de la secuencia de los nucleótidos que interactúan; en ARN natural el apareamiento de A con U y de G con C.

- Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Normalmente, un promotor se sitúa en la región no codificante de 5' de un gen, próximo al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de secuencia dentro de promotores que realizan su función en el inicio de la transcripción
- 35 se caracterizan frecuentemente por secuencias de nucleótidos de consenso. Si un promotor es un promotor inducible, entonces la velocidad de transcripción se incrementa en respuesta a un agente de inducción. Por el contrario, si el promotor es un promotor constitutivo, la velocidad de transcripción no está regulada por un agente inductor. También se conocen promotores reprimibles.

- Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor. Por ejemplo, un
- 40 elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une a factores celulares que permiten la transcripción exclusivamente o preferentemente en células, tejidos u orgánulos en particular. Estos tipos de elementos reguladores se asocian normalmente con genes que se expresan de una manera “específica de célula”, “específica de tejido” o “específica de orgánulo”.

- Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede incrementar la eficacia de la transcripción,
- 45 independientemente de la distancia o la orientación del potenciador con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

- Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, tal como un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de duplicarse de forma autónoma en una célula huésped. Normalmente, los vectores de clonación contienen uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permiten la
- 50 inserción de una molécula de ácido nucleico de una forma determinada sin pérdida de la función biológica esencial del vector, así como de secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores incluyen normalmente genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina.

- Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Normalmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica se sitúa habitualmente bajo el control de un promotor y se dice que dicho gen está “unido de manera funcional” al promotor. Del mismo modo, un elemento regulador y un promotor del núcleo
- 55 están unidos de manera funcional si el elemento regulador modula la actividad del promotor del núcleo. Los vectores más sencillos llamados “vectores de transcripción” solo pueden transcribirse, pero no traducirse: pueden duplicarse

en una célula objetivo pero no expresarse, a diferencia de los vectores de expresión. Los vectores de transcripción se usan para amplificar su inserto.

Un “huésped recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heterólogo, tal como un vector de clonación o un vector de expresión.

5 La transfección describe la introducción de material exógeno en células eucariotas. El término “transfección” para procedimientos no víricos se usa principalmente con referencia a células de mamíferos, mientras que se prefiere el término “transformación” para describir la transferencia de ADN no vírico en bacterias y células eucariotas no animales, tales como de hongos, algas y vegetales. Pueden emplearse procedimientos tanto químicos como físicos para transfectar células.

10 Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácido preferentemente unidos exclusivamente por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o sintéticamente. Un polipéptido producido mediante la expresión de una molécula de ADN que no es del huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”. El término “polipéptido” como se usa en el presente documento abarca proteínas, péptidos y polipéptidos, en el que dichos polipéptidos, péptidos o proteínas pueden o no haber sufrido modificaciones postraduccionales. La modificación postraduccional puede ser, por ejemplo, fosforilación, metilación y glucosilación.

Un “residuo de aminoácido” puede ser un residuo de aminoácido natural o no natural enlazado con enlaces peptídicos o con enlaces distintos de los enlaces peptídicos. Los residuos de aminoácido pueden tener configuración D o configuración L. Un residuo de aminoácido comprende una parte aminoterminal (NH<sub>2</sub>) y una parte carboxiterminal (COOH) separadas por una parte central que comprende un átomo de carbono o una cadena de átomos de carbono, de los que al menos uno comprende al menos una cadena o grupo funcional lateral. NH<sub>2</sub> se refiere al grupo amino presente en el extremo amino terminal final de un aminoácido o péptido y COOH se refiere al grupo carboxi presente en el extremo carboxi terminal de un aminoácido o péptido. El término genérico aminoácido comprende aminoácidos tanto naturales como no naturales. Los aminoácidos naturales de nomenclatura estándar como se enumeraron en J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) y se adoptaron en la sección 1.822(b)(2) del artículo 37 del C.F.R. pertenecen al grupo de aminoácidos enumerados en la tabla 1 que aparece a continuación en el presente documento. Los aminoácidos no naturales son aquellos que no se enumeran en la tabla 1. Los ejemplos de aminoácidos no naturales son los enumerados, p. ej., en la sección 1.822(b)(4) del artículo 37 del C.F.R., todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Asimismo, los residuos de aminoácido no naturales incluyen, pero no se limitan a, residuos de aminoácido modificados, residuos de L-aminoácido y estereoisómeros de residuos de D-aminoácido.

Símbolos		Aminoácido
1 letra	3 letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico

W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

Tabla 1. Aminoácidos naturales y sus códigos correspondientes.

Un “residuo de aminoácido equivalente” se refiere a un residuo de aminoácido que puede reemplazar a otro residuo de aminoácido en un polipéptido sin modificar sustancialmente la estructura y/o la funcionalidad del polipéptido. Por tanto, los aminoácidos equivalentes tienen propiedades similares tales como la voluminosidad de la cadena lateral, la polaridad de la cadena lateral (polares o no polares), la hidrofobicidad (hidrófobos o hidrófilos), pH (ácidos, neutros o básicos) y la organización de las moléculas de carbono de la cadena lateral (aromáticos/alifáticos). Como tal, “residuos de aminoácido equivalentes” puede considerarse como “sustituciones de aminoácidos conservadoras”.

La clasificación de aminoácidos equivalentes se refiere en una realización a las clases siguientes: 1) HRK, 2) DENQ, 3) C, 4) STPAG, 5) MILV y 6) FYW

Dentro del significado del término “sustitución de aminoácidos equivalentes” como se aplica en el presente documento, en una realización, puede sustituirse un aminoácido por otro perteneciente a los grupos de aminoácidos indicados a continuación en el presente documento:

- i) Aminoácidos que tienen cadenas laterales polares (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr y Cys)
- ii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales no polares (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro y Met)
- iii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas (Gly, Ala Val, Leu, Ile)
- iv) Aminoácidos que tienen cadenas laterales cíclicas (Phe, Tyr, Trp, His, Pro)
- v) Aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas (Phe, Tyr, Trp)
- vi) Aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas (Asp, Glu)
- vii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas (Lys, Arg, His)
- viii) Aminoácidos que tienen cadenas laterales de amida (Asn, Gln)
- ix) Aminoácidos que tienen cadenas laterales hidroxiladas (Ser, Thr)
- x) Aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre (Cys, Met),
- xi) Aminoácidos neutros débilmente hidrófobos (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr)
- xii) Aminoácidos ácidos hidrófilos (Gln, Asn, Glu, Asp) y
- xiii) Aminoácidos hidrófobos (Leu, Ile, Val)

La presente invención también se refiere a variantes de la Hsp70, o sus fragmentos, en las que las sustituciones se han diseñado por análisis por ordenador que usa homología de secuencia para predecir si una sustitución afecta a la función de la proteína (p. ej., Pauline C. Ng y Steven Henikoff, *Genome Research*, vol. 11, número 5, 863-874, mayo de 2001).

Debido a la falta de precisión de los procedimientos analíticos estándar, se entiende que los pesos moleculares y longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando un valor de este tipo se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se interpretará que el valor indicado de X es preciso +/- 20 %, tal como +/-10 %, por ejemplo, +/- 5 %.

### Descripción de los dibujos

#### Figura 1

Los efectos de la Hsp70 sobre la aSMasa unida a BMP y los niveles de ceramida. (A) Unión de 0,2  $\mu$ M de aSMasa a liposomas que contienen BMP a pH 4,5 como una función de Hsp70 pre-unida (experimento análogo al ejemplo 1, véanse los materiales y procedimientos del presente documento para más detalles). Se dejó disociar la Hsp70 durante 10 min, alcanzando de este modo una asíntota inferior para la disociación antes de la adición de aSMasa).

(B) Microscopía confocal y cuantificación de los niveles de ceramida en iMEF naturales (WT) y transgénicos para Hsp70 (Hsp70-TG). La inmunodetección se realizó con un anticuerpo monoclonal de ratón frente a ceramida (clon 15b4). La cuantificación se realizó basada en micrografías de barrido láser de 6 zonas predefinidas, después de lo cual se realizó la cuantificación con el programa informático LSM Duo.

## 5 Figura 2

*El efecto de la Hsp70 sobre la actividad de la esfingomielinasa ácida en iMEF-WT (fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados, naturales).* Se administró rHsp70 a células a 3 nM, 30 nM y 300 nM y se midió la actividad de la aSMasa (A500 es una medida de la ceramida producida que aumenta la turbidez). Las células de control se trataron con BSA (albúmina de suero bovino).

## 10 Figura 3

Actividad de la SMasa ácida en diferentes fibroblastos. NPDA: enfermedad de Niemann-Pick de tipo A

## Figura 4

*Esquema de la hidrólisis de esfingolípidos principal.* La disociación exohidrolítica de esfingolípidos con grupos de cabeza hidrófilos cortos requiere cofactores no enzimáticos, proteínas activadoras de esfingolípidos (SAP o saposinas). Las deficiencias hereditarias tanto de la enzima correspondiente como de la proteína activadora correspondiente provocan el almacenamiento lisosómico de lípidos y dan como resultado la expresión de diversas esfingolipidosis. De Ferlitz et al., Chem. Phys. Lipids, (102) 35-43, 1999.

## Figura 5

*La Hsp70 lisosómica estabiliza las membranas lisosómicas.* (a) Imágenes confocales representativas de células U-2-OS incubadas con 300 nM de rHsp70-AF488 (verde) durante 24 h, fijadas y teñidas para detectar la proteína integral lisosómica 1 (LIMP-1; rojo). Para la localización conjunta con otros marcadores de orgánulos véase la fig. 9. (b) Las células U-2-OS se incubaron con 300 nM de rHsp70-AF488 durante 24 h antes de la cuantificación de rHsp70-AF488 en membranas (memb.) y sobrenadante (sob.) obtenidos por medio de ciclos de congelación/fusión repetidos y centrifugación de la fracción ligera de membrana (LMF). Los análisis de inmunotransferencia de la proteína de membrana asociada a lisosomas 2 (LAMP-2) y de la catepsina B (Cat B) demuestran la validez del procedimiento de fraccionamiento. (c) Imágenes fijas representativas de células U-2-OS expuestas a fotooxidación (naranja de acridina y luz azul). La pérdida de integridad lisosómica se visualiza mediante la pérdida de tinción roja y el incremento de la verde. (d y e) Se incubaron células U-2-OS con las proteínas recombinantes indicadas (300 nM) durante 24 h y se analizó la integridad lisosómica después de la fotooxidación. En los casos indicados, se trataron las células con siARN durante 48 h antes de la adición de proteínas recombinantes (e). Los valores representan la media  $\pm$  DE para tres (d) o cinco (e) experimentos independientes. A la derecha se muestran inmunotransferencias representativas de las proteínas indicadas de células U-2-OS que se dejaron sin tratar o se trataron con siARN de control o de Hsp70. Barras de escala: 20  $\mu$ m (a y c).

## Figura 6

*Una interacción dependiente del pH entre Hsp70 y BMP estabiliza las membranas lisosómicas.* (a) Cambios relativos en la dispersión de luz a 90° de liposomas tras la adición de rHsp70 (en alícuotas de 0,12 nmol) a liposomas que contienen los lípidos indicados ( $x=0,2$ ) a pH 7,4 (izquierda) y a pH 6,0 (derecha). (b) Las células U-2-OS se dejaron sin tratar (-) o se incubaron con 50  $\mu$ g/ml de IgG anti-BMP o de control durante 7 h antes de la adición de vehículo (-) o 300 nM de rHsp70 durante 24 h y se analizó la integridad lisosómica después de la fotooxidación. (c) Las células U-2-OS se dejaron sin tratar o se incubaron con 50  $\mu$ g/ml de IgG anti-BMP o de control durante 7 h antes de la adición de vehículo (-) o 25  $\mu$ M de cisplatino durante 24 h y se analizó la morfología de las células apoptóticas tras la tinción Hoechst 33342. (d) Interacción de la rHsp70 y sus mutantes con liposomas con POPC/BMP ( $x$ BMP=0,2) a pH 6,0 medida por los cambios en la intensidad relativa de los picos de fluorescencia. Las concentraciones de proteína fueron de 0,36  $\mu$ M (rHsp70), 0,5  $\mu$ M (AATP) y 0,35  $\mu$ M (APBD) (izquierda) o de 0,43  $\mu$ M (derecha) y se añadieron liposomas en alícuotas de 10  $\mu$ M. (e) Análisis BIAcore de las interacciones entre la rHsp70 natural (WT) y sus mutantes por delección (AATP y APBD) y puntuales (W90F y W580F) con LUV inmovilizadas a pH 4,5 (diámetro promedio: 100 nm; concentración total de lípidos: 0,1 mM; composición: esfingomielina ( $x=0,1$ ), fosfatidilcolina ( $x=0,5$ ), colesterol ( $x=0,2$ ) y BMP ( $x=0,2$ )). Se inyectaron liposomas hasta alcanzar el equilibrio (100 s) y se inyectaron las concentraciones indicadas (izquierda) o 300 nM (derecha) de proteínas recombinantes en tampón de acetato de sodio (50 mM, pH 4,5) durante 200 s a un caudal de 20  $\mu$ l/min seguido de una fase de disociación de 10 min. El  $\Delta$ UR se define como la diferencia entre la señal de respuesta medida después del equilibrio de liposomas y del equilibrio proteína-liposoma. (f y g) Las células U-2-OS se dejaron sin tratar (control) o se incubaron con las proteínas Hsp70 recombinantes indicadas (300 nM) durante 24 h y se analizó la integridad lisosómica después de la fotooxidación (f), o se trataron con vehículo (barras blancas) o con 25  $\mu$ M de cisplatino (barras negras) durante 24 h y se analizó la morfología de tipo apoptótico (g). (h) Modelos de cintas y de superficie molecular del dominio ATPasa de la Hsp70. El ATP (representación de superficie de van der Waals) puede visualizarse unido en el bolsillo de unión de ATP. Las esferas verdes y moradas indican la superficie de van der Waals de los iones de calcio y sodio

coordinados, respectivamente. Obsérvese la parte del dominio cargada positivamente en la parte inferior y la posición del W90. Los valores representan la media  $\pm$  DE para un mínimo de cinco experimentos independientes (b, c, f y g).

#### Figura 7

- 5 *La Hsp70 estimula la actividad ASM que, a su vez, estabiliza los lisosomas.* (a) Medida Biacore de la unión de 200 nM de rASM a liposomas que contienen BMP a pH 4,5 como una función de rHsp70 pre-unida. Los experimentos se realizaron como se describe en la leyenda para la fig. 6e, añadiendo rASM durante 180 s después de la fase de disociación de 10 min de la rHsp70 seguida por otra fase de disociación de 10 min. (b) Actividad ASM en los lisados de MEF naturales (WT) y transgénicos para Hsp70 (Hsp70) (panel izquierdo) y en MEF WT incubados con 300 nM de rHsp70 durante 24 o 48 h según se indique. (c y d) Viabilidad (reducción de MTT; c) y actividad de la cathepsina citosólica (zFRasa; d) en iMEF WT y con Hsp70 tratados con las concentraciones indicadas de desipramina durante 3h. (e) Formación de imágenes dinámica de células solas de pérdida de integridad lisosómica (fotooxidación en MEF WT y con Hsp70, así como en MEF incubados durante 3h con desipramina 12,5 y 25  $\mu$ M (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Se midió de forma continua la pérdida de fluorescencia roja (panel izquierdo) y el incremento de la verde (panel derecho) para proporcionar curvas cinéticas completas para la pérdida de integridad lisosómica. Se examinaron 25-60 células por experimento de zonas predefinidas,  $p < 0,001$  para Hsp70 frente a WT y Hsp70 + desipramina frente a Hsp70. Todos los valores representan la media  $\pm$  DE para un mínimo de 3 experimentos independientes.

#### Figura 8

- 20 *La rHsp70 estimula la actividad ASM, estabiliza los lisosomas y reduce el volumen lisosómico en fibroblastos de NPDA.* (a) Formación de imágenes dinámica de células solas de la estabilidad lisosómica de fibroblastos primarios de un paciente con NPDA analizadas como en la fig. 3e,  $p < 0,001$ . (b) Actividad ASM de fibroblastos de NPDA dejados sin tratar o tratados con 300 nM de rHsp70 durante 48 h (panel izquierdo) o con 150 nM de rASM sola o en combinación con 300 nM de rHsp70 durante 24h (panel derecho). Los valores de  $p$  se calcularon a partir de la velocidad enzimática obtenida (DA500/mg de proteína/min). La fotografía de la derecha demuestra la incorporación endocítica de la rASM (verde) y su localización en el compartimento lisosómico visualizada mediante co-tinción con rojo de LysoTracker. (c) La estabilidad lisosómica de los fibroblastos de NPDA dejados sin tratar o tratados durante 24 h con 300 nM de rHsp70, 150 nM de aSMasa o una combinación de rHsp70 y aSMasa se analizó como en la fig 3e.  $p < 0,001$  para todos los tratamientos en comparación con células no tratadas. (d) Cuantificación del área lisosómica de secciones transversales confocales de lulas en fibroblastos de NPDA dejados sin tratar o tratados durante 24 h con 300 nM de BSA, 300 nM de rHsp70, 150 nM de rASM (150 nM) o una combinación de rHsp70 y rASM. La fotografía de la derecha demuestra el efecto de la rHsp70 (verde) sobre el volumen del compartimento lisosómico (rojo) en fibroblastos de NPDA. La flechas blancas indican células con rHsp70 endocitada y compartimento lisosómico reducido. Los valores representan la media  $\pm$  DE para 3 experimentos independientes. Barras de escala = 20  $\mu$ m. NT = no tratadas.

#### Figura 9

- Localización conjunta de rHsp70-AF488 endocitada con lisosomas.* Imágenes confocales representativas de células U-2-OS incubadas con 300 nM de rHsp70-AF488 (verde) durante 24 h, fijadas y teñidas para detectar los siguientes marcadores de orgánulos (rojo): proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (LAMP-1; lisosomas), LAMP-2 (lisosomas), LBPA/BMP (6C4; compartimento endolisosómico), cyt c (mitocondrias), SERCA (RE) y golgina-97 (Golgi). Barras de escala: 20  $\mu$ m (LAMP-1, LAMP-2 y BMP) o 10  $\mu$ m (Cyt c, SERCA y Golgina-97).

#### Figura 10

- Interacción de rASM (aSMasa recombinante) y BMP en presencia de rHsp70.* (a) Interacción de rASM con liposomas aniónicos inmovilizados (el diámetro promedio es de 100 nm, la concentración total de lípidos es de 0,1 mM y la composición: 10 % en moles de esfingomielina, 50 % en moles de fosfatidilcolina, 20 % en moles de colesterol y 20 % en moles de BMP) a pH 4,5. Las señales de respuesta medidas después de la unión a los liposomas se definieron como cero. (b) El efecto de la rHsp70 pre-unida sobre la unión posterior de rASM. Las cantidades indicadas de rHsp70 se incubaron con liposomas aniónicos inmovilizados de forma idéntica a la de (a). Después de una fase de disociación de la rHsp70 de 10 min, se añadió rASM 200 nM durante 180 s seguido por 10 min de disociación.

#### Figura 11

- Efecto del inductor de Hsp70 de moléculas pequeñas; Alcohol bencílico sobre fibroblastos de pacientes con Niemann-Pick de tipo A (NPDA).* (A) Inducción de la Hsp70 en NPDA de Götz por alcohol bencílico de manera dependiente de la dosis (expresión de proteína). (B) Estabilidad incrementada de lisosomas de NPDA de Götz después del tratamiento de las células de NPDA de Götz con alcohol bencílico 40 mM. (C) Patología reducida en células de NPDA de Götz después del tratamiento con alcohol bencílico 40 mM, medida por área de sección transversal lisosómica (procedimiento más detallado en el ejemplo 2).

Figura 12

*Efecto de la disminución de la aSMasa sobre la estabilidad lisosómica.* Se transfectaron ARN pequeños de interferencia (siARN) dirigidos a la esfingomielinasa ácida (si938, si1257, si1340) y un siARN de control (mm) en células U2OS usando Oligofectamine (Invitrogen) de acuerdo con las directrices de los fabricantes. Concentración de siARN: 50 nM. Después de 72h horas se confirmó la inactivación por RT-PCR (no mostrado) y se analizó la estabilidad lisosómica de las células mediante formación de imágenes dinámica de células solas de fotooxidación mediada por naranja de acridina. El incremento de la fluorescencia verde se midió continuamente para proporcionar curvas cinéticas completas para la pérdida de integridad lisosómica. Como resulta evidente a partir de las gráficas, las células tratadas con siARN dirigidos a la aSMasa muestran una marcada reducción de la estabilidad lisosómica. El procedimiento se explica con más detalle en el ejemplo 2.

Figura 13

*El tratamiento de todas las líneas celulares de NPDA/B con rHsp70 revierte drásticamente la patología lisosómica, es decir, reduce el área de sección transversal de los lisosomas.* Cuantificación del área lisosómica de secciones transversales confocales de células de fibroblastos de la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A y B (NPDA/NPDB) y de fibroblastos normales (BJ) dejados sin tratar o tratados durante 24 h con 300 nM de BSA o dextrano como control, o tratados durante 24 h con 300 nM de rHsp70, 150 nM de rhaSMasa o una de sus combinaciones. Las células de NPDA tratadas durante 24 h con 300 nM de rHsp70-W90F (W90F) (el mutante de Hsp70 que no interacciona con BMP, tiene un efecto comparable al de las células control). Para los procedimientos, véase el ejemplo 2.

Figura 14

*Actividad incrementada de la aSMasa en fibroblastos transgénicos para Hsp70 y fibroblastos de NPDA tratados con rHsp70.* Análisis por espectroscopía de masas de especies del lípidos (esfingomielina y ceramida como se indica) en fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (iMEF), bien naturales (WT) o transgénicos para Hsp70 (TG) (A y B), así como en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A (NPDA 83/24) bien dejados sin tratar o tratados con rHsp70 (C). Los niveles más bajos de esfingomielina y los niveles más altos de ceramida indican un incremento de la actividad de la esfingomielinasa ácida.

Figura 15

*Reversión de la patología en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Farber.* Cuantificación del área lisosómica de secciones transversales confocales de células de pacientes con enfermedad de Farber. Los fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Farber (Farber 89/73 y Farber 89/78) se dejaron sin tratar o se trataron durante 24 h con 300 nM de BSA o 300 nM de rHsp70 como se indica. Como resulta evidente a partir de las figuras, el tratamiento de fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Farber con rHsp70 revierte drásticamente la patología lisosómica, es decir, reduce el área transversal de los lisosomas. Para la descripción de los procedimientos, véase el ejemplo 2.

Figura 16

*La Hsp70 incrementa la incorporación endocítica de otras moléculas.* Panel A: se incubaron fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (iMEF), bien naturales (WT) o transgénicos para Hsp70 (TG), con 20 µg/ml de BSA marcada con Alexa fluor-488 (BSA\*) durante 24 h. La incorporación endocítica se comprobó por microscopía de fluorescencia (no mostrado) (véase el ejemplo 2). Después, se recogieron las células y se analizó la incorporación de BSA\*. Como resulta evidente a partir de la figura, los iMEF transgénicos para Hsp70 presentaron una incorporación de BSA\* significativamente más alta que la de los iMEF naturales. Panel B: Se incubaron células de osteosarcoma U2OS con 20 µg/ml de BSA\* durante 24 h con o sin 3000 nM de rHsp70, como se indica. La incorporación endocítica se comprobó por microscopía de fluorescencia (no mostrado) (véase el ejemplo 2). Después, se recogieron las células y se analizó la incorporación de BSA\*. Como resulta evidente a partir de la figura, las células U2OS en las que se añadieron BSA\* y rHsp70 juntos presentaban una incorporación de BSA\* significativamente más alta que la de las células incubadas con BSA\* solo.

**Descripción detallada de la invención**

Como se demuestra por los presentes inventores, la Hsp70 ejerce una gran parte de su efecto citoprotector a través de una interacción directa con membranas endolisosómicas; una interacción que está controlada por un fosfolípido específico, a saber, el BMP (bis(monoacilglicerol)fosfato). El BMP está presente solo en endosomas tardíos y lisosomas. Los inventores muestran que la interacción de Hsp70-BMP depende del dominio N-terminal de ATP-asa de la Hsp70, específicamente del triptófano 90, y también que la interacción es dependiente del pH. La interacción entre la Hsp70 y el BMP es esencial para el efecto de estabilización de membranas de la Hsp70, al proporcionar una plataforma para modular la estabilidad de un subconjunto específico de enzimas lisosómicas y evitar la desestabilización de las membranas lisosómicas con la subsecuente liberación de enzimas lisosómicas. Estos hallazgos constituyen la base de una nueva y prometedora modalidad de tratamiento para los trastornos de almacenamiento lisosómico, como se divulga en el presente documento.

## Lisosomas

Desde el descubrimiento de los lisosomas por de Duve en 1955, la visión de este orgánulo ha estado dominado por el dogma de que es únicamente el final de la ruta endocítica en las células animales (un compartimento que alberga una gran variedad de hidrolasas que, si se liberan al citosol, provocan necrosis e inflamación tisular). Esta visión de los lisosomas como, en el mejor de los casos, una unidad de desecho de residuos y, en el peor de los casos, una “bolsa suicida” inespecífica, ha cambiado drásticamente debido a los recientes descubrimientos que proporcionan pruebas de muchas más tareas específicas de los lisosomas y su contenido.

### *Hidrolasas lisosómicas*

Como el principal compartimento para la degradación intracelular y el posterior reciclaje de los constituyentes celulares, los lisosomas reciben cargas tanto hetero como autofágicas, que encuentran su destino final en el lumen este orgánulo. La degradación se lleva a cabo por una serie de hidrolasas ácidas (fosfatasas, nucleasas, glucosidasas, proteasas, peptidasas, sulfatasas, lipasas, etc.) capaces de digerir todas las macromoléculas celulares principales. Entre las proteasas lisosómicas mejor estudiadas se encuentra la familia de las proteasas catepsinas. La catepsinas pueden dividirse en tres subgrupos de acuerdo con el aminoácido de su sitio activo, es decir, cisteína (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W y X/Z), aspartato (D y E) y serina (G) catepsinas. Las catepsinas funcionan de forma óptima al pH ácido de los lisosomas (pH 4-5), si bien pueden funcionar aun al pH neutro de fuera de los lisosomas, aunque con una estabilidad reducida y/o una especificidad modificada.

Hasta hace poco se creía que la función de las catepsinas se limitaba al recambio de proteínas intralisosómicas y a la degradación de la matriz extracelular una vez secretada. Sin embargo, durante los últimos años se han atribuido a muchas de las catepsinas funciones más específicas, incluidos papeles en la remodelación ósea, la presentación de antígenos, la homeostasis epidérmica, el procesamiento de prohormonas, la protección de linfocitos citotóxicos de la autodestrucción después de la desgranulación, el mantenimiento del sistema nervioso central en ratones, la angiogénesis, la invasión de células cancerosas, así como la muerte celular programada (PCD).

Aparte de la disociación de proteínas, los lisosomas y los endosomas tardíos también son responsables del metabolismo de los lípidos celulares, tales como los glucosfingolípidos, a través de una serie de enzimas y coenzimas endolisosómicas, cuyo funcionamiento correcto depende de la composición lipídica de las membranas lisosómicas. La importancia de un metabolismo lipídico endolisosómico funcional pueden apreciarse fácilmente por el hecho de que se manifiesta enfermedad clínica en caso de disfunción en cualquier etapa del metabolismo de esfingolípidos, dando lugar a enfermedades tales como las enfermedades de Tay-Sachs, de Sandhoff, de Farber, de Fabry, de Gaucher, de Krabbe y de Niemann-Pick.

### *Tráfico hacia y desde los lisosomas*

El tráfico de las membranas endocíticas desempeña un papel esencial en la célula de mamífero a través de su suministro de componentes de membrana, diversas moléculas en disolución y ligandos asociados a receptor a una variedad de compartimentos intracelulares. Aunque las diversas vías endocíticas parecían sencillas hasta hace poco, con la convergencia de las principales rutas en los lisosomas, donde tendrían lugar la degradación y el posible reciclaje de vuelta a la membrana plasmática, pruebas recientes muestran que estas rutas con más complejas de lo que se imaginó en un primer momento.

### *La vía endocítica*

La endocitosis se entiende mejor en términos de la endocitosis mediada por receptor de moléculas a través de la formación de invaginaciones recubiertas de clatrina, aunque también se han identificado una variedad de vías endocíticas no mediadas por clatrina (p. ej., macropinocitosis, fagocitosis, incorporación mediante formación de caveolas y formación de invaginaciones no recubiertas de clatrina). La nomenclatura del sistema endocítico no se ha estandarizado totalmente y el término “endosoma temprano” usado comúnmente describe en realidad dos compartimentos endosómicos distintos (el endosoma clasificador y el compartimento de reciclaje endocítico (ERC)). En la ruta endocítica convencional mediada por receptor, receptores tales como el receptor de transferrina, el receptor de lipoproteína de baja densidad y el receptor de manosa 6-fosfato (MPR) se concentran en invaginaciones recubiertas de clatrina en la superficie de la membrana plasmática gracias a interacciones entre motivos de secuencia de sus colas citoplásmicas y elementos de la capa de clatrina. Después de liberarse de su capa de clatrina, el endosoma recién formado se fusiona con otros endosomas y con endosomas clasificadores preexistentes para convertirse en un endosoma clasificador. Como su propio nombre indica, su principal tarea es clasificar componentes recién adquiridos en su localización correcta. Los tres destinos conocidos incluyen la membrana plasmática, los endosomas tardíos y el ERC. A medida que el endosoma clasificador madura, experimenta una reducción del pH, lo que facilita la liberación de los ligandos unidos a receptor al lumen del endosoma. Antes de la maduración completa del endosoma clasificador a endosoma tardío, no obstante, deben clasificarse las moléculas destinadas al reciclaje. Se cree que este proceso tiene lugar a través de la separación por pinzamiento de túbulos estrechos, un proceso que favorece la clasificación de las proteínas de membrana con respecto a las moléculas en disolución, ya que la proporción de área de superficie y volumen del túbulo es mayor que la del endosoma clasificador vesicular. Los túbulos separados por pinzamiento pueden hacer pasar las proteínas de membrana

directamente de vuelta a la membrana plasmática (la ruta de retorno directo) o al ERC. El ERC es, principalmente, una colección de orgánulos tubulares, cuya localización varía entre tipos celulares. Aunque el ERC puede clasificar moléculas para varios destinos diferentes, la mayoría de las moléculas que transitan a través del ERC vuelven a la membrana plasmática.

- 5 A medida que el endosoma clasificador madura, su pH luminal disminuye constantemente, principalmente debido a la acción de la ATPasa de protones de tipo vacuolar (ATPasa V), al mismo tiempo que se producen cambios en la composición lipídica y proteica de la membrana. El tráfico de membrana desde el endosoma clasificador hasta el endosoma tardío y después hacia el lisosoma ha sido objeto de controversia. La discusión es sobre si este transporte se explica mejor a través del transporte vesicular o mediante la maduración del endosoma clasificador.
- 10 Ambos modelos proporcionan un intermediario entre el endosoma clasificador y el tardío. Mientras que el modelo de maduración argumenta que la vesícula, que alcanza el endosoma tardío, es lo que queda después de la eliminación de componentes del endosoma clasificador anterior, el modelo del compartimento preexistente argumenta que el transporte de moléculas a los endosomas tardíos se produce a través de una vesícula transportadora endocítica (ECV), una vesícula de transporte específica entre compartimentos endosómicos de clasificación y tardíos
- 15 preexistentes. Se considera que los compartimentos endosómicos tanto de clasificación como tardíos son estructuralmente más complejos y tienen funciones más especializadas que las vesículas transportadoras. No obstante, recientes estudios de formación de imágenes de células solas han conciliado los aspectos mecánicos de ambos modelos, ya que las vesículas que surgen de una red de endosomas tempranos dinámica pueden sufrir una conversión en la que pierden la GTPasa pequeña RAB5 y reclutan la RAB7, un marcador de endosomas tardíos.
- 20 Aunque la organización de la ruta endocítica está funcionalmente bien definida, la nomenclatura puede ser confusa. Desde el punto de vista funcional, la ruta endocítica se define por receptores de mantenimiento (p. ej., el receptor de transferrina) y otros lípidos y proteínas que se hacen circular a través del endosoma temprano/clasificador donde se produce el desacoplamiento de ligando y receptor, pero no a través de endosomas tardíos, donde puede producirse la proteólisis). Sin embargo, más allá de estos criterios funcionales la situación se hace más confusa con respecto a
- 25 la nomenclatura, tanto, que la generación de vesículas intraluminales, que parten de los endosomas tempranos y se hacen cada vez más prominentes durante la maduración a endosomas tardíos, ha dado lugar al término “cuerpos multivesiculares” (MVB). Este término se ha usado indistintamente como otro nombre para las ECV y los endosomas tardíos así como para todas las vesículas endocíticas que contienen regiones o elementos multivesiculares, incluido el orgánulo híbrido que se forma cuando los lisosomas se fusionan con los endosomas tardíos (que contienen estructuras multivesiculares). Sin embargo, los endosomas tardíos contienen más vesículas de membrana luminal que los endosomas tempranos y, por tanto, frecuentemente son el compartimento descrito por medio del término “cuerpos multivesiculares”.
- 30

- Finalmente, ha surgido un grado sustancial de confusión en el campo a partir de la definición, o más bien de la carencia de ella, de endosomas tardíos frente a lisosomas. Ambos compartimentos son igualmente ácidos y la
- 35 mayoría de las proteínas presentes en los lisosomas, si no todas, también se encuentran en endosomas tardíos. De acuerdo con el modelo de maduración, los endosomas tardíos serían precursores de los lisosomas pero, dado el desarrollo gradual, como la teoría sugiere, podría ser muy difícil lograr una clasificación rigurosa. No obstante, recientemente se han presentado pruebas de que los lisosomas y los endosomas tardíos son compartimentos diferentes, que después sufren acontecimientos de “kissing” (fusión temporal), así como acontecimientos de fusión
- 40 total, después de los cuales los lisosomas pueden reformarse a partir del orgánulo híbrido.

#### *La vía biosintética*

- Aparte de la endocitosis, los endosomas tardíos también reciben cargas a través de la ruta del MPR desde la red *trans*-golgi (TGN) (la vía biosintética). El MPR dependiente de catión y el MPR independiente de catión/receptor del
- 45 factor de crecimiento insulinoide II (IGF-II) comparten la tarea de suministrar las hidrolasas de nueva síntesis desde la TGN a los lisosomas. El reconocimiento de hidrolasas ácidas por los MPR requiere la adición de hidratos de carbono en el retículo endoplásmico y la posterior modificación y fosforilación de los residuos hidrocarbonados para dar restos de manosa-6-fosfato en el *cis*-Golgi. Las hidrolasas unidas al MPR se administran en primer lugar a los endosomas, donde se disocian de los receptores debido a la disminución del pH luminal, permitiendo así que los receptores se reciclen de vuelta a la TGN. La proteína principal responsable de la clasificación de los MPR en las invaginaciones recubiertas de clatrina en la TGN es una proteína adaptadora (AP-1), aunque las proteínas de unión
- 50 al factor de ribosilación de ADP que contienen un asa  $\gamma$ , localizadas en el aparato de Golgi (GGA) también participan. Actualmente se desconoce si la AP-1 y las GGA trabajan conjuntamente o si en realidad dirigen los dos MPR a diferentes localizaciones subcelulares. La AP-1 forma parte de una familia de proteínas adaptadoras compuesta por cuatro miembros, todos los cuales son proteínas heterotetraméricas ampliamente utilizadas en las rutas secretora y endocítica. Además del papel de la AP-1 mencionado anteriormente en las invaginaciones recubiertas de clatrina en la TGN, la AP-1 y la AP-2 se usan en invaginaciones recubiertas de clatrina durante la endocitosis en la membrana plasmática, mientras que la AP3 y la AP-4 realizan su función en el tráfico de proteínas de membrana asociadas a lisosomas (LAMP).
- 55

#### *La vía autofágica*

- 60 La autofagia es la tercera vía bien caracterizada mediante la que las macromoléculas alcanzan el lisosoma. La autofagia es una ruta evolutivamente conservada implicada en el recambio de proteínas y orgánulos de larga vida.



Suele funcionar a niveles basales bajos, aunque puede inducirse, por ejemplo, bajo condiciones de carencia de nutrientes. Bajo estas condiciones la macroautofagia es la principal ruta responsable del suministro de material a los lisosomas. La macroautofagia se caracteriza por una cisterna de membranas plana que se envuelve alrededor de orgánulos citoplásmicos y/o una parte del citosol, formando de este modo una vacuola unida a una membrana doble cerrada, el autofagosoma. El autofagosoma se fusiona finalmente con lisosomas, formando autofagolisosomas/autolisosomas, donde se produce la degradación y el reciclaje de las macromoléculas engullidas. El origen de la membrana del autofagosoma no está claro aún. El retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, un compartimento de membrana peor caracterizado denominado el fagoforo, así como la síntesis *de novo* se han propuesto todos como orígenes de la membrana del autofagosoma. El reciente progreso en la genética de levaduras y el posterior descubrimiento de homólogos en mamíferos está potenciando rápidamente la comprensión del proceso de autofagia y es de esperar que también esclarezca el origen de la membrana autofagosómica en un futuro cercano.

Existen también otras vías por las que los lisosomas reciben las cargas autofágicas. Un proceso bastante indiscriminado denominado microautofagia se caracteriza porque los lisosomas engullen el citosol a través de invaginaciones de la membrana lisosómica. Además de las macromoléculas, que están presentes en el citosol engullido, este proceso puede implicar también la incorporación de orgánulos tales como peroxisomas. Finalmente, el transporte mediado por chaperonas de proteínas citosólicas al lumen lisosómico presenta una forma más directa y selectiva de autofagia. Esta ruta depende de la presencia del miembro de la familia de las proteínas de choque térmico 70 expresado de forma constitutiva, Hsc70, en ambos lados de la membrana lisosómica. Además, el proceso depende del reconocimiento de un motivo de secuencia KDEL en proteínas objetivo por la LAMP-2a.

#### *Reformación de lisosomas y secreción lisosómica*

Después de la fusión de los lisosomas con endosomas tardíos o autofagosomas, los lisosomas se reforman a partir de los orgánulos híbridos resultantes a través del secuestro de proteínas de membrana y la condensación del contenido luminal. De las proteínas de membrana que han de eliminarse o reciclarse a partir del orgánulo híbrido, los más evidentes son los MPR, ya que por definición están ausentes de los lisosomas. Los lisosomas, no obstante, no pueden considerarse como el punto final de las rutas endocíticas, ya que también pueden formar lisosomas secretores mediante fusión con gránulos secretores, un proceso que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y que se reconoció por primera vez en células secretoras de origen hematopoyético. Sin embargo, también existen pruebas de un compartimento lisosómico cercano a la membrana, regulado por  $\text{Ca}^{2+}$ , responsable de la exocitosis en células no secretoras. El proceso de exocitosis depende de la proteína Rab27a, un miembro de la familia de proteínas Rab, que cuenta más de 60 miembros. La Rab son GTPasas pequeñas que tienen papeles reguladores clave en la mayoría de las etapas de transporte en la membrana, incluyendo la formación de vesículas, la motilidad, el anclaje y la fusión. Se utilizan al menos 13 proteínas Rab en las rutas endocíticas con el fin de determinar el destino de las diversas moléculas endocitadas y sus vesículas.

#### Muerte celular programada

La regulación del número total de células, así como de la cantidad de células que constituyen los diferentes tejidos, junto con la necesidad de un mecanismo de eliminación de células no deseadas, es de una importancia fundamental en organismos pluricelulares. La muerte celular programada es el medio para este fin, dotando al organismo pluricelular con el potencial para deshacerse de sus células no deseadas sin perder constituyentes celulares, evitando así la inflamación asociada con la necrosis, la contrapartida conceptual a la muerte celular programada.

#### *Apoptosis*

La palabra apoptosis se usa en griego para describir el “desprendimiento” o la “caída” de los pétalos de las flores o de las hojas de los árboles y fue acuñada por primera vez por Currie y sus colaboradores en el año 1972 para describir un tipo común de muerte celular programada, que los autores habían observado en una serie de tejidos y tipos celulares. Los autores habían apreciado que los acontecimientos que observaban tenían similitudes morfológicas significativas, que eran distintas de las características morfológicas que caracterizan a las células que sufren una muerte patológica, necrótica, y sugirieron que estas características morfológicas comunes podrían deberse a un proceso subyacente idéntico.

Cuando las células mueren por apoptosis, sufren una serie de acontecimientos transformadores. Entre estos acontecimientos, y esencial para el fenotipo apoptótico característico, se encuentra la activación de las caspasas, una familia de cisteína endopeptidasas, que escinden sustratos en residuos de aspartato específicos, de ahí su nombre. La activación de las caspasas conduce al procesamiento proteolítico de otras caspasas, así como a muchos otros cambios en las actividades proteicas globales dentro de las células, produciendo en última instancia los rasgos morfológicos característicos asociados con la activación de las caspasas y, por tanto, por definición, la apoptosis. Las características apoptóticas clásicas incluyen la contracción celular y la formación de burbujas en la membrana citoplásmica, la condensación de la cromatina dentro del núcleo en formas geométrica claras, la fragmentación del ADN en números enteros de ~200 pb, la llamada escalera nucleosómica, la separación celular de las células vecinas y la desintegración de la célula en vesículas pequeñas, cerradas, denominadas cuerpos apoptóticos. En un entorno pluricelular, estos cuerpos apoptóticos son fagocitados, en última instancia, por macrófagos o células vecinas,

completando de este modo la eliminación de la célula no deseada.

#### *Muerte celular programada*

La muerte celular programada (PCD) no es sinónimo de apoptosis, aunque se podría tender a pensarlo basándose en la cantidad de literatura que usa estos términos indiscriminadamente. El término PCD está tomando el relevo gradualmente, pero el término apoptosis todavía se usa para describir un programa de muerte celular controlado por la activación de caspasas, en particular de la caspasa 3. Sin embargo, la capacidad de determinadas células para sobrevivir a la activación de caspasas pro-apoptóticas, así como PCD con ausencia total de activación de caspasas y activación de caspasas que da lugar a PCD no apoptótica, ha revelado una destacable flexibilidad de los programas de muerte celular y, por tanto, la PCD puede definirse con más precisión como la muerte celular dependiente de señales o actividades dentro de la célula moribunda. Se ha sugerido que la PCD puede subdividirse en apoptosis y PCD de tipo apoptosis y de tipo necrosis, de acuerdo con la morfología nuclear de las células moribundas, cada definición acuñada para características morfológicas distintas, siendo el rasgo principal la forma de la condensación de la cromatina o su ausencia, aunque sería preferible hacer distinciones de PCD basadas en las rutas de señalización que participan bajo cualquier conjunto de condiciones dado que dé lugar a la PCD. Sin embargo, esta forma de distinguir entre las diferentes modalidades de PCD todavía no es aplicable, ya que las líneas que conducen a los distintos tipos de muerte celular están aún por clasificar.

#### *Necrosis*

La necrosis es la contrapartida conceptual de la PCD, ya que no puede evitarse por ningún otro medio que no sea eliminar el estímulo que da lugar a la necrosis. Esta modalidad de muerte celular se suele observar durante agresiones patológicas a un organismo.

#### La maquinaria molecular de la muerte celular programada

##### *Apoptosis*

Como se menciona en la sección anterior, la apoptosis se define por la activación de miembros de la familia de cisteína endopeptidasas conocidas como las caspasas y la morfología asociada con su activación. Las caspasas residen en las células como zimógenos inactivos, que pueden activarse rápidamente por procesamiento proteolítico. Este procesamiento se desarrolla en una cascada jerárquica en la que un estímulo apoptótico activa a una caspasa iniciadora (p. ej., caspasa 8 y 9), que a su vez activa al siguiente nivel de la jerarquía, las caspasas efectoras (p. ej., caspasa 3, 6 y 7). Estas últimas se consideran las ejecutoras de la apoptosis, ya que escinden una serie de sustratos, cuyo procesamiento da lugar en última instancia al fenotipo asociado con la apoptosis. El programa apoptótico puede activarse por una variedad de estímulos, que pueden dividirse de manera amplia en estímulos extracelulares e intracelulares, teniendo estos últimos a la mitocondria como actor esencial. Los estímulos extracelulares y la respuesta posterior que da lugar a la apoptosis también se denominan la **ruta de señalización extrínseca** y se componen de una serie de acontecimientos que empiezan con la activación de uno de una variedad de receptores de muerte tales Fas/Apo-1/CD95, TNFR o TRAIL. Después de unir su ligando apropiado, estos receptores reclutan moléculas adaptadoras que contienen el dominio de muerte (DD), tales como TRADD (proteína con dominio de muerte asociada a TNFR1) y FADD (proteína de asociación a Fas con dominio de muerte), a través de la interacción con el DD presente en los receptores. Estas moléculas adaptadoras reclutan después a la caspasa 8 al complejo receptor, donde se activa la caspasa, posiblemente mediante procesamiento autocatalítico inducido por proximidad. En determinadas células (la llamadas células de tipo I) la caspasa 8 escinde entonces directamente y activa a la procaspasa 3, mientras que en células de tipo II, el sustrato para la caspasa 8 es la proteína citoplásmica Bid. La escisión de Bid genera un fragmento (Bid truncada (tBid)), que induce la oligomerización, traslocación e inserción de dos miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, Bax y Bak, en la membrana mitocondrial externa. Esta inserción media la liberación del transportador de electrones citocromo c (CytC) desde el espacio intermembranario mitocondrial junto con muchas otras proteínas, la más destacada de las cuales incluye el factor inductor de la apoptosis (AIF) Smac/DIABLO, que antagoniza los efectos de las proteínas conocidas como proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y la endonucleasa G, una ADNasa. Cabe destacar que, aunque este es el punto central de las teorías de activación de caspasas a través de las mitocondrias, no se han presentado pruebas concluyentes con respecto a cómo facilita la inserción de Bax y Bak la liberación del citocromo c. Tras la liberación desde la mitocondria, el CytC se acumula en el citoplasma, donde se une a la proteína Apaf-1 (factor activador de la proteasa apoptótica 1), dando como resultado un cambio conformacional, que promueve la oligomerización de Apaf-1. Este oligómero se une después a la procaspasa 9 por medio de interacciones homotípicas entre dominios de reclutamiento de caspasas (CARD), dando lugar a la formación de un complejo llamado apoptosoma. La formación de este complejo conduce a una actividad enzimática muy potenciada de la procaspasa 9, cuya actividad conduce a la activación proteolítica de la caspasa 3.

La apoptosis también puede desencadenarse por factores intracelulares que provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP), un proceso conocido como la **ruta intrínseca**. Estos factores incluyen segundos mensajeros asociados con estrés celular tales como  $\text{Ca}^{2+}$ , NO y ácido araquidónico, así como bilirrubina, sales biliares y estímulos que pueden dar lugar a la desnaturalización de proteínas y al daño del ADN nuclear y mitocondrial, tales como radiación ionizante, estrés por calor, especies reactivas de oxígeno (ROS) y agentes

quimioterapéuticos. En caso de daño del ADN nuclear, se detecta mediante una variedad de proteínas quinasas, que depende de la forma de daño del ADN, pero también del agente nocivo que lo provoca. La actividad de estas quinasas induce la acumulación de p53, que puede actuar después como un factor de transcripción, dando lugar a una transcripción potenciada de genes pro-apoptóticos tales como Bax, Noxa y PUMA, todos los cuales pueden inducir la MOMP. A nivel mitocondrial, el p53 induce la expresión de enzimas mitocondriales que generan ROS localmente, así como una proteína de la matriz mitocondrial (p53AIP1), cuya sobreexpresión provoca la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial y la apoptosis.

La inducción de la MOMP por p53 o por la acción de los estímulos intrínsecos descritos anteriormente es el punto en el que convergen las rutas intrínseca y extrínseca, siguiendo la vía de la ruta intrínseca a la ya descrita para la extrínseca con la liberación del citocromo c, constituyendo la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa 3 las etapas finales hacia la muerte de la célula no deseada.

#### *Las alternativas a la apoptosis*

Durante la última década, se ha cuestionado el papel exclusivo de las caspasas como ejecutoras de la PCD y cada vez más pruebas indican que la vida (y especialmente la muerte) de una célula depende de más factores de los que pueden atribuirse a las caspasas solas.

Dado que los nuevos inhibidores farmacológicos específicos de caspasa de reciente desarrollo, así como la inactivación de las rutas de caspasas por factores tales como la disminución de energía, el estrés nitrativo/oxidativo y miembros de la familia de la proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) no siempre detenían la progresión hacia la muerte, revelaron, o incluso potenciaron, un subconjunto de programas de muerte independientes de caspasa subyacentes. Estos programas incluyen rutas iniciadas por receptor de muerte, así como rutas activadas por fármacos contra el cáncer, privación de factores de crecimiento, estaurosporina, proteínas relacionadas con Bax y disminución de Hsp70. Frecuentemente, las características morfológicas de estos programas de muerte independientes de caspasa son reminiscentes de las observadas para la apoptosis clásica, y el respaldo experimental de un papel para otras proteasas tales como las catepsinas, las calpaínas y las serina proteasas como cofactores esenciales anteriores o posteriores a las caspasas creció rápidamente. El argumento se ve reforzado por los hallazgos de que muchas proteasas no caspasas pueden escindir al menos parte de los sustratos de caspasas clásicos, lo que podría explicar algunas de las similitudes observadas entre los programas de muerte dependientes de caspasa e independientes de caspasa.

Aunque podría discutirse la importancia de tales programas de muerte, ya que están enmascarados por la eficacia de las caspasas, se están reuniendo pruebas de un papel conservado evolutivamente para las proteasas catepsinas lisosómicas en los programas de muerte celular iniciados como respuesta frente a diversos estímulos tales como receptores de muerte de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, hipoxia, estrés oxidativo, estrés osmótico, calor y fármacos anticancerosos.

#### Implicación lisosómica en la muerte celular programada

Aunque el papel de los lisosomas y sus hidrolasas en fase de limpieza de la PCD, es decir, que las células vecinas o fagocitos engullan las células y cuerpos apoptóticos, está bien establecido, ha llevado mucho tiempo reconocer la importancia de los lisosomas y las hidrolasas lisosómicas en los acontecimientos más inmediatos de la PCD. Uno de los motivos para este retraso puede ser el hecho de que los inhibidores peptídicos de metilcetona usados comúnmente para evaluar el papel de las caspasas en la PCD (p. ej., zVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk, Boc-D-fmk, etc.) también inhiben otras cisteína proteasas, incluidas varias cisteína catepsinas. Incluso nueve años después del reconocimiento de esta reacción cruzada, los efectos protectores con estos inhibidores a concentraciones capaces de inhibir proteasas no caspasas todavía se interpretan frecuentemente como una prueba de las rutas de muerte mediadas por caspasas y, por tanto, el papel de otras rutas cisteína proteasas en la PCD continúa infravalorado. El descubrimiento de la PCD lisosómica puede haberse retrasado adicionalmente, porque la ultraestructura lisosómica aparece intacta en células apoptóticas analizadas por microscopía electrónica. Por tanto, la ruptura lisosómica se ha considerado hasta hace poco como un cambio de todo o nada durante etapas tardías de la muerte celular necrótica incontrolada y la autólisis tisular. Sin embargo, nuevas técnicas que permiten una evaluación más precisa de la integridad de la membrana lisosómica han revelado que los lisosomas con ultraestructura normal pueden haber perdido parte de sus enzimas, y que esa permeabilización parcial de la membrana lisosómica (LMP) no solo se produce temprano en muchos paradigmas de muerte, sino que, de hecho, puede desencadenar la apoptosis y la PCD de tipo apoptosis.

#### *Permeabilización de la membrana lisosómica (LMP) y sus consecuencias*

Estudios con diversos componentes que se dirigen directamente a la integridad de las membranas lisosómicas, tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, L-leucil-L-leucina metil éster, estrés osmótico, esfingosina, los antibióticos lisosomotrópicos norfloxacino y ciprofloxacino y el daño lisosómico fotooxidativo (fotólisis), han demostrado de forma convincente que la permeabilización lisosómica moderada puede dar como resultado la PCD. Se ha apuntado a una relación cuantitativa entre la cantidad de ruptura lisosómica y la modalidad de muerte celular para explicar las consecuencias morfológicas ampliamente diferentes posteriores a la LMP. De acuerdo con este modelo, intensidades de estrés

bajas desencadenan una liberación limitada de contenido lisosómico al citoplasma seguida de apoptosis o muerte celular de tipo apoptosis, mientras que estreses más altos conducen a una rotura lisosómica generalizada y una necrosis celular rápida. En consecuencia, concentraciones bajas de esfingosina, un metabolito de la ceramida generado por la ceramidasa ácida con propiedades de tipo detergente a pH bajo, inducen la LMP parcial y la apoptosis mediada por caspasas, mientras que concentraciones más altas dan como resultado LMP a gran escala y muerte celular necrótica independiente de caspasas. En este modelo, la muerte desencadenada por LMP parcial puede inhibirse por inhibidores farmacológicos de cisteína y aspartato catepsinas, y el incremento de la actividad de la catepsina citosólica precede a la activación de las caspasas y a los cambios de potencial de la membrana mitocondrial, lo que sugiere un papel directo para las catepsinas citosólicas en el proceso de muerte. Es importante el hecho de que el papel de la LMP y las catepsinas en la muerte celular no se limita a los modelos experimentales que emplean alteradores lisosómicos directos. La LMP también participa en la ejecución de la muerte celular en respuesta a una amplia variedad de estímulos apoptóticos clásicos, tales como la activación de receptores de muerte de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1, activación de p53, carencia de factores de crecimiento, agentes estabilizantes de microtúbulos, etopósido, activación del receptor sigma 2, retinoide sintético CD437, activación del receptor de linfocitos B, estauroesporina, estrés osmótico, así como moléculas pequeñas identificadas en una selección de nuevos fármacos contra el cáncer que inducen la apoptosis independiente de p53.

#### *La LMP como desencadenante de la ruta de apoptosis mitocondrial*

Los efectos citotóxicos de la LMP se basan frecuentemente, al menos parcialmente, en la activación de la ruta de muerte mitocondrial. Un estudio de microinyección elegante ha demostrado que, cuando se localiza en el citosol, una sola hidrolasa lisosómica, la catepsina D, es suficiente para desencadenar la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la apoptosis en fibroblastos humanos a dosis celulares correspondientes a la mitad de la actividad celular total de la catepsina D. Sin embargo, la catepsina D no es suficiente para desencadenar la PCD en todos los modelos de muerte que implican LMP. Otros mediadores bien documentados de la PCD desencadenada por LMP incluyen las cisteína catepsinas B y L, así como especies reactivas de oxígeno. No obstante, debería recalarse que el papel de otras hidrolasas lisosómicas, segundos mensajeros derivados de origen lisosómico y la acidificación del citosol inducida por LMP no se ha descartado debidamente. Uno de los enlaces entre las catepsinas y la permeabilización de la membrana mitocondrial puede ser Bid, una proteína proapoptótica con BH3 solo de la familia Bcl-2 que puede procesarse y activarse mediante varias cisteína catepsinas, pero no por la catepsina D, a pH citosólico. Sin embargo, se ha sugerido que la catepsina D escinde y activa Bid en el entorno ácido del compartimento endolisosómico después de la internalización del receptor de TNF 1 (TNF-R1). De acuerdo con este modelo, la endocitosis del TNF-R1 activado por ligando da como resultado la generación de ceramida mediada por la esfingomielinasa ácida, que se une después a la catepsina D inactiva y la activa por procesamiento autocatalítico. La catepsina D también puede activar a Bax de forma independiente de Bid, como se demostró en linfocitos T tratados con estauroesporina. Asimismo, en fibroblastos tratados con ciprofloxacino, la LMP desencadena la permeabilización de la membrana mitocondrial a través de una activación de Bax y Bak independiente de Bid. En este sistema de modelo la activación de Bax es independiente de la catepsina D, pero se basa en su lugar en especies reactivas de oxígeno. Cabe destacar que la permeabilización de la membrana mitocondrial inducida por ciprofloxacino no se inhibe totalmente en células que carecen tanto de Bax como de Bak. Los mecanismos alternativos que relacionan la LMP con la permeabilización de la membrana mitocondrial pueden incluir los efectos directos de especies reactivas de oxígeno y/o mediadores lipídicos tales como ácido araquidónico que pueden generarse de una forma dependiente de catepsina B.

Estudios que empleaban fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados (MEF) de ratones deficientes para catepsinas individuales han revelado claramente que diferentes catepsinas están implicadas en la ejecución de la muerte celular dependiendo del estímulo que desencadena la LMP. Los MEF inmortalizados de ratones deficientes de catepsina B y L, pero no de ratones deficientes de catepsina D, son altamente resistentes al TNF, mientras que sucede lo contrario cuando las células se tratan con estauroesporina. Estudios extensos sobre rutas de muerte celular inducida por TNF han revelado adicionalmente que el papel de las catepsinas individuales en la PCD depende del tipo celular estudiado. Como se indica anteriormente, la muerte inducida por TNF de MEF inmortalizados depende de cisteína catepsinas, pero no de la catepsina D. Sin embargo, la disminución de la catepsina D protege de forma eficaz a las células HeLa de cáncer de cuello uterino frente a la citotoxicidad inducida por TNF y cisplatino. Esta diferencia no parece deberse a diferencias generales entre células humanas y murinas, porque la catepsina B sola o junto con otras cisteína catepsinas también es crucial para la eliminación inducida por TNF eficaz en líneas celulares humanas de cáncer de cuello uterino (ME-180) y mama (MCF-7). La explicación de esta diversidad se desconoce todavía, pero niveles de expresión variables de catepsinas individuales y sus inhibidores en diferentes líneas celulares podrían desempeñar un papel. En consecuencia, la capacidad variable de diferentes estímulos de muerte para regular los niveles de expresión de catepsinas individuales o sus inhibidores podría explicar la diferencia en la respuesta frente a diferentes estímulos. Por ejemplo, se sabe que la adriamicina y el etopósido potencian la expresión de la catepsina D mediante la activación de p53. De forma alternativa, otras rutas de señalización inducidas por diversos estímulos pueden cooperar con catepsinas específicas.

#### *Rutas de muerte independiente de mitocondria inducidas por LMP*

Es importante el hecho de que los efectos letales de la LMP y las catepsinas citosólicas no se limitan a la activación

de la ruta apoptótica intrínseca. En células de cáncer de pulmón microcítico tratadas con fármacos estabilizantes de microtúbulos (paclitaxel, epotilona B y discodermolida), la LMP se produce temprano en el proceso de muerte y las cisteína cathepsinas median la micronucleación y la muerte celular de una manera dependiente de caspasa. En líneas celulares humanas de carcinoma tratadas con TNF, la LMP se produce después de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Sin embargo, la inhibición de la actividad o la expresión de la cisteína cathepsina confiere una protección significativa frente a la muerte celular inducida por TNF sin inhibir significativamente la activación de la caspasa efectora. Además, la caspasa B es responsable de los cambios de tipo apoptosis, tales como la condensación de la cromatina, la exposición de la fosfatidilserina y la aparición de burbujas en la membrana plasmática, en ausencia de actividad caspasa en células de fibrosarcoma WEHI-S murinas tratadas con TNF. Además, la disminución de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) en diversas líneas celulares de cáncer humanas, así como la activación supraóptima de los linfocitos T, desencadena la LMP y la PCD de tipo apoptosis mediada por cathepsinas sin la activación de la ruta apoptótica intrínseca. En consonancia con estos datos, la cathepsina B puede inducir la apoptosis nuclear en núcleos aislados. Por tanto, parece que las cathepsinas tienen la capacidad de actuar como iniciadores y también como proteasas efectoras de muerte celular programada, dependiendo del estímulo y del contexto celular. Especialmente su capacidad para mediar la PCD en células cancerosas, donde la ruta de muerte mitocondrial está bloqueada, por ejemplo, debido a la sobreexpresión de Bcl-2, aumenta las esperanzas de que los tratamientos que inducen la LMP puedan resultar eficaces para el tratamiento de cánceres que son resistentes a inductores de la apoptosis clásica. Esta idea queda respaldada adicionalmente por datos que muestran que la inmortalización y la transformación pueden sensibilizar a las células frente a la muerte celular lisosómica.

#### *Señalización para la LMP*

Como se describe anteriormente, la LMP seguida de la liberación del contenido lisosómico, especialmente cathepsinas, al citosol se considera la etapa de activación clave de la ruta de muerte lisosómica. Sin embargo, las rutas de señalización que dan lugar a la LMP todavía están empezando a emerger. Uno de los mecanismos mejor estudiados es la señalización del receptor del factor de necrosis tumoral 1, aunque la elucidación de esta ruta de señalización para la LMP se ha complicado en gran medida por respuestas ampliamente diferentes en diferentes células objetivo.

En resumen, el TNF puede inducir LMP dependiente o independiente de caspasa, en función del contexto celular. Además, los ligandos relacionados con TNF FasL, TRAIL y TWEAK también se han asociado con la PCD independiente de caspasa con morfología apoptótica o necrótica. Estudios farmacológicos y genéticos indican que la ruta mediada por caspasas que conduce desde el TNF hasta la LMP depende de las caspasas 8 y 9, aunque la activación de la caspasa 9 difiere ampliamente entre células humanas y murinas. El vínculo entre las caspasas y la LMP se desconoce aún y, aunque se ha sugerido que la escisión de Bid mediada por la caspasa 8 inducida por TNF podría contribuir a las LMP, estos hallazgos no pudieron comprobarse por LMP inducida por TNF en MEF deficientes en Bid. Además, se ha sugerido que Bid es un objetivo de las cathepsinas en rutas de muerte lisosómicas que implican a Bid después, en lugar de antes, de la LMP.

El TNF también estimula la disociación de la esfingomielina en fosforilcolina y ceramida mediante la activación de la esfingomielinasa neutra (SMasa) en la membrana plasmática o de la SMasa ácida o acídica (aSMasa) en el compartimento lisosómico. Ambos acontecimientos se han implicado en las rutas de muerte celular inducida por TNF, pero hasta ahora solo se ha relacionado la SMasa neutra con la LMP a través del factor asociado a SMasa neutra (FAN). Estudios basados en iMEF deficientes en FAN, así como en fibroblastos humanos que expresan una forma negativa dominante de FAN, han mostrado que FAN no solo media la producción de ceramida mediada por TNF, sino que también contribuye al procesamiento de la caspasa 8 y a la muerte celular. Dado que la LMP inducida por TNF en hepatocitos murinos depende de la caspasa 8, su procesamiento reducido puede explicar la LMP reducida en hepatocitos tratados con TNF que expresan FAN negativo dominante. Sin embargo, el papel de la ceramida y sus metabolitos no puede descartarse. Su papel en la señalización de muerte inducida por TNF está respaldado por la hepatotoxicidad reducida inducida por TNF y Fas en ratones deficientes en aSMasa, que se activa después de la caspasa 8. Especialmente, la esfingosina que se genera a partir de ceramida en una reacción catalizada por la enzima lisosómica ceramidasa ácida es un candidato tentador, ya que, al contrario que la ceramida, puede actuar como detergente, desestabilizando directamente la membrana lisosómica. Además de incrementar la generación del precursor de la esfingosina, la ceramida, mediante la activación de las SMasas, el TNF también regula los niveles de esfingosina mediante regulación por disminución mediada por la cathepsina B de la esfingosina quinasa 1, una enzima que convierte la esfingosina proapoptótica en una esfingosina-1-fosfato antiapoptótica. Esta actividad de la cathepsina B podría dar como resultado la acumulación de esfingosina en los lisosomas y, por tanto, puede explicar, al menos parcialmente, la necesidad de cathepsina B para una LMP eficaz en hepatocitos tratados con TNF.

El TNF también puede desencadenar la LMP y la muerte celular en presencia de inhibidores de caspasa. Esta ruta es independiente de la caspasa 9, pero requiere la proteína de interacción con el receptor 1 (RIP-1) que contiene un dominio de muerte e implica la generación de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo, junto con el hierro intralisosómico, puede generar radicales de oxígeno a través de una química de tipo Fenton y, de este modo, puede provocar la oxidación de los lípidos de la membrana lisosómica, dando como resultado la desestabilización de la membrana y la liberación del contenido lisosómico. Sin embargo, siguen sin conocerse los vínculos moleculares

entre RIP-1, el estrés oxidativo y la LMP.

La inducción de la muerte celular por varios inductores de apoptosis clásicos (p. ej., p53, etopósido y estaurosporina) también implica la LMP seguida de permeabilización de la membrana mitocondrial dependiente de catepsinas. Sin embargo, las rutas de señalización desde estos estímulos hasta la LMP siguen sin elucidarse.

## 5 *Mecanismos de defensa celular contra la LMP*

Dadas las potenciales consecuencias fatales de la LMP, no es sorprendente que las células hayan desarrollado numerosas estrategias para contrarrestarla, bien inhibiendo la propia LMP o bien protegiendo las células contra las hidrolasas ácidas que salen al citosol como consecuencia de la LMP.

Entre sus múltiples otras funciones, se ha informado de que la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) protege a los lisosomas contra la desestabilización. La inhibición de la PI3K en células del endotelio vascular humano induce la liberación de catepsina B al citosol, demostrando un papel bastante directo de la PI3K en la conservación de la integridad de la membrana lisosómica. Además los inhibidores de la PI3K sensibilizan a las células frente a las rutas de muerte lisosómica inducida por TNF e interleucina 1. La alteración de las funciones lisosómicas y el incremento de los niveles de expresión de catepsinas en células cancerosas pueden suponer una amenaza en forma de estabilidad reducida de los lisosomas. Por tanto, la PI3K, que comúnmente está activada en células cancerosas humanas, también puede contribuir a la estabilidad lisosómica de las células tumorales y, de este modo, incrementar su resistencia a la muerte celular. Mientras que el papel de la PI3K en la estabilidad de los lisosomas de células tumorales es puramente especulativo, datos recientes abogan por un papel de la Hsp70 en la protección de los lisosomas contra estímulos que alteran la membrana. Este trabajo se ha realizado, principalmente, en células tumorales, que también demuestran frecuentemente una localización de Hsp70 en la membrana plasmática, así como en el compartimento lisosómico.

En caso de que se liberen proteasas lisosómicas al citosol tras la LMP, los inhibidores de proteasas citosólicos suponen una barrera contra sus consecuencias perjudiciales. Dado que no se conoce ningún inhibidor endógeno de la catepsina D, las cisteína catepsinas pueden inhibirse de forma eficaz por al menos tres inhibidores de proteasas citosólicos, es decir cistatina A y B e inhibidor de serina proteasa 2A (Spi2A), del que se ha descubierto recientemente que posee una potente actividad inhibidora también contra varias cisteína catepsinas (B, H, K, L y V) y la catepsina G. La importancia de estos inhibidores en la prevención de la PCD en condiciones fisiológicas y patológicas se demuestra mediante ratones deficientes en cistatina B que muestran un incremento de la apoptosis de células granulares del cerebelo. Además, la expresión de SpiA2 se induce tras el tratamiento con TNF a través de la ruta NF-κB e inhibe de forma eficaz la actividad de la catepsina B y la muerte celular citosólicas inducidas por TNF en MEF. Es interesante el hecho de que acaba de informarse de que en *C. elegans*, el inhibidor de la serina proteasa (serpin) 6 citosólico puede proteger, tanto contra la inducción como contra los efectos letales del daño lisosómico provocado por estrés hipoosmótico, así como una variedad de otros estreses lisosómicos, lo que demuestra que la protección contra la LMP es un mecanismo evolutivamente conservado.

## 35 Enfermedades de almacenamiento lisosómico

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) son un grupo de aproximadamente 40 trastornos metabólicos hereditarios raros que dan lugar a anomalías en la función lisosómica. Las LSD están provocadas por una disfunción lisosómica, normalmente como consecuencia de una deficiencia de una sola enzima necesaria para el metabolismo de los lípidos, glucoproteínas o mucopolisacáridos. Aunque cada trastorno es consecuencia de mutaciones génicas diferentes que se traducen en una deficiencia de la actividad enzimática, todos ellos comparten una característica bioquímica común: todos los trastornos lisosómicos derivan de una acumulación anómala de sustancias dentro del lisosoma.

Individualmente, las LSD se producen con incidencias de menos de 1:100.000, sin embargo, como grupo la incidencia es de aproximadamente 1:5.000 - 1:10.000. La mayoría de estos trastornos se heredan de forma recesiva autosómica, aunque unos pocos se heredan de forma recesiva ligados al cromosoma X, tal como la enfermedad de Fabry.

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico se clasifican, en general, por la naturaleza del principal material almacenado implicado y pueden dividirse ampliamente en los siguientes:

- trastornos de almacenamiento de lípidos (o lipidosis), principalmente esfingolipidosis (incluidas las enfermedades de Gaucher y de Niemann-Pick)
  - o gangliosidosis (incluida la enfermedad de Tay-Sachs)
  - o leucodistrofias
- mucopolisacaridosis (incluido el síndrome de Hunter y la enfermedad de Hurler)
- trastornos de almacenamiento de glucoproteínas (glucoproteinosis)

- mucopolipidosis

Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, los pacientes mueren a una edad temprana e impredecible, muchos a los pocos meses o años de nacer, mientras que otros sobreviven hasta la edad adulta temprana sucumbiendo finalmente a las diversas patologías de su trastorno particular. Los síntomas de las LSD varían, dependiendo del

5 trastorno en particular, y pueden ser de leves a graves. Pueden incluir retraso en el desarrollo, trastornos del movimiento, convulsiones, demencias, sordera y/o ceguera. Algunas personas con LSD tienen hígados aumentados de tamaño (hepatomegalia) y bazo aumentados de tamaño (esplenomegalia), problemas pulmonares y cardíacos y crecimiento óseo anómalo.

10 La mayoría de pacientes se evalúan inicialmente mediante un ensayo enzimático, que es el procedimiento más eficaz para llegar a un diagnóstico definitivo. En algunas familias en las que se conoce(n) la(s) mutación(es) causante(s) de la enfermedad y en algunos aislados genéticos, pueden realizarse análisis de la mutación. Como puede haber numerosas mutaciones diferentes, en ocasiones es necesario secuenciar el gen que codifica la enzima afectada en particular para confirmar el diagnóstico. El diagnóstico prenatal puede ser útil cuando existe un factor de riesgo genético conocido.

15 La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico.

Hidrólisis de esfingolípidos lisosómicos

20 Numerosas enzimas están implicadas en el catabolismo lisosómico de los esfingolípidos (o glucoesfingolípidos) (véase la figura 4). Estas enzimas o, más específicamente, hidrolasas, son cada una responsables de la degradación de un esfingolípidos específico.

La hidrolasa de esfingolípidos lisosómico interacciona con proteínas activadoras de esfingolípidos (SAP o saposinas) para estimular la actividad de dichas hidrolasas. Se considera que las SAP facilitan la interacción de enzima/sustrato entre enzimas solubles en agua y sustratos unidos a la membrana.

25 Además, las composiciones lipídicas de los compartimentos endosómicos tardíos y lisosómicos se caracterizan por la presencia de fosfolípidos cargados negativamente, tales como BMP y PI (fosfatidilinositol), que también estimula la actividad de algunas hidrolasas. Las hidrolasas lisosómicas dependientes de BMP incluyen sialidasa,  $\alpha$ -galactosidasa A, glucoceramidasa,  $\beta$ -galactoceramidasa, arilsulfatasa A, ceramidasa ácida y esfingomielinasa.

*Saposinas cofactores*

30 Las saposinas son proteínas lisosómicas pequeñas que actúan como activadores de diversas enzimas lisosómicas de degradación de lípidos. Probablemente actúan aislando el sustrato lipídico del entorno de la membrana, haciéndolo así más accesible para las enzimas degradativas solubles. Todas las saposinas de mamíferos se sintetizan como una sola molécula precursora (prosaposina) que contiene cuatro *dominios de saposina B*, que proporcionan las saposinas activas después de la escisión proteolítica, y dos *dominios de saposina A* que se eliminan en la reacción de activación. Los dominios de saposina B también aparecen en otras proteínas, muchas de

35 ellas activas en la lisis de membranas.

La prosaposina (PSAP) es una proteína que, en seres humanos, está codificada por el gen *PSAP*. Este gen codifica una glucoproteína altamente conservada que es un precursor para 4 productos de escisión: saposina A, B, C y D. Saposina es un acrónimo para Sphingolipid Activator Protein (proteína activadora de esfingolípidos, en inglés) o SAP. Cada dominio de la proteína precursora tiene una longitud de aproximadamente 80 residuos de aminoácido con una ubicación casi idéntica de los residuos de cisteína y los sitios de glucosilación. Las saposinas A-D se localizan, principalmente, en el compartimento lisosómico, donde facilitan el catabolismo de los glucoesfingolípidos con grupos de oligosacárido cortos. La proteína precursora existe como una proteína de secreción y también como

40 proteína integral de membrana y tiene actividades neurotróficas. Las saposinas A-D son necesarias para la hidrólisis de determinados esfingolípidos por hidrolasas lisosómicas específicas.

45 Las saposinas son importantes coactivadores de la sialidasa (SAP-B), la  $\alpha$ -galactosidasa A (SAP-B), la glucosilceramidasa (SAP-C), la  $\beta$ -galactosilceramidasa (SAP-C), la arilsulfatasa A (SAP-B) y la ceramidasa ácida (SAP-D). Las esfingomielinasa ácida (aSMasa) no depende de forma crítica de ninguna de las proteínas activadoras conocidas, aunque la presencia de saposinas incrementa la actividad de esta enzima. También se ha caracterizado una quinta saposina; la proteína activadora GM2.

50 *BMP*

El bis(monoacilglicero)fosfato (BMP), también conocido como ácido lisobisfosfatídico, es una parte principal de la composición lipídica de los compartimentos endosómicos tardíos y lisosómicos. Es un fosfolípido cargado negativamente, más específicamente un glicerol-fosfolípido.

El BMP se aisló por primera vez a partir de pulmón de conejo, pero ahora se sabe que es un constituyente común,

aunque minoritario, de todos los tejidos animales. Su configuración estereoquímica difiere de la de otros glicerofosfolípidos animales en que el resto de fosfodiéster está enlazado en las posiciones *sn*-1 y *sn*-1' del glicerol, en lugar de en la posición *sn*-3. No está claro si las posiciones *sn*-3 y 3' o *sn*-2 y *sn*-2' de los restos de glicerol están esterificadas con ácidos grasos. Sean cuales sean las posiciones de los ácidos grasos de la molécula de glicerol, sus composiciones pueden ser diferentes, siendo abundantes 18:1(n-9) y 18:2(n-6), 20:4 y 22:6(n-3), aunque esto depende en gran medida del tejido, tipo celular u orgánulo específico. Tales composiciones diferentes indican funciones bastante específicas, algunas de las cuales no se han elucidado aún.

El BMP suele ser un componente más bien minoritario de los tejidos animales. Sin embargo, está muy enriquecido en los lisosomas del hígado y otros tejidos, donde puede suponer hasta el 15 % o más de los fosfolípidos de la membrana, y ahora se reconoce como un marcador para este orgánulo. Son los endosomas tardíos y los lisosomas los que contienen el lípido único, BMP. De hecho, parece que existen membranas internas de los endosomas tardíos que contienen hasta el 70 % de los fosfolípidos como BMP.

Si puede confirmarse la presencia de BMP de la que se informa en algunas cepas alcalófilas de especies de *Bacillus*, será la única excepción conocida de la regla de que este lípido es exclusivamente de origen mamífero y que no está presente en otros procariotas, levaduras y plantas superiores.

Existe una buena prueba de que el BMP se sintetiza a partir de fosfatidilglicerol, principalmente en el sistema endosómico. En la que se cree que es la vía principal, una fosfolipasa  $A_2$  elimina el ácido graso de la posición *sn*-2 del fosfatidilglicerol en la primera etapa. En la segunda etapa, el lisofosfatidilglicerol se acila en la posición *sn*-2' del resto de glicerol del grupo de cabeza proporcionando ácido *sn*-3:*sn*-1' lisobisfosfatídico, por medio de una reacción de transacilasa con lisofosfatidilglicerol como dador de acilo y también como aceptor de acilo. La tercera etapa aún tiene que describirse adecuadamente, pero debe implicar la eliminación del ácido graso de la posición *sn*-1 de la unidad de glicerol principal y una redistribución del éster desde la posición *sn*-3 a la *sn*-1. Finalmente, la posición *sn*-2 de la unidad de glicerol principal se esterifica, probablemente mediante una reacción de transacilación con otro fosfolípido como dador (de ahí las diferentes composiciones de ácidos grasos). Pueden ser posibles otras vías biosintéticas.

La función del BMP en lisosomas es objeto de investigación activa. Puede tener un papel estructural en el desarrollo del complejo sistema de membranas intraluminal, ayudado por una tendencia a no formar una bicapa. Es una molécula con forma de cono y fomenta la fusión de membranas al pH de los endosomas. Además, su estereoquímica única significa que es resistente a fosfolipasas, por lo que obstaculizará o evitará la autodigestión de las membranas lisosómicas. Los constituyentes de ácido graso pueden renovarse rápidamente por transacilación, pero el esqueleto de glicerofosfato es estable. Otra posibilidad es que este lípido puede asociarse con proteínas específicas de dominios de membrana, similares funcionalmente a las balsas. Se ha sugerido que la red característica de membranas ricas en BMP contenida en endosomas tardíos multivesiculares regula el transporte del colesterol actuando como un punto de recogida y redistribución. Por ejemplo, cuando las membranas lisosómica se incuban con anticuerpos frente a BMP, el colesterol tiende a acumularse. El proceso está bajo el control de Alix/SIP1, que es una proteína que interacciona específicamente con BMP y participa en la clasificación en endosomas multivesiculares.

Se sabe que el BMP estimula en gran medida las enzimas implicadas en la degradación de las glucosilceramidas, tales como las proteínas activadoras de esfingolípidos como las saposinas. En este caso, puede funcionar simplemente proporcionando un entorno adecuado para la interacción de las hidrolasas de glucoesfingolípidos y su activador. Además, tiene un papel dinámico en el suministro de araquidonato para la producción de eicosanoides en macrófagos alveolares.

Para enzimas dependientes de BMP, la tasa de hidrólisis se incrementa drásticamente cuando el BMP está presente en la membrana, para la aSMasa incluso sin la presencia de una proteína activadora tal como una saposina. En la figura 4, un círculo punteado marca las enzimas, o la enfermedad en la que esta enzima es defectuosa, que muestran una dependencia del BMP.

El BMP está implicado en la patología de las enfermedades de almacenamiento lisosómico tales como la enfermedad de Niemann-Pick C (acumulación de colesterol) y determinadas lipidosis inducidas por fármacos. En estas circunstancias, su composición tiende a cambiar para favorecer especies moleculares que contienen menos componentes poliinsaturados. Es un antígeno reconocido por sueros autoinmunitarios de pacientes con una enfermedad rara y escasamente comprendida conocida como síndrome antifosfolípido, de modo que, probablemente, es un factor de la base patológica de esta enfermedad.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico, aprovechando la interacción entre la Hsp70 y el BMP.

#### Los trastornos de almacenamiento de lípidos

Los trastornos de almacenamiento de lípidos (o lipidosis) son un subgrupo de los trastornos de almacenamiento lisosómico en los que se acumulan cantidades dañinas de lípidos en el espacio intracelular debido a la expresión o la función reducida de las enzimas necesarias para metabolizar los lípidos. Con el tiempo, este almacenamiento de



lípido excesivo puede provocar daño celular y tisular, en particular en el cerebro, el sistema nervioso periférico, el hígado, el bazo y la médula ósea.

Los lípidos son un amplio grupo de moléculas naturales que incluyen grasas, ceras, esteroides, vitaminas liposolubles (tales como las vitaminas A, D, E y K), monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos y otros. Las principales funciones biológicas de los lípidos incluyen el almacenamiento de energía, como componentes estructurales de las membranas celulares y como importantes moléculas de señalización.

Los lípidos pueden definirse ampliamente como moléculas pequeñas hidrófobas o anfipáticas; la naturaleza anfipática de algunos lípidos les permite formar estructuras tales como vesículas, liposomas o membranas en un entorno acuoso. Los lípidos biológicos derivan, totalmente o en parte, de dos tipos diferentes de subunidades bioquímicas: grupos cetoácido e isopreno. Usando este enfoque, los lípidos pueden dividirse en ocho categorías: ácidos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos (derivados de la condensación de subunidades de cetoácido); y lípidos de esteroide y lípidos de prenol (derivados de la condensación de subunidades de isopreno).

Aunque el término lípido se usa a veces como sinónimo de grasas, las grasas son un subgrupo de lípidos llamados triglicéridos. Los lípidos también engloban moléculas tales como ácidos grasos y sus derivados (incluidos tri-, di-, y monoglicéridos y fosfolípidos), así como otros metabolitos que contienen esteroide tales como colesterol.

Se han caracterizado varios trastornos de almacenamiento lisosómico que se caracterizan por la acumulación de lípidos (es decir, trastornos de almacenamiento de lípidos); se explican en términos generales en el presente documento a continuación.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar trastornos de almacenamiento de lípidos.

#### *Enfermedad de Niemann-Pick*

La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) está provocada por un defecto en la enzima esfingomielinasa ácida (aSMasa), con el nombre sistemático de esfingomielina fosfodiesterasa. La mayoría de la esfingomielina de la membrana se hidroliza por la enzima lisosómica aSMasa para producir ceramida (y fosfocolina). La esfingomielina consiste en un anclaje a la membrana de ceramida que está enlazado a un resto de fosforilcolina hidrófilo corto.

La esfingomielinasa no depende de forma crítica de ninguna de las proteínas activadoras conocidas, lo que hace que el dominio activador intramolecular supuesto de la aSMasa y la presencia de lípidos cargados negativamente en los lisosomas sean suficiente para el recambio de esfingomielina. Por tanto, la aSMasa no requiere la presencia de saposinas como cofactores; sin embargo, la presencia de saposinas, de forma invariable, estimula adicionalmente la actividad de esta enzima. (Ferlinz *et al.*, 1999). El BMP estimula la actividad de la aSMasa.

Cuando la esfingomielina no puede metabolizarse correctamente, se acumula dentro de la célula, provocando en último término la muerte celular y la disfunción de los principales sistemas de órganos. Los síntomas pueden incluir falta de coordinación muscular, degeneración cerebral, problemas de aprendizaje, pérdida de tono muscular, aumento de la sensibilidad al tacto, espasticidad, dificultades para la alimentación y para tragar, mala articulación de las palabras e hígado y bazo aumentados de tamaño. Puede existir opacificación de la córnea y se desarrolla un halo característico rojo cereza alrededor del centro de la retina.

La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) tiene 4 tipos relacionados; tipos A, B, C y D. Todos los tipos de NPD se heredan con un patrón autosómico recesivo y pueden afectar tanto a hombres como a mujeres. En los tipos A y B, una actividad insuficiente de la enzima aSMasa provoca la acumulación de cantidades tóxicas de esfingomielina. La enfermedad se produce cuando ambas copias del gen aSMasa de una persona (ambos alelos) presentan una mutación.

La enfermedad de Niemann-Pick de tipo A (NPDA), el tipo más común, se produce en lactantes. Se caracteriza por ictericia, un hígado aumentado de tamaño y daño cerebral profundo. Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para personas con el tipo A y los pacientes con el tipo A mueren en la etapa de lactancia, normalmente antes de la edad de 18 meses.

La enfermedad de Niemann-Pick de tipo B (NPDB) implica un hígado y un bazo aumentados de tamaño, lo que suele ocurrir en los años previos a la adolescencia, y son comunes los problemas respiratorios. El aumento del tamaño de los órganos y los problemas respiratorios puede provocar estrés cardiovascular y pueden dar lugar a cardiopatías más adelante en su vida. En general, los pacientes con NPDB suelen tener poca o ninguna afectación neurológica. Se ha intentado el trasplante de médula ósea en unos pocos pacientes con el tipo B y se ha informado de resultados variados. El futuro desarrollo de tratamientos génicos y de restitución de enzimas también podría ser de ayuda para aquellos que padecen el tipo B. Los niños que padecen el tipo B pueden vivir un tiempo comparativamente largo, pero pueden necesitar oxígeno suplementario debido al deterioro pulmonar.

La NPDA y la NPDB están provocadas ambas por la misma deficiencia enzimática y existen cada vez más pruebas

de que las dos formas representan los extremos opuestos de un continuo. Las personas con NPDA suelen tener poca o ninguna producción de aSMasa (menos del 1 % de lo normal) mientras que los que padecen NPDB tienen aproximadamente un 10 % del nivel normal de aSMasa.

5 Hay aproximadamente 1.200 casos de NPA y NPB en todo el mundo, siendo la mayor parte de tipo B o una forma intermedia.

La NPDA y la NPDB se diagnostican midiendo el nivel de actividad de la aSMasa en leucocitos de una muestra de sangre. Si bien esta prueba identificará personas con el tipo B, no es muy fiable para detectar personas que son portadoras (con solo tienen una copia funcional del gen ASM). Además, la prueba mostrará una disminución de la actividad de la aSMasa, pero no siempre puede predecir si el individuo tiene el tipo A o el tipo B o una variante intermedia de la enfermedad; eso requiere evaluación clínica del individuo.

En determinadas poblaciones, las mutaciones específicas representan un alto porcentaje de casos de deficiencia de la aSMasa. Para la NPDA, las mutaciones R496L, fsP330 y L302O representan más del 95 % de los cambios genéticos que provocan la enfermedad en la población judía asquenazí. Para la identificación de portadores se realizan pruebas directas de individuos de esta población para estos 3 cambios. En otras poblaciones, primero deben identificarse las mutaciones en el individuo afectado antes de que pueda realizarse la prueba del ADN del portador para los miembros de la familia.

Para la NPDB, las mutaciones H421Y y K576N de la aSMasa representan el 85 % de la población árabe saudita con NPDB; las mutaciones L137P, fsP189 y L549P representan el 75 % de la población turca con NPDB; las mutaciones S379P, R441X y R474W representan el 55 % de la población portuguesa con NPDB; la mutación A196P representa el 42 % de la población inglesa/escocesa con NPDB y las mutaciones F480L y DeltaR608 también se han identificado como causantes de la enfermedad en pacientes con NPDB.

La enfermedad de Niemann-Pick de tipo C (NPDC) es muy diferente de las de tipo A o B. Los pacientes con NPDC no son capaces de metabolizar el colesterol y otros lípidos correctamente dentro de la célula y se caracteriza por un defecto que altera el transporte del colesterol entre las células cerebrales. En consecuencia, se acumulan cantidades excesivas de colesterol y otros lípidos en el hígado, el bazo y el cerebro. La NPDC provoca una reducción secundaria de la actividad de la aSMasa, que lo que dio lugar a que los tres tipos se consideraran formas de la misma enfermedad.

Existe una variación considerable entre cuando los síntomas de tipo C aparecen por primera vez y la progresión de la enfermedad. Los síntomas pueden aparecer tan pronto como a los pocos meses de edad o tan tarde como en la edad adulta. La parálisis de la mirada vertical (la incapacidad para mover los ojos hacia arriba y hacia abajo), un hígado aumentado de tamaño, un bazo aumentado de tamaño o la ictericia en niños pequeños son fuertes indicios de que debería considerarse la NPC. Es común que solo aparezcan uno o dos síntomas en las fases tempranas de la enfermedad. En la mayoría de los casos, los síntomas neurológicos comienzan a aparecer entre los 4 y los 10 años de edad. En general, cuanto más tarde comienzan los síntomas neurológicos, más lenta es la progresión de la enfermedad.

La enfermedad de Niemann-Pick de tipo C cuenta con aproximadamente 500 casos diagnosticados en todo el mundo. Sin embargo, se cree que el número de personas afectadas por la NPDC es mayor, pero las dificultades de diagnóstico no permiten una evaluación adecuada de la tasa de incidencia. Inicialmente, la NPDC se ha diagnosticado como una discapacidad del aprendizaje, retraso leve, torpeza y el retraso en el desarrollo de buenas habilidades motoras.

La enfermedad de Niemann-pick de tipo D se considera actualmente una variante del tipo C. El tipo D suele darse en gente con ancestros originarios de Nueva Escocia. Los individuos con los tipos C y D se someten frecuentemente a una dieta baja en colesterol, pero su beneficio clínico no es convincente. La esperanza de vida de las personas con los tipos C y D varía, aunque la enfermedad es siempre mortal. La inmensa mayoría de los niños mueren antes de los 20 años de edad.

La NPDC es una afección rara y extremadamente variable y, por lo tanto, puede no ser reconocida por algunos profesionales sanitarios. Para los especialistas que sospechan este diagnóstico en un paciente, puede determinarse tomando una biopsia de la piel, cultivando los fibroblastos y estudiando su capacidad para transportar y almacenar el colesterol. El transporte del colesterol en las células se estudia midiendo la conversión del colesterol de una forma a otra (esterificación). El almacenamiento de colesterol se evalúa tiñendo las células con un compuesto químico (filipina) que brilla bajo luz ultravioleta.

En 1997, se identificó el gen NPC1. Las mutaciones, o los cambios causantes de la enfermedad, en este gen son responsables de aproximadamente el 95 % de todos los casos NPDC. Desde entonces, se han identificado más de 250 mutaciones genéticas diferentes relacionadas con la NPDC en este gen y en el segundo gen de la NPDC, llamado NPC2. En general, en aproximadamente el 95 % de los casos, pueden identificarse los cambios genéticos que han provocado la enfermedad si se ha confirmado primero el diagnóstico de NPC mediante las pruebas explicadas anteriormente. Sin embargo, debido a que hay tantas mutaciones únicas en estos genes y a que hay pacientes con NPC clásica en los que no se han identificado mutaciones, no es óptimo usar pruebas genéticas como

herramienta general de diagnóstico para la NPDC.

La enfermedad de Niemann-Pick afecta a todos los segmentos de la población, con casos registrados de América del Norte, América del Sur, Europa, África, Asia y Australia. Sin embargo se ha descubierto una incidencia mayor en determinadas poblaciones:

- 5 • población judía asquenazí (NPDA y NPDB)
- población francocanadiense de Nueva Escocia (tipo D - ahora considerada una variante de la NPDC)
- región del Magreb (Túnez, Marruecos y Argelia) del norte de África (NPDB)
- población hispanoamericana del sur de Nuevo México y Colorado (NPDC)

10 La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la enfermedad de Niemann-Pick, mediante la modulación de la actividad de la enzima esfingomielinasa ácida (aSMasa).

#### *Enfermedad de Farber*

La enfermedad de Farber está provocada por un defecto en la enzima ceramidasa ácida. La ceramidasa ácida es responsable de la conversión de ceramida en esfingosina (y ácido graso); por tanto, el defecto da lugar a una acumulación de ceramida. El BMP estimula su actividad y es dependiente de saposinas.

15 La ceramidasa ácida también se conoce como N-acilesfingosina amidohidrolasa y está codificada por el gen ASAH1. Es una proteína heterodimérica que consiste en una subunidad alfa no glucosilada y una subunidad beta glucosilada que se escinde postraduccionalmente para dar la enzima madura.

20 La enfermedad de Farber también se conoce como lipogranulomatosis de Farber, deficiencia de ceramidasa, dismucopolisacaridosis fibrocítica y lipogranulomatosis. Es una enfermedad recesiva autosómica extremadamente rara caracterizada por anomalías en las articulaciones, el hígado, la garganta, los tejidos y el sistema nervioso central. El hígado, el corazón y los riñones también pueden verse afectados. Los síntomas se observan normalmente en las primeras semanas de vida e incluyen deterioro de la capacidad motora y mental y dificultad para tragar. Otros síntomas pueden incluir artritis, inflamación de ganglios linfáticos y articulaciones, ronquera, nódulos bajo la piel (y a veces en los pulmones y otras partes del organismo), acortamiento crónico de los músculos o los tendones en torno a las articulaciones y vómitos. Las personas afectadas pueden requerir la inserción de un tubo de respiración. En 25 casos graves, el hígado y bazo tienen un tamaño aumentado.

30 Actualmente no existe ningún tratamiento específico para la enfermedad de Farber. Los corticoesteroides pueden ayudar a aliviar el dolor. Los ganglios pueden tratarse con trasplantes de médula ósea, en casos determinados, o pueden reducirse o eliminarse quirúrgicamente. La mayoría de los niños con la forma clásica de la enfermedad de Farber mueren antes de los 2 años de edad, habitualmente por enfermedades pulmonares. Los individuos que tienen una forma más leve de la enfermedad puede vivir hasta sus años de adolescencia.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la enfermedad de Farber, mediante la modulación de la actividad de la enzima ceramidasa ácida.

#### *Enfermedad de Krabbe*

35 La enfermedad de Krabbe está provocada por un defecto en la enzima  $\beta$ -galactosilceramidasa. La  $\beta$ -galactosilceramidasa es responsable de la conversión de la galactosilceramida en ceramida; por tanto, el defecto da lugar a una acumulación de galactosilceramida. El BMP estimula su actividad y es dependiente de saposinas.

40 La enfermedad de Krabbe también se conoce como leucodistrofia de células globoides o lipidosis de galactosilceramida. Es un trastorno degenerativo autosómico recesivo, frecuentemente mortal, que afecta a la vaina de mielina del sistema nervioso. Se produce aproximadamente en 1 de 100.000 nacimientos. Se ha informado de una mayor prevalencia, de aproximadamente 1 de 6.000, en algunas comunidades árabes de Israel.

La enfermedad de Krabbe está provocada por mutaciones en el gen GALC, que provoca una deficiencia de la enzima galactosilceramidasa. La acumulación de lípidos afecta al crecimiento de la vaina de mielina que protege el nervio (el recubrimiento que aísla muchos nervios) y provoca una intensa degeneración de las habilidades motoras.

45 Los lactantes con enfermedad de Krabbe son normales al nacer. Los síntomas comienzan entre los 3 y los 6 meses de edad con irritabilidad, fiebres, rigidez de las extremidades, convulsiones, dificultades de alimentación, vómitos y ralentización del desarrollo mental y motor. En las primeras etapas de la enfermedad, los médicos suelen confundir los síntomas con los de la parálisis cerebral. Otros síntomas incluyen debilidad muscular, espasticidad, sordera, atrofia óptica y ceguera, parálisis y dificultad al tragar. También puede producirse una pérdida de peso prolongada. 50 También existen casos de enfermedad de Krabbe de inicio en la juventud y en la edad adulta, que tienen síntomas similares pero progresión más lenta. En lactantes, la enfermedad suele ser mortal antes de los 2 años de edad. Los pacientes con enfermedad de Krabbe de inicio tardío tienden a tener una progresión más lenta de la enfermedad y

viven un tiempo significativamente mayor.

Aunque no existe cura para la enfermedad de Krabbe, el trasplante de médula ósea se ha mostrado beneficioso en casos temprano en el curso de la enfermedad. En general, el tratamiento del trastorno es sintomático y de apoyo. La fisioterapia puede ayudar a mantener o incrementar el tono muscular y la circulación. Un estudio reciente informa de que los trasplantes de sangre de cordón umbilical han tenido éxito en la detención de la enfermedad, siempre que se realicen antes de que aparezcan los síntomas evidentes.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la enfermedad de Krabbe, mediante la modulación de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosilceramidasa.

#### *Enfermedad de Fabry*

La enfermedad de Fabry está provocada por un defecto en la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A. La  $\alpha$ -galactosidasa A es responsable de la conversión de la globotriaosilceramida en lactosilceramida; por tanto, el defecto da lugar a una acumulación de globotriaosilceramida (abreviada también como Gb3, GL-3 o trihexósido de ceramida). El BMP estimula su actividad y es dependiente de saposinas.

La enfermedad de Fabry también se conoce como enfermedad de Anderson-Fabry, angioqueratoma corporal difuso, síndrome de Ruiters-Pompen-Wyers, trihexosidosis de ceramida y enfermedad de Sweeley-Klionsky. Es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X (hereditaria) que afecta a hombres hemicigóticos, así como a mujeres tanto heterocigóticas como homocigóticas; los hombres tienden a experimentar los síntomas clínicos más graves, mientras que las mujeres varían de prácticamente sin síntomas a síntomas tan graves como los de los hombres. Se cree que esta variabilidad puede deberse a los patrones de inactivación del cromosoma X durante el desarrollo embrionario de la mujer.

Los síntomas incluyen anhidrosis (falta de sudoración), fatiga, angioqueratomas (lesiones cutáneas benignas de los capilares), dolor urente en las extremidades y afectación ocular. Los angioqueratomas son minúsculas pápulas indoloras que aparecen en cualquier región del cuerpo, pero predominan en los muslos, los glúteos, el abdomen inferior y las ingles. Puede presentarse una afectación ocular cosmética, mostrando córnea verticilada (también conocida como queratopatía en vórtice). La queratopatía puede ser la característica de presentación en portadores asintomáticos y debe diferenciarse de otras causas de queratopatía en vórtice (p. ej., depósito de fármacos en la córnea). Otros hallazgos oculares que pueden verse comprenden aneurismas conjuntivales, cataratas posteriores de tipo radial, edema papilar, edema macular, atrofia óptica y dilatación vascular de la retina. Las complicaciones renales son un efecto común y grave de la enfermedad; la insuficiencia renal y el fallo renal pueden empeorar a lo largo de la vida. A menudo, la proteinuria es el primer signo de afectación renal. También pueden producirse complicaciones cardíacas; los efectos relacionados con el corazón empeoran con la edad y puede dar lugar a un incremento del riesgo de cardiopatía. Los efectos cerebrovasculares dan lugar a un incremento del riesgo de apoplejía. Otros síntomas incluyen acúfenos, vértigo, náuseas y diarrea.

Normalmente, los síntomas se experimentan por primera vez en la infancia temprana y pueden ser muy difíciles de entender; la rareza de la enfermedad de Fabry para muchos médicos da lugar a veces a que realicen un diagnóstico erróneo o la pasen por alto. Las manifestaciones de la enfermedad suelen incrementar su número y gravedad con la edad del individuo.

Hasta hace poco, el tratamiento de la enfermedad de Fabry se dirigía a los efectos sintomáticos. Sin embargo, actualmente se está tratando a nivel celular mediante tratamiento de restitución de enzimas (ERT) usando agalsidasa alfa (Replagal) y agalsidasa beta (Fabrazyme). El coste de esos fármacos es un problema (aproximadamente 250.000 \$ estadounidenses al año/paciente) y sigue siendo una barrera para muchos pacientes en algunos países. El tratamiento de restitución de enzimas (normalmente infundido cada dos semanas) puede ser realizado en casa del paciente por el mismo paciente. El tratamiento de restitución de enzimas no es una cura y debe infundirse de forma recurrente para un beneficio máximo.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la enfermedad de Fabry, mediante la modulación de la actividad de la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A.

#### *Enfermedad de Gaucher*

La enfermedad de Gaucher está provocada por un defecto en la enzima glucosilceramidasa (también conocida como glucocerebrosidasa y  $\beta$ -glucosidasa ácida); una proteína de 55,6 KD y 497 aminoácidos de longitud. La glucosilceramidasa es responsable de la conversión de la glucosilceramida (o glucocerebrósido) en ceramida; por tanto, el defecto da lugar a una acumulación de glucosilceramida. El BMP estimula su actividad y es dependiente de saposinas.

La enfermedad de Gaucher es la más frecuente de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. El material graso puede acumularse en el bazo, el hígado, los riñones, los pulmones, el cerebro y la médula ósea.

Los síntomas pueden incluir bazo e hígado aumentados de tamaño, disfunción hepática, trastornos del esqueleto y

lesiones óseas que pueden ser dolorosas, complicaciones neurológicas graves, inflamación de los ganglios linfáticos y (ocasionalmente) articulaciones adyacentes, distensión abdominal, una coloración parduzca de la piel, anemia, plaquetas en sangre bajas y depósitos grasos amarillos adheridos a la esclerótica. Las personas más gravemente afectadas también pueden ser más susceptibles a infección.

5 La enfermedad muestra una herencia autosómica recesiva y, por lo tanto, afecta tanto a hombres como a mujeres. Las diferentes mutaciones de la glucosilceramidasa determinan la actividad residual de la enzima y, en gran medida, el fenotipo. La investigación indica que los heterocigotos para mutaciones particulares de la glucosilceramidasa tienen un riesgo incrementado de padecer la enfermedad de Parkinson y determinadas neoplasias malignas (linfoma no hodgkiniano, melanoma y cáncer de páncreas).

10 La glucosilceramida es un constituyente de la membrana celular de los eritrocitos y los leucocitos. Los macrófagos que eliminan estas células no pueden eliminar el producto de desecho, que se acumula en fibrillas y, a su vez, en células de Gaucher, que al microscopio óptico tienen un aspecto que se parece a un papel arrugado.

La enfermedad de Gaucher tiene tres subtipos clínicos comunes. Cada tipo se ha relacionado con mutaciones particulares. En total, existen aproximadamente 80 mutaciones conocidas.

15 • El tipo I (o tipo no neuropático) es la forma más común de la enfermedad, con una incidencia de aproximadamente 1 de 50.000 nacidos vivos. Se produce con la mayor frecuencia entre personas de herencia judía asquenazí, 100 veces la incidencia en la población en general. Los síntomas pueden comenzar a una edad temprana o en la edad adulta e incluyen hígado aumentado de tamaño y bazo extremadamente aumentado de tamaño (conjuntamente, hepatoesplenomegalia); el bazo puede romperse y provocar complicaciones adicionales. Pueden producirse debilidad del esqueleto y enfermedad ósea extensas. El aumento del tamaño del bazo y el reemplazo de la médula ósea pueden provocar anemia, trombocitopenia y leucopenia. El cerebro no se ve afectado, pero puede producirse deterioro pulmonar y, raramente, renal. Los pacientes de este grupo suelen presentar hematomas con facilidad (debido a los bajos niveles de plaquetas) y experimentan fatiga debido a los recuentos bajos de eritrocitos. Dependiendo del inicio y la gravedad de la enfermedad, los pacientes de tipo 1 pueden vivir hasta bien entrada la edad adulta. Muchos pacientes tienen una forma leve de la enfermedad o pueden no mostrar ningún síntoma.

20 • El tipo II (o enfermedad de Gaucher neuropática aguda infantil) comienza normalmente en los 6 primeros meses de vida y tiene una tasa de incidencia de aproximadamente 1 de 100.000 nacidos vivos. Los síntomas incluyen un hígado y un bazo aumentados de tamaño, daño cerebral extenso y progresivo, trastornos del movimiento ocular, espasticidad, convulsiones, rigidez de las extremidades y escasa capacidad de succión y para tragar. Los niños afectados suelen morir antes de los 2 años de edad.

30 • El tipo III (la forma neuropática crónica) pueda comenzar en cualquier momento en la infancia o incluso durante la edad adulta y se produce en aproximadamente 1 de 100.000 nacimientos vivos. Se caracteriza por síntomas neurológicos de progresión lenta pero más leves en comparación con la versión aguda o de tipo 2. Los síntomas principales incluyen un bazo y/o un hígado aumentados de tamaño, convulsiones, mala coordinación, irregularidades del esqueleto, trastornos del movimiento ocular, trastornos de la sangre como la anemia y problemas respiratorios. Los pacientes a menudo viven hasta los primeros años de adolescencia y la edad adulta.

35 La National Gaucher Foundation expone que aproximadamente 1 de 100 personas de la población de EE. UU. en general es portadora de la enfermedad de Gaucher de tipo 1, dando una prevalencia de 1 de 40000; entre judíos asquenazíes la tasa de portadores es considerablemente más alta, prácticamente de 1 de 15. La enfermedad de Gaucher de tipo 2 no muestra una preferencia particular por ningún grupo étnico. La enfermedad de Gaucher de tipo 3 es especialmente común en la población de la región del norte de Suecia de Norrbotten, donde la incidencia de la enfermedad es de 1 de 50.000.

40 Para los pacientes de tipo 1 y la mayoría de los de tipo 3, el tratamiento de restitución de enzimas con glucosilceramidasa recombinante intravenosa puede reducir el tamaño del hígado y del bazo, reducir las anomalías del esqueleto y revertir otras manifestaciones. La rareza de la enfermedad significa que ha sido difícil llevar a cabo estudios de búsqueda de dosis, por lo que sigue existiendo controversia acerca de la dosis óptima y la frecuencia de dosificación. Debido a la baja incidencia, este se ha convertido en un fármaco huérfano en muchos países. El tratamiento para la enfermedad de Gaucher existente en la actualidad, Cerezyme® (imiglucerasa inyectable), cuesta hasta 550.000 \$ estadounidenses al año para un solo paciente y el tratamiento debería continuar durante toda la vida. Miglustat es otro fármaco aprobado para esta enfermedad en 2003.

45 El trasplante de médula con éxito cura las manifestaciones no neurológicas de la enfermedad, debido a que introduce una población de monocitos con glucosilceramidasa activa. Sin embargo, este procedimiento conlleva un riesgo significativo y rara vez se realiza en pacientes con enfermedad de Gaucher. En escasas ocasiones puede ser necesaria una intervención quirúrgica para extirpar el bazo (esplenectomía) si el paciente tiene anemia o cuando el órgano aumentado de tamaño afecta al bienestar del paciente. La transfusión de sangre puede beneficiar a algunos pacientes con anemia. Otros pacientes pueden necesitar una artroplastia para mejorar su movilidad y su calidad de vida. Otras opciones de tratamiento incluyen antibióticos para las infecciones, antiepilépticos para las convulsiones,

bisfosfonatos para lesiones óseas y trasplantes hepáticos.

El tratamiento de reducción de sustrato podría resultar eficaz para detener el tipo 2, ya que puede atravesar la barrera hematoencefálica. Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para el daño cerebral grave que puede producirse en pacientes con la enfermedad de Gaucher de los tipos 2 y 3.

- 5 La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la enfermedad de Gaucher, mediante la modulación de la actividad de la enzima glucosilceramidasa.

#### *Sialidosis*

- 10 La sialidosis, o mucopolidosis de tipo I (ML I), está provocada por un defecto en la enzima sialidasa (o alfa-neuraminidasa). La sialidasa es responsable de la conversión de GM3 en lactosilceramida; por tanto, el defecto da lugar a una acumulación de GM3. El BMP estimula su actividad y es dependiente de saposinas.

- 15 La sialidosis se hereda de forma autosómica recesiva. Los síntomas se presentan al nacer o se desarrollan durante el primero año de vida. En muchos lactantes afectados, se observa una hinchazón excesiva por todo el cuerpo al nacer. Estos lactantes nacen a menudo con rasgos faciales toscos, tales como un puente nasal plano, párpados hinchados, encías agrandadas y tamaño de la lengua excesivo (macroglosia). Muchos lactantes con también nacen con malformaciones del esqueleto tales como dislocación de cadera. Los lactantes desarrollan con frecuencia contracciones musculares involuntarias (llamadas mioclonías) y tienen manchas rojas en los ojos (máculas rojo cereza). A menudo son incapaces de coordinar el movimiento voluntario (llamado ataxia). También se producen temblores, vista defectuosa y convulsiones. Las pruebas revelan un aumento anómalo del tamaño del hígado (hepatomegalia) y el bazo (esplenomegalia) y una hinchazón abdominal extrema. En general, los lactantes carecen de tono muscular (hipotonía) y tienen retraso mental que es grave inicialmente o progresivamente. Muchos pacientes padecen retraso del desarrollo e infecciones respiratorias. La mayoría de los lactantes con ML I mueren antes del año de edad.

La sialidosis se puede subcategorizar en función de la edad a la que comienzan los síntomas y los tipos de síntomas presentes. Los efectos de la enfermedad pueden variar de leves a graves.

- 25 La sialidosis es un trastorno raro que no tiene predilección racial. Se dispone de muy pocos datos demográficos, pero un estudio de los Países Bajos informó de una frecuencia de aproximadamente 1 caso de 2.175.000 nacimientos vivos. Sin embargo, esta tasa puede no ser aplicable a todas las poblaciones, algunas de las cuales podrían tener una incidencia mayor; además, la no asistencia a los reconocimientos médicos es un factor importante cuando la evaluación del recién nacido no es una opción.

- 30 Las opciones de tratamiento para la sialidosis siguen siendo limitadas y, principalmente, se dirigen al cuidado de apoyo y el alivio sintomático.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la sialidosis, mediante la modulación de la actividad de la sialidasa.

#### *Leucodistrofia metacromática*

- 35 La leucodistrofia metacromática (MLD) o deficiencia de arilsulfatasa A está provocada por un defecto en la enzima arilsulfatasa A (o cerebrósido-sulfatasa). La arilsulfatasa A es responsable de la conversión del sulfátido (o cerebrósido 3-sulfato) en galactosilceramida; por tanto, el defecto da lugar a una acumulación de sulfátido. El BMP estimula su actividad y es dependiente de saposinas.

- 40 Es una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comúnmente se engloba en la familia de las leucodistrofias. Las leucodistrofias afectan al crecimiento y/o al desarrollo de la mielina, el recubrimiento graso que actúa como aislante alrededor de las fibras nerviosas en todo el sistema nervioso central y periférico.

Al igual que en muchos otros trastornos genéticos que afectan al metabolismo lipídico, existen varias formas de MLD, que son infantil tardía, juvenil y adulta:

- 45 • En la *forma infantil tardía*, que es la forma más común de MLD, los niños afectados comienzan a tener dificultad para caminar después del primer año de vida. Los síntomas incluyen atrofia muscular progresiva y debilidad, rigidez muscular, retrasos en el desarrollo, pérdida progresiva de visión que conduce a la ceguera, convulsiones, dificultad para tragar, parálisis y demencia. Los niños pueden caer en estado comatoso. Sin tratamiento, la mayoría de los niños con esta forma de MLD mueren antes de los 5 años de edad, frecuentemente mucho antes.
- 50 • Los niños con la *forma juvenil* de MLD (inicio entre los 3-10 años de edad) suelen comenzar con empeoramiento del rendimiento escolar, deterioro mental y demencia y después desarrollan síntomas similares a los de la forma infantil tardía, pero con una progresión más lenta. La edad de la muerte varía, pero normalmente es de 10 a 15 años desde el inicio de los síntomas.

- La *forma adulta* comienza comúnmente después de los 16 años de edad como un trastorno psiquiátrico o una demencia progresiva. La MLD de inicio de la edad adulta progresa más lentamente que las formas infantil tardía y juvenil, con un curso que se prolonga durante una década o más.

En casos raros, el organismo puede compensar la deficiencia y la persona no mostrará ningún síntoma.

- 5 No existe cura para la MLD, ni tratamiento estándar alguno, es una enfermedad terminal. Los niños con la forma juvenil avanzada o la de inicio en la edad adulta y los pacientes con la forma infantil tardía que presentan síntomas reciben un tratamiento limitado a la gestión del dolor y los síntomas. Los pacientes con MLD infantil tardía presintomática, así como aquellos con MLD juvenil o adulta que son presintomáticos o que presentan síntomas de leves a moderados, tienen la opción del trasplante de médula ósea (incluido el trasplante de células madre), que
- 10 está en fase de investigación.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la leucodistrofia metacromática, mediante la modulación de la actividad de la enzima arilsulfatasa A.

#### *Deficiencia de saposinas*

- 15 Tanto en seres humanos como en ratones, las deficiencias en prosaposina/saposina dan lugar a déficits neurológicos graves.

Los pacientes humanos con mutaciones puntuales en la saposina A, B y C muestran fenotipos de enfermedad de Krabbe, leucodistrofia metacromática y enfermedad de Gaucher, lo que indica que sus principales sustratos *in vivo* son la galactosilceramida, el sulfátido y la glucosilceramida, respectivamente.

- 20 Enfermedad de Krabbe, atípica, debida a una deficiencia de saposina A: Un trastorno bioquímico hereditario que da lugar a una regresión neurológica a los pocos meses de nacer. La muerte suele producirse durante los primeros años de vida. El trastorno es similar a la enfermedad de Krabbe, pero se diferencia en el origen genético del defecto bioquímico. La enfermedad de Krabbe implica un defecto en el gen de la galactocerebrosidasa, mientras que la enfermedad de Krabbe atípica implica un defecto en el gen de la prosaposina que provoca una deficiencia de saposina A.

- 25 La saposina B, conocida anteriormente como SAP-1 y activador de sulfátido, estimula la hidrólisis de una amplia variedad de sustratos incluidos el sulfato de cerebrósido, el gangliósido GM1 y la globotriaosilceramida por la arilsulfatasa A, la beta-galactosidasa ácida y la alfa-galactosidasa, respectivamente. La deficiencia de saposina B humana, transmitida como un rasgo autosómico recesivo, da lugar a la acumulación tisular de cerebrósido sulfato y un cuadro clínico que se parece al de la leucodistrofia metacromática (leucodistrofia metacromática deficiente en activador) aunque con actividad arilsulfatasa normal. La deficiencia de saposina B es una enfermedad heterogénea
- 30 con un espectro similar al de la leucodistrofia metacromática.

- La saposina (SAP-) C es necesaria para la degradación de la glucosilceramida y su déficit da lugar a una forma variante de la enfermedad de Gaucher; enfermedad de Gaucher no neuropática debida a una deficiencia de SAP-C. En los pacientes se observan niveles muy altos de actividad quitotriosidasa, quimiocina CCL18, y concentración incrementada de glucosilceramida en plasma y actividad  $\beta$ -glucosidasa normal en fibroblastos epiteliales. Se han
- 35 identificado una mutación de aminoácido, p.L349P, situada en el dominio SAP-C y otra mutación, p.M1L, situada en el codón de iniciación de la proteína precursora prosaposina.

En unos pocos pacientes con Gaucher no neuropática se ha identificado una mutación tanto de saposina C como en la saposina D.

- 40 Las deficiencias combinadas en la saposina C y D en ratones dan lugar a un fenotipo neuropático con acumulación de glucosilceramida y alfa-hidroxi ceramida.

En ratones, la deficiencia de saposina D se asocia con acumulación de ceramida, pérdida parcial de células de Purkinje y alteración de la función del aparato urinario. Este fenotipo no imita la letalidad embrionaria mostrada por ratones con deficiencia total de ceramidasa ácida, la enzima análoga a la saposina D.

- 45 Se conocen dos mutaciones en humanos que dan lugar a la inactivación total de las cuatro saposinas y la prosaposina. La deficiencia de saposina total es una enfermedad devastadora con la implicación de varios órganos y varios esfingolípidos. Se ha informado de deficiencia de saposina combinada (o deficiencia de prosaposina) en un caso que presentaba una distrofia neurovisceral grave que provocó la muerte al poco de nacer. Varios esfingolípidos estaban altos en la orina, mostrando la globotriaosilceramida el incremento mayor. Se identificó una mutación
- 50 novedosa en el gen PSAP, siendo homocigótica para una mutación de sitio aceptor de ajuste dos bases corriente arriba del exón 10. Esta mutación dio lugar a un codón de detención prematuro y proporcionó niveles bajos de transcrito.

La presente invención se refiere, en una realización, a un procedimiento para tratar la deficiencia de saposina. Dicha deficiencia de saposina puede seleccionarse del grupo que consiste en deficiencia de saposina A, deficiencia de

saposina B, deficiencia de saposina C y deficiencia de saposina combinada (o deficiencia de prosaposina).

*Actividad enzimática residual*

5 Las enfermedades de almacenamiento lisosómico están provocadas, como se explica anteriormente en el presente documento, por una enzima defectuosa. Dicha enzima defectuosa puede no tener actividad residual o puede tener algo de actividad residual.

Actividad enzimática residual como se usa en el presente documento significa que, aunque la enzima es defectuosa, por ejemplo, por causa de una mutación, la actividad de la enzima no está completamente anulada, sino que está reducida hasta un nivel patológico.

10 La presente invención se refiere, en un aspecto, a un agente bioactivo para su uso en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico y a un procedimiento para el tratamiento de un individuo con una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

En una realización de la presente invención, la enfermedad de almacenamiento lisosómico que se trata de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque tiene actividad enzimática residual de la enzima defectuosa implicada en la patología de la enfermedad.

15 En una realización, dicha actividad enzimática residual está en el intervalo de desde el 0,1 % al 50 %, tal como en el intervalo del 0,1 al 1 %, por ejemplo, del 1 al 2 %, tal como del 2 al 3 %, por ejemplo, del 3 al 4 %, tal como del 4 al 5 %, por ejemplo, del 5 al 6 %, tal como del 6 al 7 %, por ejemplo, del 7 al 8 %, tal como del 8 al 9 %, por ejemplo, del 9 al 10 %, tal como del 10 al 11 %, por ejemplo, del 11 al 12 %, tal como del 12 al 13 %, por ejemplo, del 13 al 14 %, tal como del 14 al 15 %, por ejemplo, del 15 al 20 %, tal como del 20 al 25 %, por ejemplo, del 25 al 30 %, tal como del 30 al 35 %, por ejemplo, del 35 al 40 %, tal como del 40 al 45 %, por ejemplo en el intervalo del 45 al 50 % de la actividad enzimática residual.

*Modalidades de tratamiento actuales para las LSD*

25 No existen curas para las enfermedades de almacenamiento lisosómico y el tratamiento es principalmente sintomático, aunque se han intentado con cierto éxito el trasplante de médula ósea y el tratamiento de restitución de enzimas (ERT). Además, se está realizando el trasplante de sangre de cordón umbilical en centros especializados para una serie de estas enfermedades. Sin embargo, el tratamiento de trasplante va acompañado de graves efectos secundarios y, frecuentemente, supone complicaciones para los pacientes. Además, el tratamiento de reducción de sustrato, un procedimiento usado para reducir la acumulación de material de almacenamiento, se está evaluando actualmente para algunas de estas enfermedades.

30 Para la mayoría de las enfermedades de almacenamiento lisosómico, sigue sin satisfacerse una importante necesidad de proporcionar una modalidad de tratamiento eficaz.

35 El tratamiento de restitución de enzimas se ha desarrollado para un subconjunto de enfermedades de almacenamiento lisosómico y Cerezyme® lleva en el mercado varios años para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher. La enzima defectuosa, glucocerebrosidasa, se prepara mediante técnicas recombinantes y se administra por infusión intravenosa durante unas horas. El tratamiento no es una cura y los pacientes necesitan tratamiento de por vida para detener la progresión de la enfermedad. Algunos síntomas pueden mejorar por ERT.

Sin embargo, para la mayoría de las LSD, no se ha desarrollado un ERT eficaz. Esto puede ser porque la producción de enzima activa ha resultado una tarea difícil, debido a la compleja estructura de subunidades de las enzimas defectuosas. De hecho, las enzimas pueden plegarse de manera incorrecta tras su producción.

40 Para aquellas LSD en las que se dispone de ERT, existen inconvenientes que hacen que esta forma de tratamiento sea menos deseable. En primer lugar, el ERT es una forma de tratamiento muy cara, lo que es una carga económica para la sociedad y lo hace inaccesible para algunos pacientes. Asimismo, el ERT se dirige específicamente a una enfermedad solo. Se ha informado de algunos efectos secundarios para el Cerezyme®, incluidos el desarrollo de una respuesta inmunitaria, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, erupción cutánea, fatiga, dolor de cabeza, fiebre, mareos, escalofríos, dolor de espalda y frecuencia cardíaca rápida, así como síntomas que indican reacciones alérgicas.

50 Por tanto, las divulgaciones realizadas en la presente invención proporcionan un procedimiento nuevo e innovador para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. Esto es especialmente relevante para estas enfermedades para las que no se ha desarrollado un tratamiento eficaz, las que pueden beneficiarse de un tratamiento menos caro y las que pueden beneficiarse de un tratamiento combinado que comprende el agente bioactivo de la presente invención.

Como se divulga en el presente documento, el procedimiento de acuerdo con la presente invención proporciona una modalidad de tratamiento que es sustancialmente más barata de producir que el ERT y que se dirige a más de un trastorno de almacenamiento lisosómico específico.



La chaperonas moleculares, o proteínas de choque térmico, se presentan a continuación en el presente documento, dado que los inventores han descubierto que una interacción entre la proteína de choque térmico 70 y el BMP lisosómico, como se presenta anteriormente en el presente documento, constituye la base de la modulación de la actividad enzimática lisosómica, y del tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico, de acuerdo con la presente invención.

#### Las chaperonas moleculares

Después de gastar grandes cantidades de energía para transcribir en primer lugar y traducir después el código genético del ADN, la célula ha producido finalmente un polipéptido, cuya función probablemente es necesaria en ese punto de la vida de la célula. Sin embargo, deben superarse algunos obstáculos finales con el fin de lograr una proteína totalmente funcional, siendo uno de ellos el plegamiento correcto de esta cadena de polipéptido naciente. Los imperativos evolutivos de lograr un plegamiento correcto son evidentes; no solo sería una tremenda pérdida de energía sintetizar un péptido sin la conformación, y por tanto la función, adecuada, sino que también la agregación de tales proteínas en el lumen celular podría resultar perjudicial para la célula. De hecho, esta agregación es un resultado muy probable, teniendo en cuenta el entorno intracelular de alta concentración de proteínas, por lo que no resulta sorprendente que exista un maquinaria de proteínas sofisticada y compleja para ayudar en el plegamiento de proteínas, permitiendo que se mantenga el estado funcional de las proteínas bajo tales condiciones. Estas proteínas se denominan conjuntamente chaperonas moleculares porque, al igual que sus homólogos en seres humanos, evitan interacciones no deseadas entre sus proteínas cliente inmaduras.

Las chaperonas moleculares se encuentran en todos los compartimentos de una célula donde se producen reordenamientos conformacionales de proteínas y, aunque la síntesis de proteínas es la fuente principal de péptidos no plegados en la célula, una exposición de la célula a temperatura alta u otros estímulos que puedan hacer a las proteínas estructuralmente lábiles y, por lo tanto, propensas a no plegarse y agregarse, se supera con una respuesta celular específica que implica la producción de proteínas protectoras. Esta respuesta es un fenómeno observado en todos los tipos de células, desde las procariotas hasta las eucariotas, y se hace referencia a ella como la respuesta de choque térmico o de estrés. Las proteínas inducidas por esta respuesta se conocen como las proteínas de choque térmico (HSP), de las cuales existen varias familias. Estas familias están compuestas por proteínas relacionadas secuencialmente, estructuralmente y funcionalmente, aunque las chaperonas de familias distintas pueden diferir de forma destacable tanto en la estructura como en la función celular. Un ejemplo principal de una familia de chaperonas son las proteínas Hsp70, que constituyen la parte central de un sistema de chaperonas ubicuas presentes en la mayoría de compartimentos de células eucariotas, en eubacterias y en muchas arqueas. Esta familia se ha implicado recientemente en otros aspectos de la homeostasis celular además de funcionar como chaperona (principalmente a través de sus características anti-apoptóticas, sus funciones en inmunidad y la aparente dependencia de las células cancerosas de la regulación por incremento de Hsp70).

#### La familia de proteínas de choque térmico 70

Las proteínas Hsp70 están implicadas en una amplia variedad de procesos celulares, incluidos el plegamiento de proteínas y la degradación de proteínas celulares inestables, así como el desempeño de otros papeles citoprotectores. La función común de la Hsp70 en estos procesos parece ser la unión de segmentos hidrófobos cortos en polipéptidos parcialmente plegados, facilitando de este modo el plegamiento correcto y evitando la agregación. En eucariotas, las chaperonas Hsp70 interaccionan *in vivo* con diferentes clases de proteínas que sirven para regular las etapas críticas de su ciclo funcional; entre ellas la familia de proteínas Hsp40 con dominio J. Además, se han identificado proteínas compañeras adicionales, algunas de las cuales enlazan Hsp70 a otros sistemas de chaperonas tales como el sistema Hsp90.

#### *Miembros de la familia Hsp70 humana*

Algunas de las funciones importantes atribuidas a las chaperonas moleculares incluyen importar proteínas a los compartimentos celulares, plegamiento de proteínas en el citosol, el retículo endoplásmico y las mitocondrias, evitar la agregación de proteínas y volver a plegar proteínas mal plegadas. En la actualidad, la familia Hsp70 humana incluye 10 miembros codificados por diferentes genes y esta sección está destinada a proporcionar una visión general de los miembros de esta familia con respecto a la función, los patrones de expresión y la homología. Existe cierta confusión acerca de la nomenclatura de los diferentes miembros de la familia Hsp70 humana, aunque se han establecido una serie de directrices generales por Tavaría *et al.*, que proporciona una relación lógica entre nombres de locus, genes y proteínas. Sin embargo, como todavía existe cierta confusión entre especies, en el presente documento se hace referencia a los genes y proteínas de Hsp70 por el nombre de su locus. El nombre Hsp70 puede referirse a los dos miembros inducibles de la familia Hsp70 con nombres de locus HSPA1A y HSPA1B o a toda la familia Hsp70 en general, como resulte evidente a partir del consenso del texto. Sin embargo, como se usa a lo largo de la presente invención, con Hsp70 se pretende designar a cualquiera de los dos miembros inducibles de la familia Hsp70 con nombres de locus HSPA1A y HSPA1B.

#### *HspA1A y HspA1B*

Los genes transcritos a partir de los locus HSPA1A y HSPA1B son los dos genes de Hsp70 inducibles por

calor/estrés y la mayoría de la literatura concerniente a Hsp70 humana se refiere a las proteínas codificadas por estos dos genes. Los genes dan lugar a proteínas que constan de 641 aminoácidos, con una homología del 99 % entre sí y que fueron los primeros miembros de la familia Hsp70 humana en clonarse y caracterizarse. Los genes están enlazados en el complejo MHC de clase III en 6p21.3, no tienen intrones y tienen regiones promotoras que contienen HSE, lo que les permite unirse a HSF e inducir la transcripción en respuesta a una variedad de agresiones celulares.

La secuencia proteica para la proteína de choque térmico de 70 kDa 1A de Homo sapiens (HSPA1 A) es la (SEC ID N.º: 1) (N.º de acceso NM\_005345.5):

```
MAKAAAIGIDLGTITYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDA
KRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPQVINDGDKPKVQVS YKGETKAFYPEEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVT
NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNVLR IINEPTAAATAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFEVEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLRTACERAKRTLSSSTQA
SLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLL
QDFFNGRDLNKSINPDEAVAYGA AVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLETAGGVMTALIKRNSTI
PTKQTQIFITTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPA PRGVPQIEVTFDIDANGILNVIA
TDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEA EKYKAEDEVQRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
KISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEF EHKRKELEQVCNPIISGLYQGAGGPGGGFGAQQGPKGG
SGSGPTIEEVD
```

La secuencia de ácidos nucleicos (ADN) para la proteína de choque térmico de 70 kDa 1A de Homo sapiens (HSPA1 A) es la (SEC ID N.º: 2) (N.º de acceso NM\_005345.5):

```
1 ataaaagccc aggggcaagc ggtccgata acggctagcc tgaggagctg ctgcgacagt
61 ccactacctt tttcgagagt gactcccggt gtcccaaggc ttcccagagc gaacctgtgc
121 ggctgcaggc accggcgcgt cgagtttccg gcgtccgaa ggaccgagct cttctcgcgg
181 atccagtgtt ccggtttccag cccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcagggaacc
```

```

241 ggcatggcca aagccgcggc gatcggcacc gacctgggca ccactactc ctgcgtgggg
301 gtgttccaac acggcaaggt ggagatcacc gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc
361 agctacgtgg ccttcacgga caccgagcgg ctcacggggg atgcggccaa gaaccaggtg
421 gcgctgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg caagttcggc
481 gaaccggtgg tgcagtgagg catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac
541 aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccg cgaggagatc
601 tcgtccatgg tgcgaccaa gatgaaggag atcgccgagg cgtacctggg ctaccgggtg
661 accaacgcgg tgatcaccgt gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca ggccaccaag
721 gatgcgggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgcggatca tcaacgagcc cagggccgcc
781 gccatcgctt acggcctgga cagaacgggc aagggggagg gcaacgtgct catctttgac
841 ctgggcgggg gcaccttcga cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat cttcgaggtg
901 aagggcacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac
961 cacttcgtgg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc
1021 gtgagggcgg tgcgcaccgc ctgcgagagg gccaaaggga ccctgtcgtc cagcaccag
1081 gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcacgact tctacacgtc catcaccagg
1141 gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag
1201 gctctgcgcg acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggctct ggtcgggggg
1261 tccaccgcga tccccaaggt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgcgacctg
1321 aacaagacca tcaaccacga cgaggtctgt gcctacgggg cggcgggtga ggccgccatc
1381 ctgatggggg acaagtcgga gaacgtgcag gacctgtgct tgctggagct ggctccctg
1441 tcgctggggc tggagacggc cggagggcgt atgactgccc tgatcaagcg caactccacc
1501 atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg
1561 atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt ggggcgcttc
1621 gagctgagcg gcattccctc ggcccccagg ggctgcccc agatcgaggt gaccttcgac
1681 atcgatgcca acggcatcct gaacgtcacg gccacggaca agagcaccgg caaggccaac
1741 aagatcacca tcaccaacga caaggcgccg ctgagcaagg aggagatcga gcgcatggtg
1801 caggaggcgg agaagtacaa agcggaggac gaggtgcagc gcgagagggt gtacgccaag
1861 aacgcccctg agtccctacg cttcaacatg aagagcgccg tggaggatga ggggtcgaag
1921 ggcaagatca gcgagggcga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga ggtcatctcg
1981 tggctggacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagtttg agcacaagag gaaggagctg
2041 gagcaggtgt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgccggtgg tccccggcct
2101 gggggcttcg gggctcaggg tcccaaggga gggctcgggt caggccccac cattgaggag
2161 gtagattagg gccctttcca agattgctgt tttgttttg gagcttcaag actttgcatt
2221 tcctagtatt tctgtttgct agttctcaat ttctgtgtt tgcaatggtg aaatttttg
2281 gtgaagtact gaacttgctt tttttccggt ttctacatgc agagatgaat ttatactgcc
2341 atcttacgac tatttcttct ttttaataca ctttaactcag gccatttttt aagttgggta
2401 cttcaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaaa aaaaa

```

La secuencia proteica para la proteína de choque térmico de 70 kDa 1B de Homo sapiens (HSPA1 B) es la (SEC ID N.º: 3) (N.º de acceso: NM\_005346):

```

MAKAAAIIGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFIDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDA
KRLIGRKFGDPVVQSDMKHWPFFQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYPPEIISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVT
NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVLRINEPTAAAIAYGLDRTGKGERNVLIFDLGGGTFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFEVEFKRKHKKDISQNKRAVRLRTACERAKRTLSSSTQA
SLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVLVGGSTRIPKVQKLL
QDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTALIKRNTI
PTKQTQIFTTYSNQPGLVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPPQIEVTFDIDANGILNVT
TDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEVQREVSANKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
KISEADKKKVLQKQCEVISWLDANTLAEKDEFHKKRKELEQVCNPIISGLYQAGGPGPGGFGAQGPKGG
SGSGPTIEEVD

```

- 5 La secuencia de ácidos nucleicos (ADN) para la proteína de choque térmico de 70 kDa 1B de Homo sapiens (HSPA1 B) es la (SEC ID N.º: 4) (N.º de acceso: NM\_005346):

```

1  ggaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg aggggtccgct tcgtctttcg agagtgaactc
61  ccgcgggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgcggctg caggcaccgg cgtgttgagt
121  ttccggcggtt ccgaaggact gagctcttgt ccgcggatccc gtccgcggtt tccagccccc
181  agtctcagag cggagccccc agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc
241  atcgacctgg gcaccaccta ctctgctggt ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc
301  atcgccaacg accagggcaa ccgcaccacc ccagctacg tggccttcac ggacaccgag
361  cggctcatcg gggatggggc caagaaccag gtggcgtga accgcagaa caccgtgttt
421  gacgcgaagc ggtgatcgg ccgcaagttc ggcgaccggg tgggtcagtc ggacatgaag
481  cactggcctt tccagggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagctacaag
541  ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgctcca tgggtgctgac caagatgaag
601  gagatcgccg aggcgtacct gggctacccg gtgaccaacg cgtgatcac cgtgccggcc
661  tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgcgg gtgtgatcgc ggggtcaac
721  gtgctgcgga ccatcaacga gccacggccc gccgcatcgc cctacggcct ggacacacg
781  ggcaaggggg agcgcaacgt gctcatcttt gacctggggc ggggcacctt cgacgtgttc
841  atcctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacctg
901  ggtggggagg actttgacaa caggctgggtg aaccacttcg tggaggagtt caagagaaaa
961  cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggtgcgcac cgctgcgag
1021 agggccaaga ggacctgtc gtccagcacc caggccagcc tggagatcga ctccctgttt
1081 gagggcatcg acttctacac gtccatcacc agggcgaggt tcgaggagct gtgctccgac
1141 ctgttccgaa gcacctgga gccgtggag aaggctctgc gcgacgcaa gctggacaag
1201 gccagattc accagctggt cctggtcggg ggctccacc gcaccccaa ggtgcagaag
1261 ctgctgcagg acttcttcaa cgggcgcgac ctgaacaaga gcacacccc cgacgaggct
1321 gtggcctacg gggcgggcgt gcaggcgccc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg
1381 caggacctgc tgcgtgctga cgtggctccc ctgctcgctg ggtggagac ggcggaggc
1441 gtgatgactg cctgatcaa gcgcaactcc accatcccca ccaagcagac gcagatcttc
1501 accacctact ccgacaacca acccggggtg ctgatccagg tgtacgaggg cgagagggct
1561 atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggccccc
1621 agactgtacc ccagatcga ggtgaccttc gacatcgatg ccaacggcat cctgaacgtc
1681 acggccacgg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatca ccatcaccaa cgacaagggc
1741 cgctcgagca aggaggagat cgagcgcgat gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag
1801 gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaaacgcc tggagtccta cgcttcaac
1861 atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggcaaga tcagcgaggc ggacaagaag
1921 aaggttcttg acaagtgtca agaggtcatc tcgtggcttg acgccaacac cttggccgag
1981 aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaaccc catcatcagc
2041 gactgtacc aggtgcggg tggcccggt cctggcggtc tcggggctca ggtgccaaag
2101 ggagggtctg ggtcaggccc taccattgag gagggtgatt aggggccttt gttctttagt
2161 atgtttgtct ttgaggtgga ctgttgggac tcaaggactt tgcgtgctgt ttcttatgtc
2221 atttctgctt cagctctttg ctgcttcaat tctttgtaaa gttgtaacct gatggtaatt
2281 agctggcttc attatttttg tagtacaacc gatatgttca ttagaattct ttgcatttaa
2341 tgttgatact gtaagggtgt ttcgttcctt taaatgaat caacactgcc accttctgta
2401 cgagtttgtt tgtttttttt tttttttttt ttttttgctt ggcgaaaaca ctacaaaggc
2461 tgggaatgta tgtttttata atttgtttat ttaaataatga aaaataaaat gttaaacttt
2521 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

#### HspA1 L y HspA2

Dos miembros de la familia Hsp70 se han denominado “genes machistas” porque las células germinales masculinas favorecen su expresión con fuerte predisposición. El gen *hspA1L* es un miembro de la familia Hsp70 sin intrones expresado de forma constitutiva situado a 4 kb en dirección telomérica con respecto al locus de HSPA1A en el mismo complejo de MHC de clase III en el cromosoma 6. Se expresa en pequeñas cantidades tanto antes como después del choque térmico, pero favoreciendo el patrón de expresión los testículos en ratón, rata y ser humano, siendo la proteína de 641 aminoácidos (aa) homóloga al 90 % con HspA1A. El gen *hspA2* se aisló por primera vez a partir de una colección genómica de ratón y después se ha demostrado que se expresa de forma constitutiva, aunque en niveles bajos, en diversos tejidos del cuerpo humano, incluidos músculo esquelético, ovario, intestino delgado, colon, cerebro, placenta y riñones, pero se expresa altamente en testículos. Su expresión, o más bien la falta de ella, se ha relacionado con la espermatogénesis humana anómala y los ratones macho *hspA2*<sup>(+/+)</sup> son estériles. El gen se sitúa en el cromosoma 14, dando lugar a una proteína de 639 aa con una homología del 84 % con HspA1 A, aunque la situación exacta es objeto de debate, ya que dos artículos han presentado diferentes posiciones de locus: 14q24.1 frente a 14q22.

#### HspA6 y HspA7

Los genes *hspA6* y *hspA7* son miembros de la familia Hsp70 inducibles por calor sin homólogos aparentes en ratones. Contienen HSE en sus sitios de promotor y los genes no tienen intrones. Si sitúan juntos en el cromosoma 1 y son un 94 % homólogos entre sí en la secuencia de nucleótidos. Sin embargo, solo la HspA6 es funcional, ya que

el gen *hspA7* alberga una inserción de nucleótido individual que genera un codón de detención prematuro en +1324. La proteína HspA6 tiene 643 aa de largo y muestra una homología del 77 % con Hspa1 A y HspA1 B.

#### *HspA5 y HspA9*

5 Los genes *hspA5* y *hspA9* son los dos miembros de la familia Hsp70 específicos de compartimento. La proteína Hspa5 de 655 aa se sitúa en el retículo endoplásmico (RE) y facilita el plegamiento y el transporte de proteínas recién sintetizadas en este compartimento. La proteína es un 64 % homóloga a la Hspa1 A, situándose el gen en 9q34. La proteína HspA9 de 679 aa se sitúa en la mitocondria, donde ayuda al plegamiento de las proteínas después de su transporte a través de la membrana mitocondrial. HspA9 se sitúa en 5q31.1, siendo la proteína a un 52 % homóloga a HspA1 A.

#### 10 *HspA8*

El miembro análogo de Hsp70 conocido como Hsc70 está codificado por un gen llamado *hspA8* en 11q24, dando lugar a una proteína de 646 aa con una homología del 86 % con HspA1A, y se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos y líneas celulares. La proteína es análoga a Hsp70 en sus funciones celulares, proporcionando el acompañamiento necesario en circunstancias normales, pero también se le ha atribuido un papel en la retirada del recubrimiento en vesículas recubiertas de clatrina, así como en la autofagia mediada por chaperonas.

#### *HspA3 y HspA4*

Estos no se analizarán aquí, ya que existen dudas sobre si HSPA3 existe realmente y dado que lo más probable es que HSPA4 sea un miembro de la familia Hsp110 y no se sabe nada sobre ello hasta el momento, excepto su situación en el cromosoma, en 5q31.1-2.

Locus	Nombre usado en el presente documento, Gen/Proteína	Posición	% de homología de aa con HSPA1A	Nombres alternativos
HSPA1A	<i>hspA1A</i> /HspA1A (Hsp70)	6p23.1	100	Hsp70; Hsp72; Hsp70-1
HSPA1B	<i>hspA1B</i> /HspA1B (Hsp70)	6p23.1	99	Hsp70; Hsp72; Hsp70-2
HSPA1L	<i>hspA1L</i> /HspA1L	6p23.1	90	Hsp70-Hom; Hsp70t
HSPA2	<i>hspA2</i> /HspA2	14q24.1	84	Hsp70-3
HSPA4	<i>hspA4</i> /HspA4	5q31.1	31	Hsp70RY; APG-2
HSPA5	<i>hspA5</i> /HspA5	9q34	64	BiP; GRP78
HSPA6	<i>hspA6</i> /HspA6	1q	84	Hsp70-6; Hsp70B'
HSPA7	<i>hspA7</i> /HspA7	1q	-	Hsp70-7; Hsp70B
HSPA8	<i>hspA8</i> /HspA8 (Hsc70)	11q24	86	Hsc70; Hsp73
HSPA9	<i>hspA9</i> /HspA9	5q31.1	52	GRP75; PBP74; mtHsp75; mortalina; mot-2

**Tabla 1: Lista de miembros de la familia Hsp70 humana.** Los genes se enumeran en función del nombre del locus, los nombres usados en el presente documento, la situación en el cromosoma (posición), la homología de aminoácidos con HspA1A, así como de los nombres alternativos que se ven con frecuencia en la literatura.

#### 20 Regulación transcripcional de Hsp70

La determinación de la huella genómica del promotor de la Hsp70 humana ha revelado que el choque térmico/estrés induce una unión rápida de factores de transcripción de choque térmico (HSF) a una región que engloba secuencias nGAAn denominadas elementos de choque térmico (HSE). En condiciones normales, la Hsp70 se une a HSF, que residen en el citosol, pero durante el estrés, los HSF se separan de la Hsp70 y adoptan una conformación homotrimérica tras la fosforilación por PKC u otras serina/treonina quinasas. Los trómeros de HSF entran en el núcleo, donde se unen a HSE situados en la región promotora de los genes de Hsp70 y se fosforilan adicionalmente por quinasas de HSF.

Hasta ahora se han caracterizado tres HSF en seres humanos (HSF1, HSF2 y HSF4). El HSF1 es el principal factor de transcripción activado en la mayoría de condiciones de estrés y responde frente a una amplia variedad de

estímulos, que pueden categorizarse en fisiológicos (p. ej., división celular, estimulación hormonal), patológicos (p. ej., infecciones, fiebre, inflamación, neoplasias malignas) y condiciones ambientales (p. ej., choque térmico, metales pesados, etanol). El HSF2 responde solo frente a hemina, mientras que el HSF4 se expresa preferentemente en corazón, páncreas, cerebro y músculo esquelético humanos, carece de la repetición hidrófoba en c-terminal que comparten todos los HSF de vertebrados y parece reprimir la expresión de las HSP. La regulación del gen de la Hsp70 responsable de la síntesis de la Hsp70 que se expresa constitutivamente (Hsc70) no se comprende claramente, pero los HSF no parecen estar implicados.

Aunque los HSF son los factores reguladores de la expresión de las HSP más destacados, se ha demostrado que otros factores de transcripción poseen la misma capacidad. Se ha demostrado que factores de unión a la caja CCAAT (CBF) específicos inducen la transcripción de Hsp70, el supresor de tumores p53 puede reprimir la transcripción uniéndose a la región promotora de Hsp70 y neutralizando el CBF, y los HSF pueden ser antagonizados por la proteína de unión a factor de choque térmico 1 (HSBP1), que atenúa de este modo la transcripción de Hsp70.

#### Propiedades estructurales y funcionales de Hsp70

La estructura y la función del sistema Hsp70 se entienden mejor para la Hsp70 de eubacterias, DnaK, su cochaperona de Hsp40 DnaJ y el factor intercambiador de nucleótidos GrpE. Sin embargo, en general, el mecanismo se considera análogo en eucariotas, aunque las pruebas apuntan a un desacoplamiento de GrpE. Esta sección se centrará en el sistema Hsp70 eucariota, pero también incluirá comentarios sobre el sistema en eubacterias, cuando se considere apropiado.

La Hsp70 se compone de dos elementos funcionales, un dominio ATPasa N-terminal y un dominio más pequeño C-terminal de unión a péptidos. El dominio ATPasa se compone de dos subdominios separados por una hendidura que contiene el sitio de unión a nucleótidos, que determina las propiedades de unión a péptidos del dominio C-terminal. Cuando está unido el ATP, los sustratos peptídicos se unen y disocian rápidamente, aunque con baja afinidad, mientras que en un estado en el que ningún nucleótido o ADP está unido al dominio N-terminal, la velocidad de unión y disociación de péptidos se reduce y la afinidad se incrementa. Por tanto, la hidrólisis de ATP funciona como un conmutador molecular entre dos estados de Hsp70, cuyo ciclo está regulado por la familia de proteínas Hsp40 con dominio J en eucariotas y por DnaJ y GrpE en eubacterias. El dominio J N-terminal de Hsp40 se une a Hsp70, acelerando la hidrólisis del ATP, facilitando de este modo la captura de péptidos, mientras que la parte C-terminal de Hsp40 funciona como chaperona reconociendo péptidos hidrófobos, mediante lo cual Hsp70 se recluta a cadenas polipeptídicas nacientes. Es importante señalar que las chaperonas moleculares no proporcionan información estérica específica para el plegamiento de la proteína unida, sino que inhiben las interacciones improductivas, permitiendo así que la proteína se pliegue de forma más eficaz en su estructura nativa.

En eubacterias, GrpE induce la liberación de ADP desde DnaK (Hsp70 bacteriana), mientras que para proteínas Hsp70 eucariotas, un factor de este tipo parece ser prescindible porque la etapa limitante de la velocidad en este ciclo de la ATPasa no es la disociación del ADP unido, sino la propia hidrólisis del ATP. Sin embargo, proteínas adicionales llevan a cabo la regulación de la función de Hsp70 en eucariotas; funcionando la proteína homooligomérica Hip (proteína de interacción con Hsp70) como un regulador positivo estabilizando el estado unido a ADP de la Hsp70, mientras que las proteínas atánógeno asociado a Bcl-2 1 (Bag-1) y proteína de unión al extremo carboxilo de Hsp70 (CHIP) tienen ambos efectos inhibidores; CHIP inhibiendo la actividad ATPasa de Hsp70 y Bag-1 antagonizando la actividad de replegamiento de Hsp70. Las dos proteínas Hsp 40 humanas Hdj1 y Hdj2 proporcionan interacciones adicionales. Además de sus funciones de Hsp40 (descritas anteriormente), han demostrado facilitar el acoplamiento de Hsp70 y Hsp90 a través de Hop (proteína organizadora de Hsp), una proteína adaptadora que enlaza físicamente las chaperonas a través de sus dos dominio de repeticiones tetratricopeptídicas (TPR) que se unen a las secuencias C-terminales extendidas de Hsp70 y Hsp90, respectivamente. Recientemente, se ha mostrado que algunas de las proteínas mencionada anteriormente son reguladoras en la transferencia de proteínas no nativas o irreversiblemente mal plegadas desde las chaperonas a la maquinaria de ubiquitina-proteasoma. La proteína CHIP, aparte de su papel regulador negativo sobre Hsp70, puede asociarse con Hsp90 a través de un dominio TPR N-terminal y se dirige a sustratos de Hsp90 para degradarlos a través de un dominio de ubiquitina ligasa C-terminal, pero también puede cooperar funcionalmente con BAG-1, que se une a Hsp70, así como el proteasoma. Estos hallazgos proporcionan un posible vínculo entre los mecanismos que integran el plegamiento asistido por chaperonas y la degradación proteolítica, los dos principales componentes del control de calidad de las proteínas en el citosol.

#### Citoprotección por medio de Hsp70

Además de sus capacidades antiapoptóticas consecuencia de ser un chaperona molecular, es decir, facilitar el plegamiento de proteínas bajo condiciones que de otro modo sería desnaturizantes, la Hsp70 también puede afectar a la supervivencia de las células de otras maneras diversas, incluida la protección de la función mitocondrial después lesión por isquemia/reperfusión, bloqueando la activación de la quinasa de estrés quinasa N-terminal c-jun (JNK) tras la estimulación de fibroblastos primarios con TNF, se ha propuesto que el complejo Hsp70/Bag-1 regula el crecimiento celular y la mitogénesis durante condiciones de estrés celular. La capacidad de Hsp70 para proteger a las células de la muerte celular inducida por una serie de estímulos tales como TNF, TRAIL, estrés oxidativo,

radiación UV y los fármacos anticancerosos doxorubicina, etopósido y taxol enfatiza adicionalmente sus características antiapoptóticas. Por último, también se han proporcionado informes con pruebas de interacciones más directas entre Hsp70 y la maquinaria apoptótica, ya que se ha mostrado que la Hsp70 antagoniza al factor inductor de la apoptosis (AIF), así como también ejerce una función antiapoptótica después de la caspasa 3.

Pruebas recientes también sugieren que partes del potente efecto citoprotector de Hsp70 se deben a la estabilización de las membranas lisosómicas. Como prueba de esto, la disminución de Hsp70 desencadena una permeabilización temprana de membranas lisosómicas y la muerte celular mediada por catepsina en células cancerosas, y la Hsp70 exógena inhibe eficazmente la desestabilización lisosómica inducida por diversos estreses. Además, los ratones deficientes de Hsp70 padecen pancreatitis provocada por la pérdida de proteasas lisosómicas en el citosol. Todos estos acontecimientos acentúan el papel de Hsp70 como un importante regulador de la PCD y, en consecuencia, un factor de supervivencia para las células.

#### Hsp70 en cáncer

A menudo, Hsp70 se sobreexpresa en tumores humanos malignos, y su expresión se correlaciona con un pronóstico pobre en tumores de mama y endometriales. De acuerdo con esto, Hsp70 incrementa el potencial tumorigeno de células de roedores implantadas en animales inmunocomprometidos o singénicos.

El papel de Hsp70 como factor esencial para la supervivencia de células cancerosas está corroborado además por un informe de Wei *et al.*, que hizo el primer estudio de disminución de Hsp70 en células cancerosas. Los resultados indicaron que, cuando se inhibió la expresión de Hsp70 en diversas líneas de células cancerosas por el uso de un oligómero antisentido, se indujo la inhibición de la proliferación celular y de la apoptosis posterior. Este trabajo se ha corroborado en una serie de experimentos en los que la disminución mediada por antisentido adenovírico de Hsp70 desencadena un programa de muerte lisosómica específica de células tumorales.

Los estudios *in vivo* que utilizan xenoinjertos ortotópicos de glioblastoma y carcinomas de mama así como xenoinjertos subcutáneos de carcinoma de colon en ratones inmunodeficientes también han demostrado el potencial anticancerígeno de la disminución de Hsp70, ya que los tumores de ratones que recibieron aplicación locorregional de la construcción adenovírica mencionada anteriormente mostraron muerte celular de tipo apoptosis masiva y el reclutamiento de macrófagos. Estos estudios demuestran claramente la dependencia de algunos tumores sobre la presencia de Hsp70, aunque otros estudios han sostenido que la citotoxicidad observada en cultivos celulares después de la disminución mediada por adenovirus de Hsp70 se debe a una combinación de tensión celular mediada víricamente y de regulación por disminución de Hsp70. A pesar de esta controversia, la citotoxicidad en cultivos celulares inducidos por la disminución de Hsp70 no dependía de las caspasas ya que ni la sobreexpresión de Bcl-2 ni la inhibición farmacológica de las caspasas pudieron rescatar las células. Más bien, el desencadenamiento de LMP y la liberación de catepsinas en el citosol fue probablemente el acontecimiento inductor de muerte ya que la inhibición de cisteína catepsinas confería una citoprotección significativa. Además, la disminución de Hsp70 en los xenoinjertos tumorales mencionados anteriormente en ratones conduce a la liberación de catepsinas y a la muerte de las células tumorales.

Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos citoprotectores de Hsp70, que parece que muchas células cancerosas han adaptado, es la translocación de Hsp70 en el compartimento endolisosómico en el que cumple un papel protector de membrana. Esta translocación no solo puede ser provocada por la necesidad de proteger las membranas lisosómicas, ya que los estudios han demostrado que más del 50 % de los tumores muestran localización de Hsp70 sobre la superficie de la membrana plasmática, un área que está directamente conectada con el compartimento endolisosómico por medio de acontecimientos endocitóticos y secretores, como se ha descrito anteriormente. La Hsp70 expuesta en superficie presenta un único epítipo que puede actuar como una estructura de reconocimiento para linfocitos citolíticos naturales (NK), estimulando su proliferación y actividad citolítica. Los linfocitos NK activados por esta secuencia de péptidos de Hsp70 ha demostrado que inhibe el crecimiento tumoral en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID), un posible mecanismo para esto podría ser que la Hsp70 unida a la superficie celular medie en la apoptosis por la unión específica y la incorporación de granzima B, independiente de perforina.

Como se ha escrito previamente, las membranas endolisosómicas y las membranas plasmáticas se intercambian constantemente. Por tanto, la presencia de Hsp70 sobre la superficie de células cancerosas podría ser una consecuencia "desafortunada" de dos acontecimientos que promueven la progresión tumoral; la secreción de catepsinas, que promueve la invasión y la angiogénesis, y la localización de Hsp70 sobre las membranas lisosómicas, que evita la liberación accidental de cisteína catepsinas en el citosol y la subsiguiente muerte celular.

#### Hsp70 extracelular

Como es evidente en los párrafos anteriores, las funciones intracelulares de Hsp70 son esenciales para la apropiada homeostasis celular, entre otras cosas, en cuanto a problemas nocivos. Sin embargo, también están surgiendo funciones interesantes para la Hsp70 extracelular (eHsp70), en especial cuando se trata de respuestas inmunitarias e inflamatorias, que de nuevo podrían tener papeles importantes para la eliminación de células cancerosas. Además, la implicación en una adaptación fisiológica general al estrés y la protección frente al daño celular también son temas

emergentes para la eHsp70.

#### *Hsp70 extracelular y neuroprotección*

Las primeras pruebas para determinar la presencia de eHsp70 llegaron a partir de estudios en el axón gigante del calamar, en los que se demostró que la elevación de temperatura indujo un conjunto de proteínas de choque térmico en la vaina glial que rodea el axón que se transfieren al axón. Estos hallazgos se reprodujeron pronto en células de embrión de rata cultivadas, y de forma importante, ya en este punto, se presentaron pruebas de una ruta no clásica de exocitosis que es responsable de la liberación de Hsp70 ya que ni monensina ni colchicina, ambas inhibidores de la ruta secretora clásica, pudieron bloquear la secreción de Hsp70. Desde estas publicaciones, otros informes han proporcionado ejemplos de liberación de Hsp por glía y la incorporación por neuronas en diversos sistemas de modelo animal, tales como ranas, cangrejo de río y ratas. Se proporcionó un soporte de un papel para células de glía como fuentes de eHsp70 en seres humanos en un estudio de células de glioblastoma humanas cultivadas. Este estudio demostró que bajo condiciones controladas, las células liberaron ~ 10 pg de Hsp70 por millón de células al medio en un periodo de tiempo de 24 h. Esta liberación se incrementó 2,5-5 veces cuando se aplicó un choque térmico de 20 min en el comienzo del periodo de tiempo. De forma importante, este estudio también demostró que la liberación de eHsp70 fue mayor de lo que se podría explicar por la muerte celular. Todos estos datos respaldan la hipótesis sugerida originalmente, establecida por Tytell *et al.*, de que la liberación glial de las Hsp puede ser una forma de respaldar la función neuronal durante el estrés metabólico.

Las pruebas *in vivo* para eHsp70 que tienen un papel neuroprotector durante el estrés agudo provienen de varios estudios. Un estudio de Tidwell *et al.* constató que eHsp70 puede reducir la cantidad de muerte celular de neuronas motoras post-axotomía, cuando se aplicó eHsp70 por medio de una esponja de gel después de una axotomía. En el mismo estudio, el incremento en la supervivencia de células de neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal también se observó tras la administración de Hsp70, aunque esto dependía ligeramente de dosis más altas de Hsp70 que en las neuronas motoras. Además, se ha demostrado que eHsp70 protege las neuronas motoras destinadas por lo demás a morir durante el desarrollo de los embriones de pollo, y también a proteger neuronas motoras aisladas de las médulas espinales de pollo tras la privación del factor trófico. También se ha descrito un papel protector *in vivo* para eHsp70 cuando se trata de daño de la retina provocado por la luz. En este estudio, Yu *et al.*, inyectaron por vía intravítrea una solución de Hsp70 recombinante y Hsc70 después de exposición a luz inductora de daño a una dosis que previamente había descrito que provocaba degeneración de fotorreceptores extensa. De forma interesante, la presencia de la mezcla de eHsp70 en la cámara vítrea del ojo derecho dio como resultado que sobrevivían significativamente más fotorreceptores en la retina. Además, la evaluación de la incorporación de Hsc/Hsp70 marcado con fluoresceína demostró que estaba presente en la retina 6 h después de la administración. También se ha demostrado que la Hsp70 extracelular administrada por medio de tratamiento intranasal previene las consecuencias de estrés inevitable en ratas y recientemente se describió que la Hsp70 humana recombinante inyectada por vía intraperitoneal fue eficaz para incrementar el ciclo de vida, retrasar la presentación de síntomas, preservar la función motora y prolongar la supervivencia de neuronas motoras en un modelo de ratón de esclerosis lateral amiotrófica. Un trabajo *in vitro* adicional usando Hsp70 o la mezcla Hsc/Hsp70 en sistemas neuronales ha demostrado además que eHsp70 puede potenciar la tolerancia al estrés de células neuronales y reducir la toxicidad de poliglutamina y la agregación.

#### *Hsp70 extracelular e inmunidad*

Además de los papeles en la citoprotección, se ha documentado que la eHsp70 tanto asociada a membrana plasmática como sistémica libre desempeña papeles en la inmunidad. Considerando que una de las principales funciones de Hsp70 es acompañar a proteínas intracelulares, tal vez no es sorprendente que pueda estar implicada en la unión de péptidos inmunogénicos y que pueda ayudar en la presentación de éstos por moléculas de clase 1 del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Además, se ha demostrado que la eHsp70 derivada de tumor acompaña a péptidos inmunogénicos y se une selectivamente a células presentadoras de antígenos (APC). Tras la endocitosis mediada por receptor, estos complejos Hsp70-péptido se presentan después en moléculas de clase 1 de MHC que conducen a una respuesta de linfocitos T citotóxicos. Además del acompañamiento de autoantígenos, Hsp70 también puede unir péptidos microbianos y motivos de CpG no metilados en ADN bacteriano.

Además de su papel como una chaperona presentadora de antígeno, eHsp70 también se ha implicado en la estimulación de la inmunidad innata. Mientras que se ha demostrado que muchos tipos celulares liberan Hsp70, también se ha demostrado que eHsp70 se une a una serie de receptores de diferentes subpoblaciones de leucocitos incluyendo linfocitos citotóxicos naturales (NK), macrófagos, monocitos y células dendríticas. Los receptores implicados en el reconocimiento de eHsp70 incluyen principalmente receptores de reconocimiento de patrón (PRR) y consisten en varios receptores de diferentes familias de receptores, tales como los receptores tipo Toll (TLR), receptores secuestrantes y lectinas de tipo c. Después de la unión al receptor, eHsp70 puede obtener una respuesta de citoquinas amplia incluyendo la liberación de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6 y GM-CSF, un proceso desencadenado por translocación de NF- $\kappa$ B en el núcleo, lo que sugiere una acción de citoquina de eHsp70, lo que también ha llevado a la sugerencia de acuñar el término chaperocina para eHsp70 para describir mejor las funciones únicas de eHsp70 tanto como una chaperona y como una citoquina.

Gran parte del trabajo *in vivo* sobre un papel de eHsp70 en la inmunidad frente se ha llevado a cabo en modelos de



roedores. Por ejemplo, los incrementos en la concentración de eHsp70 en respuesta al choque en la cola se asociaron con una reducción en la inflamación y tiempos de recuperación más rápidos después una inyección de *E. Coli* subcutánea. Además, la administración *in vivo* de Hsp70 en ratones aceleró el cierre de la herida, una característica que probablemente se debe a la fagocitosis de macrófagos potenciada de residuos de heridas.

- 5 Se carece de pruebas para los papeles inmunomoduladores de Hsp70 en seres humanos, pero los estudios han demostrado relaciones entre el incremento de eHsp70 y la mejora del pronóstico/resultado para traumatismo cerebral, aunque también se ha demostrado lo contrario. Sin embargo, también se sabe que las concentraciones de eHsp70 decaen con una edad avanzada, lo que puede ser indicativo de una capacidad reducida relacionada con la edad de preparar una respuesta al estrés completa, lo que de nuevo podría explicar el incremento en la morbilidad y mortalidad observada con el envejecimiento, aunque esto sigue siendo puramente especulativo.

#### Liberación de Hsp70

- 15 Aparte de los datos que demuestran la transferencia de eHsp70 entre células vecinas, tales como en el modelo glía/axón, varios informes han documentado la presencia de eHsp70 libre en la circulación. Para la Hsp70 presente en este compartimento, se ha de liberar necesariamente de un órgano/célula. Normalmente se consideran dos formas principales para lograr esto. Una es una forma pasiva en la que la observación de eHsp70 en la circulación periférica es la consecuencia de la liberación de una reserva intracelular de Hsp70 debido a lisis o muerte celular. De forma alternativa, o tal vez adicionalmente, Hsp70 se libera activamente por medio de una ruta exocitótica no clásica.

- 20 Se ha sugerido que Hsp70 junto con otras proteínas de choque térmico solo se liberan bajo circunstancias patológicas dando como resultado la muerte necrótica y no durante la muerte celular programada. Sin duda, un traumatismo grave y afecciones patológicas que dan como resultado necrosis pueden dar lugar a la liberación de Hsp70 en el torrente circulatorio. Esto se ha documentado bien y también se esperaría lógicamente. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que Hsp70 se puede liberar de células intactas por mecanismos activos y que el grado de estímulo determina el modo de liberación. También surgen pruebas convincentes de la liberación no necrótica de Hsp70 de estudios sobre la liberación inducida por ejercicio de eHsp70 al torrente sanguíneo periférico. Dependiendo del modo de ejercicio (cuanto más esfuerzo físico, mayor liberación) se pueden detectar incrementos más importantes de eHsp70 en el torrente sanguíneo periférico, y de forma importante, ningún estudio conocido ha notificado una correlación directa entre eHsp70 y los marcadores de daño muscular. Además, se ha demostrado elegantemente que la eHsp70 se puede liberar independientemente del daño celular o tisular por Fleshner y sus compañeros de trabajo que han demostrado que el estrés psicológico, tal como el miedo a los depredadores y choque eléctrico pueden provocar una liberación de eHsp70 inducida por estrés, un proceso que se sugirió que era dependiente de la señalización de catecolamina.

- 35 La forma en la que Hsp70 deja la célula aún no está clara aunque, entre otras cosas, porque Hsp70 no contiene ninguna secuencia líder de péptidos clásica, que podría marcarla para secreción. Además, como la secreción clásica ya estaba cuestionada anteriormente, esto sugiere que deben existir mecanismos alternativos para la liberación de eHsp70. Se ha demostrado que se puede liberar eHsp70 en vesículas caracterizadas como exosomas, pero también se han presentado pruebas de que se puede liberar eHsp70 como eHsp70 libre, tanto en los sistemas celulares como *in vivo*. Se ha sugerido que se necesitan balsas lipídicas para la liberación de eHsp70 aunque esto también se ha cuestionado. Además, se ha demostrado que es necesario un compartimento lisosómico funcional para la liberación de eHsp70 y que esta liberación está acompañada por la presencia de proteínas marcadoras lisosómicas sobre la superficie de las células, lo que sugiere una secreción dependiente de la fusión de membrana plasmática y lisosómica. Independientemente de si la liberación es por medio de exosomas o por medio de la liberación directa desde los lisosomas, es interesante observar que aparentemente está implicado algún tipo de compartimento MVB secretor/endosómico tardío/lisosómico en todos los modos de liberación.

- 45 Ya que las catecolaminas por medio del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico pueden conducir a flujos de calcio intracelular, y puesto que se ha sugerido que esos flujos de calcio provocan la exocitosis de los exosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas, una hipótesis actual es la de que bajo momentos de estrés, los incrementos en noradrenalina que actúa sobre los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos da como resultado un flujo de calcio dentro de la célula y una liberación subsiguiente de Hsp70 dentro de los exosomas.

#### 50 Agente bioactivo de acuerdo con la presente invención

La presente invención se refiere, en una realización, a la modulación de la actividad enzimática, en la que dicha enzima interacciona con BMP, por el uso de un agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70.

- 55 La modulación de la actividad enzimática se puede obtener proporcionando una de las siguientes clases de compuestos y tratamientos, que incrementa la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70:

- Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma,
- Inductores y coinductores de Hsp70, tales como

- Fármacos de moléculas pequeñas, tales como Bimocloamol y Arimocloamol
  - Fluidificantes de membrana, tales como alcohol bencílico
  - Tratamiento térmico subletal ( $\leq 42$  °C) o hipertermia
  - Determinados fármacos del grupo de fármacos antiinflamatorios y antineoplásicos
- 5   ▪ Estrés celular
- Especies de oxígeno reactivas (ROS)
  - Adrenalina, noradrenalina
  - luz UV
  - Tratamiento de radiación
- 10   También se divulga cualquier agente, producto químico o compuesto que incrementa la concentración intracelular y/o la actividad de la Hsp70; e incluye la misma Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y cualquier inductor o coinductor de Hsp70 conocido por el experto en la técnica, en el que dicho agente bioactivo puede modular la actividad de una enzima que interacciona con BMP.
- Se deduce que un agente bioactivo puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70.
- 15   En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un inductor o coinductor de Hsp70.
- En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención comprende una combinación de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y un inductor o coinductor de Hsp70.
- Es un aspecto de la presente invención proporcionar un agente bioactivo que pueda incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70, para su uso como un medicamento.
- 20   Es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar un agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70, para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.
- Es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar un agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70, para su uso como un medicamento o para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.
- 25   En una realización, dicho tratamiento puede ser profiláctico, curativo o de mejora. En una realización particular, dicho tratamiento es profiláctico. En otra realización, dicho tratamiento es curativo. En otra realización, dicho tratamiento es de mejora.
- 30   En una realización, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Farber, la enfermedad Krabbe, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.
- En una realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A o B. En otra realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad Farber. En otra realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Krabbe. En otra
- 35   realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es leucodistrofia metacromática. En otra realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la sialidosis. En otra realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Fabry. En otra realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Gaucher. En otra realización particular, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la deficiencia de saposina.
- 40   También es un aspecto de la presente invención proporcionar un agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70, para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es uno, tal como dos, por ejemplo tres, tal como cuatro, por ejemplo cinco, tal como seis, por ejemplo siete trastornos seleccionados del grupo que consiste en la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Farber, la enfermedad de Krabbe, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.
- 45   Se deduce que el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se puede usar para el tratamiento de un subconjunto de los trastornos de almacenamiento lisosómico seleccionados del grupo que consiste en la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Farber, la enfermedad de Krabbe, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.

En una realización particular, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se puede usar para el tratamiento de la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A y B y la enfermedad de Farber.

También se divulga una combinación de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y una sustancia que incrementa la interacción entre Hsp70 y BMP.

- 5 Es otro aspecto adicional de la presente invención proporcionar el uso de un agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.

Agente bioactivo - Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma

- 10 También se divulga la modulación de la actividad enzimática, en la que dicha enzima interacciona con BMP, por el uso de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma.

También se divulga Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, para su uso como medicamento.

También se divulga Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

- 15 También se divulga Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

Dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se puede seleccionar del grupo que consiste en la enfermedad de Niemann-Pick, la enfermedad de Farber, la enfermedad Krabbe, la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.

- 20 Se entiende que Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, puede ser cualquier producto natural o sintético, y se pueden producir por cualquier técnica convencional conocida por el experto en la técnica.

La Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, se puede purificar a partir de una fuente natural. Dicha fuente natural puede ser cualquier planta, animal o bacteria que exprese, o que puede inducirse para expresar, Hsp70 de una forma adecuada para administrar a un individuo que lo necesita.

- 25 La Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, se puede fabricar sintéticamente. Por lo tanto, se deduce que Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, puede ser una proteína recombinante fabricada por técnicas convencionales, y como tal se denota como rHsp70.

- 30 La Hsp70 sintética o natural, puede tener una secuencia que se deriva de cualquier especie adecuada de planta, animal o bacteria. La rHsp70 se puede derivar de un mamífero. Dicho mamífero se puede seleccionar del grupo que consiste en ser humano (*homo sapiens*), ratón (*mus musculus*), vaca, perro, rata, hurón, cerdo, oveja y mono. La rHsp70 se puede derivar de bacterias.

La Hsp70 se caracteriza en parte por tener un grado muy alto de conservación de secuencia entre especies, permitiendo así posiblemente que la Hsp70 derivada de una especie se use en otra especie sin provocar una respuesta inmunitaria nociva.

También se divulga rHsp70 que tiene una secuencia derivada de la Hsp70 humana.

- 35 También se divulga rHsp70 que tiene una secuencia derivada de más de una especie. Dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, puede ser, por tanto, en una realización, una quimera.

- 40 Una proteína recombinante es una proteína que se deriva de ADN recombinante. El ADN recombinante es una forma de ADN que no existe de forma natural, que se crea por la combinación de secuencias de ADN que normalmente no se producen juntas. En términos de modificación genética, el ADN recombinante se introduce a través de la adición de ADN relevante en un ADN de organismo existente, tal como los plásmidos de bacterias, para codificar rasgos diferentes para un fin específico. Difiere de la recombinación genética, porque no se produce a través de procesos dentro de la célula, sino que se manipula por el hombre.

- 45 También se divulga Hsp70 que tiene una homología del 100 % con respecto a la proteína Hsp70 natural o una homología de menos del 100 % con respecto a la proteína Hsp70 salvaje, tal como una homología de entre el 99,9 y el 95 %, por ejemplo, una homología del 95 al 90 %, tal como una homología del 90 al 85 %, por ejemplo, una homología del 85 al 80 %, tal como una homología del 80 al 75 %, por ejemplo, una homología del 75 al 60 % con respecto a la proteína salvaje. Independientemente del grado de homología, se divulga cualquier variante de Hsp70 que conserva su capacidad para modular la actividad enzimática de una enzima que se une a BMP.

También se divulga Hsp70, tal como Hsp70 de longitud completa.

- 50 También se divulga un fragmento o variante funcional de Hsp70. Como se define en el presente documento, un

fragmento o variante funcional es cualquier fragmento de Hsp70 que tiene la función deseada, que es una capacidad para modular la actividad enzimática de una enzima, en la que dicha enzima interacciona con BMP.

También se divulga un fragmento o variante funcional de Hsp70.

- 5 También se divulga un fragmento o variante funcional de Hsp70, en el que Hsp70 se modifica por delección/delecciones, adición/adiciones o sustitución/sustituciones de la Hsp70 natural.

La proteína Hsp70 salvaje tiene una longitud total de 641 aminoácidos. Un fragmento de Hsp70 comprende cualquier fragmento con una longitud total menor que la proteína salvaje de 641 aminoácidos, tal como menor de 625 aminoácidos, por ejemplo menor de 600 aminoácidos, tal como menor de 575 aminoácidos, por ejemplo menor de 550 aminoácidos, tal como menor de 525 aminoácidos, por ejemplo, menor de 500 aminoácidos, tal como menor de 475 aminoácidos, por ejemplo, menor de 450 aminoácidos, tal como menor de 425 aminoácidos, por ejemplo, menor de 400 aminoácidos, tal como menor de 375 aminoácidos, por ejemplo, menor de 350 aminoácidos, tal como menor de 325 aminoácidos, por ejemplo, menor de 300 aminoácidos, tal como menor de 275 aminoácidos, por ejemplo, menor de 250 aminoácidos, tal como menor de 225 aminoácidos, por ejemplo, menor de 200 aminoácidos, tal como menor de 175 aminoácidos, por ejemplo, menor de 150 aminoácidos, tal como menor de 125 aminoácidos, por ejemplo, menor de 100 aminoácidos, tal como menor de 75 aminoácidos, por ejemplo, menor de 50 aminoácidos, tal como menor de 25 aminoácidos.

La proteína Hsp70 salvaje tiene una longitud total de 641 aminoácidos. Un fragmento de Hsp70, en una realización, pretende comprender cualquier fragmento con una longitud total mayor que la proteína salvaje de 10 aminoácidos, tal como mayor de 25 aminoácidos, por ejemplo mayor de 50 aminoácidos, tal como mayor de 75 aminoácidos, por ejemplo mayor de 100 aminoácidos, tal como mayor de 125 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 150 aminoácidos, tal como mayor de 175 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 200 aminoácidos, tal como mayor de 225 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 250 aminoácidos, tal como mayor de 275 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 300 aminoácidos, tal como mayor de 325 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 350 aminoácidos, tal como mayor de 375 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 400 aminoácidos, tal como mayor de 425 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 450 aminoácidos, tal como mayor de 475 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 500 aminoácidos, tal como mayor de 525 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 550 aminoácidos, tal como mayor de 575 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 600 aminoácidos, tal como mayor de 625 aminoácidos.

Se deduce que la longitud total del fragmento de Hsp70 puede estar dentro del intervalo de 5 a 25 aminoácidos, tal como de 25 a 50 aminoácidos, por ejemplo, de 50 a 75 aminoácidos, tal como de 75 a 100 aminoácidos, por ejemplo, de 100 a 125 aminoácidos, tal como de 125 a 150 aminoácidos, por ejemplo, de 150 a 175 aminoácidos, tal como de 175 a 200 aminoácidos, por ejemplo, de 200 a 225 aminoácidos, tal como de 225 a 250 aminoácidos, por ejemplo, de 250 a 275 aminoácidos, tal como de 275 a 300 aminoácidos, por ejemplo, de 300 a 325 aminoácidos, tal como de 325 a 350 aminoácidos, por ejemplo, de 350 a 375 aminoácidos, tal como de 375 a 400 aminoácidos, por ejemplo, de 400 a 425 aminoácidos, tal como de 425 a 450 aminoácidos, por ejemplo, de 450 a 475 aminoácidos, tal como de 475 a 500 aminoácidos, por ejemplo, de 500 a 525 aminoácidos, tal como de 550 a 525 aminoácidos, por ejemplo, de 550 a 575 aminoácidos, tal como de 575 a 600 aminoácidos, por ejemplo, de 600 a 625 aminoácidos, tal como de 625 a 640 aminoácidos.

El fragmento o variante de Hsp70 puede comprender todo o parte del dominio ATPasa de Hsp70. Se deduce que el fragmento o variante de Hsp70 puede comprender todos o parte de los aminoácidos número de 30 a 382.

- 40 El fragmento o variante de Hsp70 puede comprender triptófano en la posición aminoacídica 90 del dominio ATPasa de Hsp70.

Un fragmento de Hsp70 puede ser una versión truncada de la proteína salvaje, lo que significa que es una versión más corta. Un fragmento puede estar truncado por el acortamiento de la proteína desde el extremo amino terminal o bien desde el extremo carboxi terminal de la proteína, o puede estar truncado por delección de una o más regiones internas de cualquier tamaño de la proteína.

Un fragmento o variante de Hsp70 puede tener una homología del 100 % con respecto a la proteína salvaje. El fragmento o variante de Hsp70 también puede ser una variante de Hsp70 que tenga una homología menor del 100 % con respecto a la proteína salvaje, tal como una homología de entre el 99,9 y el 95 %, por ejemplo una homología del 95 al 90 %, tal como una homología del 90 al 85 %, por ejemplo, una homología del 85 al 80 %, tal como una homología del 80 al 75 %, por ejemplo, una homología del 75 al 60 % con respecto a la proteína salvaje.

Debe entenderse que se divulga cualquier fragmento o variante de Hsp70 que conserve su capacidad para modular la actividad enzimática lisosómica.

Debe entenderse que se divulga cualquier fragmento o variante de Hsp70 que conserve su capacidad para interaccionar con BMP.

- 55 Se aprecia que el efecto cuantitativo exacto del fragmento o variante funcional puede ser diferente del efecto de la molécula de longitud completa. En algunos casos, el fragmento o variante funcional, de hecho, puede ser más eficaz

que la molécula de longitud completa. Además, el uso divulgado de fragmentos en lugar de moléculas de longitud completa puede ser ventajoso en vista del menor tamaño de los fragmentos.

Un fragmento o variante funcional de Hsp70 puede ser una variante de Hsp70 en la que se ha sustituido uno o más aminoácidos. Dicha(s) sustitución/sustituciones puede(n) ser una sustitución/sustituciones equivalente(s) o conservadora(s), o una sustitución/sustituciones no equivalente(s) o no conservadora(s).

Se pueden sustituir entre el 0,1 y el 1 % de los residuos de aminoácidos de Hsp70 natural, tal como entre el 1 y el 2 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre el 2 y el 3 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 3 y el 4 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre el 4 y el 5 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 5 y el 10 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre el 10 y el 15 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 15 y el 20 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre el 20 y el 30 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 30 y el 40 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo de entre el 40 y el 50 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 50 y el 60 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre el 60 y el 70 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 70 y el 80 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo entre el 80 y el 90 % de residuos de aminoácidos, tal como entre el 90 y el 100 % de residuos de aminoácidos.

Se pueden sustituir entre 1 y 5 de los residuos de aminoácidos de Hsp70 natural, tal como entre 5 y 10 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 10 y 15 residuos de aminoácidos, tal como entre 15 y 20 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 20 y 30 residuos de aminoácidos, tal como entre 30 y 40 residuos de aminoácidos, por ejemplo entre 40 y 50 residuos de aminoácidos, tal como entre 50 y 75 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 75 y 100 residuos de aminoácidos, tal como entre 100 y 150 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 150 y 200 residuos de aminoácidos, tal como entre 200 y 300 residuos de aminoácidos, por ejemplo, entre 300 y 400 residuos de aminoácidos, tales como entre 400 y 500 residuos de aminoácidos.

También se divulga un fragmento o variante funcional de Hsp70 que es una proteína de fusión. Dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 se puede fusionar con una etiqueta.

#### *Ventajas del uso de Hsp70*

Como se analiza en el presente documento anteriormente, no hay curas para las enfermedades de almacenamiento lisosómico y el tratamiento es en su mayor parte sintomático, a excepción del desarrollo de tratamientos de restitución de enzimas (ERT) para la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry. Como se ha mencionado, el ERT es una forma muy cara de tratamiento que es eficaz solo para una enfermedad específica.

Según el conocimiento de los inventores, hasta la fecha no se ha tratado con éxito de proporcionar ERT para las restantes enfermedades de almacenamiento lisosómico asociadas con acumulación de lípidos, por lo tanto sigue existiendo hoy una gran necesidad no cubierta de un tratamiento eficaz y específico de estas LSD.

La Hsp70, inductores y coinductores de la presente invención se pueden usar para el tratamiento de más de un trastorno de almacenamiento lisosómico específico. De hecho, el agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70 se puede usar para el tratamiento de cualquier enfermedad de almacenamiento lisosómico que se puede revertir modulando la actividad enzimática de la enzima defectuosa implicada, en el que dicha enzima interacciona con BMP.

#### *Expresión ectópica de Hsp70*

También se divulga un vector que codifica Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma.

La Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, se puede administrar a un individuo que lo necesite en forma de un vector.

El vector usado para la expresión de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, se puede seleccionar del grupo que consiste en: vectores víricos (retrovírico y adenovírico) o vectores no víricos (plásmido, cósmido, bacteriófago).

Dicho vector puede comprender uno o más de un origen de replicación, un marcador para selección y uno o más sitios de reconocimiento para una endonucleasa de restricción. Dicho vector puede estar unido operativamente a secuencias reguladoras que controlan la transcripción de dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, en una célula huésped adecuada.

También se divulga un procedimiento para producir Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, como se describe en el presente documento; comprendiendo dicho procedimiento las etapas de proporcionar un vector que codifica dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y expresar dicho vector *in vitro* o bien *in vivo* en un organismo huésped adecuado, produciendo de este modo dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma.

También se divulga una célula huésped recombinante o transgénica aislada que comprende un vector que codifica Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma.

También se divulga un procedimiento para generar una célula huésped recombinante o transgénica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de proporcionar un vector que codifica Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, introducir dicho vector en dicha célula huésped recombinante o transgénica y opcionalmente además expresar dicho vector en dicha célula huésped recombinante o transgénica, generando de este modo una célula huésped recombinante o transgénica que produce dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma.

También se divulga un organismo transgénico, mamífero que comprende la célula huésped descrita anteriormente.

El organismo transgénico, mamífero que comprende la célula huésped recombinante o transgénica puede ser no humano.

La célula huésped transgénica se puede seleccionar del grupo que consiste en una célula huésped de mamífero, planta, bacteria, levadura o de hongo.

Para mejorar la administración del ADN en la célula, el ADN debe protegerse de daños y se debe facilitar su entrada en la célula. Se han creado lipoplexos y poliplexos que tienen la capacidad de proteger el ADN de una degradación indeseable durante el procedimiento de transfección. El ADN plasmídico se puede cubrir con lípidos en una estructura organizada como una micela o un liposoma. Cuando la estructura organizada se compleja con ADN se denomina lipoplexo. Hay tres tipos de lípidos que pueden emplearse para formar liposomas; aniónicos (cargados negativamente), neutros o catiónicos (cargados positivamente). Los complejos de polímeros con ADN se denominan poliplexos. La mayoría de los poliplexos consisten en polímeros catiónicos y su producción está regulada por interacciones iónicas.

También se divulga un vector que comprende Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, se puede usar para tratamiento génico. El tratamiento génico es la inserción de genes dentro de células y tejidos de un individuo para tratar una enfermedad, tal como una enfermedad hereditaria en la que un alelo mutante deletéreo se reemplaza con uno funcional.

También se divulga Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, administrado como ADN desnudo. Esta es la forma más simple de transfección no vírica. La administración de ADN desnudo se puede realizar por el uso de electroporación, sonoporación, o por el uso de una "pistola génica", que dispara partículas de oro recubiertas de ADN en una célula usando gas de alta presión.

#### Agente bioactivo - inductores y coinductores de Hsp70

La presente invención se refiere, en una realización, a la modulación de la actividad enzimática, en la que dicha enzima interacciona con BMP, por el uso de inductores o coinductores de Hsp70.

Un inductor de Hsp70 es un compuesto que puede amplificar por sí mismo la expresión génica y expresión proteica de Hsp70 sin estrés concomitante.

Un coinductor de Hsp70 es un compuesto que no puede amplificar la expresión génica ni la expresión proteica de Hsp70 sin estrés concomitante (leve), pero el incremento inducido por estrés en niveles de Hsp70 se eleva o potencia adicionalmente por su presencia.

También se divulga un inductor o coinductor de Hsp70 para su uso como un medicamento.

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un inductor o coinductor de Hsp70 para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

Es todavía un aspecto de la presente invención proporcionar el uso de un inductor o coinductor de Hsp70, para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico.

En una realización, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.

En una realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A o B. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Farber. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Krabbe. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es leucodistrofia metacromática. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es sialidosis. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Fabry. En todavía otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Gaucher. En todavía otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es deficiencia de saposina.

En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un inductor o coinductor de Hsp70. En una realización particular, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un inductor de Hsp70. En otra realización particular, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un coinductor de Hsp70.

*Fármacos de moléculas pequeñas - derivados de hidroxilamina*

En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un coinductor de Hsp70. En una realización, dicho coinductor de Hsp70 es un fármaco de moléculas pequeñas.

- 5 En una realización particular, el coinductor de Hsp70 de acuerdo con la presente invención es un derivado de hidroxilamina. Dicho derivado de hidroxilamina se puede seleccionar, en otra realización, del grupo de Bimoclomol (BRLP-42), Arimoclomol (BRX-220), BRX-345 y BGP-15.

En una realización particular, dicho derivado de hidroxilamina es Arimoclomol (BRX-220).

- 10 Bimoclomol ([2-hidroxi-3-(1-piperidinil)propoxi]-3-piridin-carboximidoil-cloruro maleato) es un compuesto no tóxico que se desarrolló originalmente para el tratamiento de complicaciones relacionadas con la diabetes tales como neuropatías. Se ha demostrado que Bimoclomol mejora la supervivencia celular en condiciones de estrés experimentales en parte incrementando las proteínas de choque térmico intracelulares (HSP), incluyendo Hsp70, por medio de una activación de HSF-1. Se ha demostrado que bimoclomol posee la capacidad de coinducción de Hsp70 en ausencia de proteínas no plegadas, y que bimoclomol interacciona con e incrementa la fluidez de los lípidos de membrana cargados negativamente. BRX-345 es un análogo estructural de bimoclomol con menor capacidad para inducir HSP.

Arimoclomol (BRX-220) es un análogo de bimoclomol, que también interacciona con y amplifica la respuesta de choque térmico. Arimoclomol está actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la ALS (esclerosis lateral amiotrófica); un trastorno neurodegenerativo progresivo. Arimoclomol es propiedad de CytRx Corporation.

- 20 Es por tanto un aspecto de la presente invención proporcionar un derivado de hidroxilamina coinductor de Hsp70 para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

Es todavía un aspecto de la presente invención proporcionar el uso de un derivado de hidroxilamina coinductor de Hsp70 para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico.

- 25 En una realización, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.

*Fluidificantes de membrana*

En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un inductor de Hsp70. También se divulga un inductor de Hsp70 que es un fluidificante de membrana.

El tratamiento con un fluidificante de membrana también se puede denominar tratamiento de lípidos.

- 30 También se divulga un inductor de Hsp70 que es un fluidificante de membrana seleccionado del grupo que consiste en alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por el experto en la técnica.

- 35 Además de la desnaturalización de una proporción de proteínas celulares durante el calentamiento (proteotoxicidad), también se propone un cambio en la fluidez de las membranas como un termosensor celular que inicia la respuesta de choque térmico e induce las HSP. De hecho, las perturbaciones de membrana inducidas químicamente (análogas con la fluidización de membrana plasmática inducida por calor) pueden activar la HSP, sin provocar la desnaturalización de la proteína.

- 40 La fluidez de membrana se refiere a la viscosidad de la bicapa lipídica de una membrana celular. Los fosfolípidos de membrana incorporan ácidos grasos de longitud y saturación variables.

Los fluidificantes de membrana actúan intercalándose entre los lípidos de membrana induciendo así un efecto de desorden que debilita las interacciones de van der Waals entre las cadenas acilo de lípidos.

- 45 También se divulga un fluidificante de membrana se selecciona del grupo de alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por el experto, en la técnica para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

- 50 También se divulga el uso de un fluidificante de membrana que se selecciona del grupo de alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol y anestésicos tales como lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína, así como otros conocidos por el experto, en la técnica para la fabricación de un medicamento para tratar trastornos de almacenamiento lisosómico.

Dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se puede seleccionar del grupo que consiste en enfermedad de

Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.

#### *Otros medios para inducir Hsp70*

Se divulga cualquier medio para inducir la expresión de Hsp70, algunos de los cuales se resumen más adelante.

- 5 Incrementar la temperatura de un individuo es un potente inductor de las HSP que incluye Hsp70, y como tal, se divulga el tratamiento térmico subletal. El tratamiento término subletal puede comprender incrementar la temperatura de un individuo hasta una temperatura de núcleo de aproximadamente 38 °C, tal como aproximadamente 39 °C, por ejemplo, aproximadamente 40 °C, tal como aproximadamente 41 °C, por ejemplo, aproximadamente 42 °C, tal como aproximadamente 43 °C.

- 10 También se divulga un tratamiento térmico subletal para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.

El estrés psicológico, tal como el miedo a los depredadores y el choque eléctrico pueden provocar una liberación de eHsp70 inducida por estrés, un proceso que se sugiere que es dependiente de la señalización de catecolamina. Además, la adrenalina y la noradrenalina pueden provocar la liberación de Hsp70.

- 15 Se ha demostrado que los siguientes compuestos inducen (o coinducen) las HSP, incluyendo Hsp70: el compuesto interactivo de membrana alquilisofosfolípido Edelfosina (ET-18-ECH3 o 1-octadecil-2-metil-rac-glicero-3-fosfocolina); fármacos antiinflamatorios incluyendo inhibidores de ciclooxigenasa 1/2 tales como celecoxib y rofecoxib, así como AINE, tales como ácido acetilsalicílico, salicilato de sodio e indometacina; prostaglandinas PGA1, PGj2 y 2-ciclopenten-1-ona; agonistas de receptor gamma activados por proliferadores de peroxidasa; agentes anticancerosos que interaccionan con tubulina incluyendo vincristina y paclitaxel; el sensibilizador de insulina pioglitazona; agentes antineoplásicos tales como carboplatino, doxorubicina, fludarabina, ifosfamida y citarabina; los inhibidores de HSP90 geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, radicicol, herbimicina-A y ácido araquidónico; inhibidores de proteasomas MG132 y lactacistina; inhibidores de la proteasa serina DCIC, TLCK y TPCK; los fármacos antiulcerosos geranilgeranilacetona (GGA), rebamipida, carbenoxolona y polaprezinc (L-carnosina de zinc); metales pesados (zinc y estaño); el fármaco antiinflamatorio dexametasona; cocaína; nicotina; alcohol; agonistas alfa-adrenérgicos; prostanoides de ciclopentenona; así como fitoterapias con paeoniflorina, glicirricina, celastrol, dihidrocelastrol, diacetato de dihidrocelastrol y curcumina.
- 20
- 25

- También se divulga un compuesto seleccionado del grupo de Edelfosina (ET-18-OCH3 o 1-octadecil-2-metil-rac-glicero-3-fosfocolina), celecoxib, rofecoxib, ácido acetilsalicílico, salicilato de sodio, indometacina, PGA1, PGj2, 2-ciclopenten-1-ona, agonistas de receptor gamma activado por proliferadores de peroxidasa, vincristina, paclitaxel, pioglitazona, carboplatino, doxorubicina, fludarabina, ifosfamida citarabina, geldanamicina, 17AAG, 17-DMAG, radicicol, herbimicina-A, ácido araquidónico, MG132, lactacistina, DCIC, TLCK, TPCK, geranilgeranilacetona (GGA), rebamipida, carbenoxolona, polaprezinc (L-carnosina de zinc), dexametasona, cocaína, nicotina, alcohol, agonistas alfa-adrenérgicos, prostanoides de ciclopentenona, paeoniflorina, glicirricina, celastrol, dihidrocelastrol, diacetato de dihidrocelastrol y curcumina, así como otros inductores de HSP conocidos por el experto en la técnica, para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico.
- 30
- 35

#### Composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención

- La presente invención se refiere a la modulación de la actividad enzimática, en la que dicha enzima interacciona con BMP, por el uso de un agente bioactivo que puede incrementar la concentración y/o la actividad de Hsp70, beneficiando así a los pacientes que padecen de enfermedades de almacenamiento lisosómico.
- 40

- Si bien es posible que los agentes bioactivos de la presente invención se administren como el producto químico en bruto, se prefiere a presentarlos en forma de una formulación farmacéutica. En consecuencia, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica, para aplicación medicinal, que comprende un agente bioactivo de la presente invención o sus sales farmacéuticamente aceptables, como se define en el presente documento, y por lo tanto, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45

Es un aspecto de la presente invención proporcionar una composición, tal como una composición farmacéutica, que comprende un agente bioactivo identificado en el presente documento que se puede administrar a un individuo que lo necesita.

- En una realización, la invención se refiere a una composición que comprende un agente bioactivo de acuerdo con la presente invención. La composición, como se describe en el presente documento, se puede formular en una realización en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. La composición, como se describe en el presente documento, se puede formular en una realización en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50

- Las composiciones farmacéuticas que contienen un agente bioactivo de la presente invención se pueden preparar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, como se describe en Remington: The Science and Practice of
- 55



Pharmacy 1995, editado por E. W. Martin, Mack Publishing Company, 19ª edición, Easton, Pa.

Los agentes bioactivos de la presente invención se pueden formular para su administración parenteral y se pueden presentar en forma de dosis unitaria en ampollas, jeringuillas precargadas, infusión de volumen pequeño o en recipientes multidosis con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, vehículos, diluyentes o disolventes incluyendo soluciones acuosas de sales minerales u otras moléculas solubles en agua, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, aceites animales, aceites sintéticos, ésteres orgánicos inyectables, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes o de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión, colorantes, tampones, espesantes, agentes solubilizantes y similares. De forma alternativa, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de sólido estéril o por liofilización a partir de solución para su constitución antes de su uso con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los agentes bioactivos, donde se pueden preparar, también están destinadas a estar incluidas en esta invención, ya que son formas hidratadas específicas de una sal. Estas sales serán las que sean aceptables en su aplicación para un uso farmacéutico. Por esto se quiere decir que la sal conservará su actividad biológica del compuesto original y que la sal no tendrá efectos indeseados ni deletéreos en su aplicación y uso en el tratamiento de enfermedades.

Las sales farmacéuticamente aceptables se preparan de una manera estándar. Si el compuesto original es una base, se trata con un exceso de un ácido orgánico o inorgánico en un disolvente adecuado. Si el compuesto original es un ácido, se trata con una base inorgánica u orgánica en un disolvente adecuado.

Se puede emplear cualquier formulación adecuada del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención, conocida por el experto en la técnica.

También se divulga Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, formulada en una microesfera biodegradable, tal como un liposoma.

## Administración

Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada para proporcionar a un mamífero, preferentemente a un ser humano, una cantidad eficaz de un agente bioactivo de acuerdo con la presente invención.

La administración de agentes bioactivos o composiciones farmacéuticas a un individuo que lo necesita se puede producir por medio de tres vías principales de administración: 1) tópica (aplicada en superficies corporales tales como la piel o membranas mucosas), 2) entérica (por medio del tubo gastrointestinal o digestivo) y 3) parenteral (vías diferentes al tubo gastrointestinal o digestivo).

La administración tópica incluye administración epicutánea (aplicación sobre la piel), inhalatoria, enema, colirio (sobre la conjuntiva), gotas óticas, vía intranasal y vaginal.

La administración entérica es cualquier forma de administración que implica cualquier parte del tubo gastrointestinal e incluye administración oral (por la boca, por ejemplo, comprimidos, cápsulas o gotas), intrarrectal (por ejemplo, supositorio o enema) o administración además por tubo de alimentación gástrico o duodenal.

La administración parenteral, tal como por inyección o infusión, es eficaz para administrar el agente bioactivo a un sitio objetivo o para introducir el fármaco en el torrente sanguíneo, e incluye vía intravenosa (en una vena), intraarterial (en una arteria), intramuscular (en un músculo), intracardiaca (en el corazón), subcutánea (bajo la piel), intraósea (en la médula ósea), intradérmica (en la propia piel), intratecal o intraespinal (en el conducto raquídeo), intraperitoneal, (en el peritoneo), transdérmica (difusión a través de la piel intacta), transmucosa (difusión a través de una membrana mucosa, por ejemplo insuflación (aspirando), sublingual, bucal y supositorios vaginales), inhalatoria, epidural (en el espacio epidural) e intravítrea (en el ojo). La administración sublingual (bajo la lengua) también es una forma de administración parenteral, por la que los agentes bioactivos se difunden en el torrente sanguíneo a través del tejido mucosal debajo de la lengua. El agente bioactivo de la presente invención se puede administrar por cualquier vía de administración parenteral y preferentemente cualquiera de las anteriores.

La administración parenteral tiene la ventaja de evitar la degradación en el tubo gastrointestinal, asociado con la administración entérica.

La administración parenteral tiene la ventaja adicional de evitar el metabolismo de primer paso, asociado con la administración entérica, porque permite que los compuestos se absorban directamente en la circulación sistémica.

El metabolismo de primer paso es un fenómeno de metabolismo de fármaco por el que la concentración de un fármaco se reduce en gran medida antes de alcanzar la circulación sistémica. Es la fracción de fármaco perdido durante el proceso de absorción que se relaciona en general con la pared del hígado y del intestino.

Después de que se traga un fármaco, se absorbe por el aparato digestivo y entra en el sistema porta hepático. Se

transporta a través de la vena porta al hígado antes de que alcance el resto del cuerpo. El hígado metaboliza muchos fármacos, a veces hasta tal punto que solo una pequeña cantidad de fármaco activo sale del hígado al resto del sistema circulatorio. Por tanto, este primer paso a través del hígado reduce en gran medida la biodisponibilidad del fármaco.

- 5 Los cuatro sistemas primarios que afectan al efecto de primer paso de un fármaco son las enzimas del lumen gastrointestinal, las enzimas de la pared del intestino, las enzimas bacterianas y las enzimas hepáticas.

Las formas de dosificación apropiadas para tal administración se pueden preparar por técnicas convencionales. Las formas de dosificación apropiadas para administración por inhalación, tales como una formulación en aerosol o un inhalador de dosis medida, se pueden preparar por técnicas convencionales.

- 10 En una realización, un modo de administración particular de un agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es por administración parenteral.

En una realización, un modo de administración parenteral particular de un agente bioactivo de la presente invención es por inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarterial, subcutánea o intraperitoneal.

- 15 En una realización, un modo de administración parenteral particular de un agente bioactivo de la presente invención es por inhalación.

En una realización, un modo de administración parenteral particular de un agente bioactivo de la presente invención es por infusión intravenosa.

- 20 La infusión intravenosa de acuerdo con la presente invención, en una realización, se puede producir durante un periodo de tiempo de desde 10 minutos hasta 20 minutos, tal como de 20 a 30 minutos, por ejemplo, de 30 a 40 minutos, tal como de 40 a 50 minutos, por ejemplo, de 50 a 60 minutos, tal como de 60 a 90 minutos, por ejemplo, de 90 a 120 minutos, tal como de 2 horas a 3 horas, por ejemplo, de 3 a 4 horas, tal como de 4 a 5 horas, por ejemplo, de 5 a 6 horas, tal como de 6 a 7 horas, por ejemplo, de 7 a 8 horas.

- 25 En una realización particular, el modo de administración parenteral de un agente bioactivo de la presente invención es por administración transmucosa. Dicha administración transmucosa es, en una realización, administración sublingual, en otra realización, dicha administración transmucosa es administración bucal, y todavía en otra realización, dicha administración transmucosa es administración por insuflación o intranasal.

Las formas de dosificación incluyen comprimidos, trociscos, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, cremas, pomadas, emulsiones, geles, lociones, pastas, aerosoles u otras formas conocidas en la técnica.

- 30 La dosificación eficaz de ingrediente activo empleado puede variar dependiendo de la composición particular empleada, el modo de administración, la afección que se está tratando y la gravedad de la afección que se está tratando. Esta dosificación se puede establecer fácilmente por un experto en la técnica.

- 35 En una realización, el agente bioactivo de la presente invención se administra en una dosificación diaria de desde aproximadamente 1 microgramo hasta aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de peso corporal animal, dada como una única dosis diaria o en dosis divididas, o en forma de liberación sostenida. El régimen de dosificación se puede ajustar dentro de este intervalo o incluso fuera de este intervalo para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

- 40 En una realización, el agente bioactivo de la presente invención se administra en una dosificación de desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 10 µg por kg de peso corporal, tal como desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 50 µg por kg de peso corporal, por ejemplo desde aproximadamente 50 µg hasta aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal, tal como desde aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 250 µg por kg de peso corporal, por ejemplo desde aproximadamente 250 µg hasta aproximadamente 500 µg por kg de peso corporal, tal como desde aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 750 µg por kg de peso corporal, por ejemplo desde aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 1000 µg por kg de peso corporal, tal como desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 10 mg por kg de peso, por ejemplo desde aproximadamente 10 mg hasta aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal, tal como desde aproximadamente 50 mg hasta aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal.

Dicha dosificación se puede administrar en determinados intervalos de tiempo, y se puede expresar como mg por kg de peso corporal por unidad de tiempo. Dicha unidad de tiempo, en una realización, puede ser por minuto, tal como por hora, por ejemplo por día, tal como por semana.

- 50 Tratamiento de combinación

Es un aspecto de la presente invención proporcionar un agente bioactivo que puede incrementar la concentración intracelular y/o la actividad de Hsp70 para su uso en el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico, en combinación con otras modalidades de tratamiento.

La presente invención, en un aspecto, se refiere a un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con cualquiera de la presente invención en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento.

5 Por tanto, en una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo que lo necesita en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento, tal como modalidades de tratamiento convencionales o conocidas para LSD.

Se entiende que el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención es un inductor o coinductor de Hsp70.

10 La administración de más de una modalidad de tratamiento en combinación se puede producir simultánea o bien secuencialmente. La administración simultánea puede ser dos compuestos comprendidos en la misma composición o comprendidos en composiciones separadas, o puede ser una composición y otra modalidad de tratamiento realizada esencialmente al mismo tiempo. La administración secuencial significa que las más de una modalidades de tratamiento se administran en diferentes puntos de tiempo, tales como administrar una modalidad de tratamiento primero, y administrar la segunda modalidad de tratamiento posteriormente. El marco temporal para administrar más de una modalidad de tratamiento secuencialmente se puede determinar por un experto en la técnica para lograr el efecto óptimo y, en una realización, puede ser entre 30 minutos y 72 horas.

15 Las modalidades de tratamiento en forma de compuestos químicos se pueden administrar conjuntamente o por separado, cada una en su dosificación más eficaz. La administración de más de un compuesto puede tener un efecto sinérgico, reduciendo así de forma eficaz la dosis requerida de cada fármaco.

20 En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo que lo necesita en combinación con tratamiento de reemplazo enzimático (ERT). Dicho ERT, en una realización, se puede seleccionar del grupo que consiste en Cerezyme® (imiglucerasa para inyección), Miglustat, Fabrazyme® (agalsidasa beta) y Replagal (Agalsidasa alfa).

En una realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo con la enfermedad de Gaucher en combinación con Cerezyme® (imiglucerasa para inyección) o Miglustat.

25 En otra realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo con la enfermedad de Fabry en combinación con Fabrazyme® (agalsidasa beta) o Replagal (Agalsidasa alfa).

En otra realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo que lo necesita en combinación con analgésicos.

30 En otra realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo que lo necesita en combinación con corticosteroides.

El agente bioactivo de acuerdo con la presente invención, en una realización, se puede administrar a un individuo que lo necesita en combinación con un trasplante, tal como trasplante de médula ósea, trasplante de sangre del cordón umbilical o trasplante de células madre.

35 El agente bioactivo de acuerdo con la presente invención, en otra realización, se puede administrar a un individuo que lo necesita en combinación con tratamiento de reducción de sustrato.

En otra realización, el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención se administra a un individuo que lo necesita en combinación con tratamiento sintomático y de soporte, tal como fisioterapia.

*La Hsp70 incrementa la incorporación de compuestos*

40 Los inventores de la presente invención han demostrado adicionalmente que Hsp70 incrementa la incorporación endocítica de otras moléculas (figura 16). Este incremento en la incorporación se puede producir independientemente de Hsp70 debido a un mecanismo pasivo que permite que un compuesto se capte más fácilmente por la célula en presencia de Hsp70, o se puede producir dependientemente de Hsp70 debido a una asociación directa con Hsp70.

45 La capacidad de Hsp70 para incrementar la incorporación celular de compuestos es una ventaja porque permite que Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, se administre a células para que se capte fácilmente por la célula.

Además, la capacidad de Hsp70 para incrementar la incorporación celular de compuestos es una ventaja en regímenes de tratamiento de combinación, ya que la presencia de Hsp70 puede incrementar la incorporación tanto de Hsp70 como del compuesto dado en combinación con Hsp70.

50 Con respecto al tratamiento de combinación en el que un compuesto es un enzima para ERT, y el otro es Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, esto puede ayudar eficazmente a reducir la cantidad de enzima para ERT necesaria para lograr una dosis intracelular eficaz. Esto es relevante ya que el ERT es muy caro.

En la situación en la que el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención comprende una combinación de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y un inductor o coinductor de Hsp70, la presencia de Hsp70, por lo tanto, puede incrementar la incorporación de dicho inductor o coinductor de Hsp70.

#### Procedimiento para modular la actividad enzimática de una enzima

- 5 La presente invención se refiere en un aspecto a la modulación de la actividad enzimática. Dicha enzima puede ser una enzima implicada en el catabolismo de sustancias lisosómicas. Y dicha modulación se puede derivar de una interacción entre Hsp70 y BMP.

Por tanto, los inventores de la presente invención han descrito una interacción entre Hsp70 y BMP, en la que Hsp70 interacciona con o se une a BMP con una determinada afinidad. Por una molécula que tiene una "afinidad" por la molécula X se quiere decir en el presente documento que una molécula con afinidad por la molécula X se unirá a la molécula X en determinada cantidad detectable bajo determinadas condiciones, pero no se unirá (opcionalmente de forma detectable) a otras, moléculas diferentes (por las que no tiene afinidad) en la misma medida bajo condiciones idénticas. Una medida para describir la afinidad de una molécula con otra molécula es una constante de disociación, Kd. Cuanto más pequeña sea la Kd, más fuerte será la afinidad. Las constantes de disociación se pueden determinar usando procedimientos muy conocidos en la técnica, tales como análisis de resonancia de plasmón superficial. En el presente documento, se prefiere que una molécula con "afinidad" por otra molécula X tenga una Kd para dicha molécula X que sea menor de X 100 mM, tal como menor de 10 mM, por ejemplo, menor de 5 mM, tal como menor de 1 mM, por ejemplo, menor de 0,1 mM, tal como menor de 0,01 mM, por ejemplo, menor de 1  $\mu$ M, tal como menor de 100 nM, por ejemplo, menor de 10 nM, tal como menor de 1 nM, por ejemplo, menor de 100 pM, tal como menor de 10 pM, por ejemplo, menor de 1 pM. Además, en el presente documento se prefiere que una molécula que "no tiene una afinidad" por la molécula X tenga una constante de disociación, Kd con respecto a la molécula de unión X que sea al menos 10 veces mayor, tal como al menos 20 veces mayor, por ejemplo, al menos 30 veces mayor, tal como al menos 40 veces mayor, por ejemplo, al menos 50 veces mayor, tal como al menos 60 veces mayor, por ejemplo, al menos 70 veces mayor, tal como al menos 80 veces mayor, por ejemplo, al menos 90 veces mayor, tal como al menos 100 veces mayor, que la Kd de la unión (a la molécula X) de una molécula que sí tiene afinidad por la molécula X. Lo más preferentemente, hay al menos una diferencia de diez veces en la Kd entre las moléculas que se considera que tienen una afinidad y las que se considera que no tienen una afinidad por una molécula X.

También se divulga un procedimiento para modular la actividad modular la actividad enzimática de una enzima, en el que dicha enzima interacciona con BMP (bis(monoacilglicerol)fosfato), comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- i) administrar el agente bioactivo de acuerdo con la presente invención;
- ii) permitir la interacción entre BMP y Hsp70, y
- iii) modular la actividad enzimática de una enzima que interacciona con BMP.

35 Dicha Hsp70 puede formar un complejo covalente o no covalente con BMP.

Dicho BMP puede interaccionar con una saposina. Dicha saposina se puede seleccionar del grupo que consiste en saposina A, saposina B, saposina C y saposina D.

Dicha enzima se puede seleccionar del grupo que consiste en esfingomielinasa, esfingomielinasa ácida (aSMasa), ceramidasa ácida, beta-galactosilceramidasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucosilceramidasa, sialidasa y arilsulfatasa.

La modulación de la actividad enzimática puede ser un incremento en la actividad enzimática.

Dicho incremento en la actividad enzimática puede ser un incremento en el intervalo del 1 al 5 %, tal como en el intervalo del 5 al 10 %, por ejemplo, en el intervalo del 10 al 15 %, tal como en el intervalo del 15 al 20 %, por ejemplo, en el intervalo del 20 al 25 %, tal como en el intervalo del 25 al 30 %, por ejemplo, en el intervalo del 30 al 35 %, tal como en el intervalo del 35 al 40 %, por ejemplo, en el intervalo del 40 al 45 %, tal como en el intervalo del 45 al 50 %, por ejemplo, en el intervalo del 50 al 60 %, tal como en el intervalo del 60 al 70 %, por ejemplo, en el intervalo del 70 al 80 %, tal como en el intervalo del 80 al 90 %, por ejemplo, en el intervalo de 90 al 100 %, tal como en el intervalo del 100 al 120 %, por ejemplo, en el intervalo del 120 al 140 %, tal como en el intervalo del 140 al 160 %, por ejemplo, en el intervalo del 160 al 180 %, tal como en el intervalo del 180 al 200 %, por ejemplo, en el intervalo del 200 al 250 %, tal como en el intervalo del 250 al 300 %, por ejemplo, en el intervalo del 300 al 400 %, tal como en el intervalo del 400 al 500 %, por ejemplo, en el intervalo del 500 al 750 %, tal como en el intervalo del 750 al 1000 %, por ejemplo, en el intervalo del 1000 al 1500 %, tal como en el intervalo del 1500 al 2000 %, por ejemplo, en el intervalo del 2000 al 5000 %.

También se divulga un procedimiento para identificar compañeros de unión para el complejo Hsp70-BMP, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de extraer dicho complejo Hsp70-BMP y aislar dichos compañeros de unión. Dicho compañero de unión puede ser un agonista. Dicho compañero de unión puede ser un antagonista.

También se divulga un complejo Hsp70-BMP, y su uso para un medicamento, tal como para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

También se divulga un anticuerpo que reconoce específicamente el complejo Hsp70-BMP.

#### Procedimiento de tratamiento

- 5 En un aspecto, la presente invención se refiere un procedimiento para tratar a un individuo que lo necesita.

Es por tanto un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención a un individuo que lo necesita.

- 10 Se deduce que en una realización dicho tratamiento puede ser profiláctico, curativo o de mejora. En una realización particular dicho tratamiento es profiláctico. En otra realización dicho tratamiento es curativo. En una realización adicional dicho tratamiento es de mejora.

El agente bioactivo usado de acuerdo con la presente invención se puede formular como una composición farmacéutica.

- 15 En una realización, dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia metacromática, sialidosis y deficiencia de saposina.

- 20 En una realización, dicha enfermedad lisosómica es la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A o B. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Farber. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Krabbe. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es leucodistrofia metacromática. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es sialidosis. En otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Fabry. En todavía otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Gaucher. En todavía otra realización particular dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es deficiencia de saposina.

- 25 En una realización, dicha enfermedad lisosómica se caracteriza por una acumulación intracelular elevada de un esfingolípido.

En una realización, dicho tratamiento reduce la acumulación intracelular de sustancias en un individuo que lo necesita. Dicha sustancia puede ser una sustancia que se degrada normalmente en los lisosomas. Dicha sustancia puede ser un esfingolípido.

- 30 En una realización, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede reducir la acumulación intracelular de una sustancia degradable lisosómicamente tal como un esfingolípido hasta menos del 100 % de la cantidad acumulada, tal como menos del 90 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 80 % de la cantidad acumulada, tal como menos del 70 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 60 % de la cantidad acumulada, tal como menos del 50 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 40 % de la cantidad acumulada, tal como menos del 30 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 20 % de la cantidad acumulada, tal como menos del 10 % de la cantidad acumulada, por ejemplo, menos del 5 % de la cantidad acumulada.

- 40 En una realización, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede reducir la acumulación intracelular de un esfingolípido por al menos el 5 %, tal como al menos el 10 %, por ejemplo, al menos el 15 %, tal como al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 25 %, tal como al menos el 30 %, por ejemplo, al menos el 35 %, tal como al menos el 40 %, por ejemplo, al menos el 45 %, tal como al menos el 50 %, por ejemplo, al menos el 55 %, tal como al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, tal como al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 75 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, tal como al menos el 100 %.

- 45 En una realización, dicho esfingolípido acumulado se puede seleccionar del grupo que consiste en esfingomielina, ceramida, galactosilceramida, globotriaosilceramida, glucosilceramida, GM3 y sulfatida.

La tasa de reducción de la concentración intracelular de una sustancia degradable lisosómicamente tal como un esfingolípido puede depender de factores tales como la forma de administración, los regímenes de dosificación y similares.

- 50 En una realización, dicho tratamiento prolonga la expectativa de vida de dicho individuo que lo necesita.

Se deduce, que la esperanza de vida se puede incrementar en entre 6 meses y 1 año, tal como de 1 año a 2 años, por ejemplo, de 2 a 3 años, tal como de 3 a 4 años, por ejemplo, de 4 a 5 años, tal como de 5 a 6 años, por ejemplo, de 6 a 7 años, tal como de 7 a 8 años, por ejemplo, de 8 a 9 años, tal como de 9 a 10 años, por ejemplo, de 10 a 12

años, tal como de 12 a 14 años, por ejemplo, de 14 a 16 años, tal como de 16 a 18 años, por ejemplo, de 18 a 20 años, tal como de 20 a 25 años, por ejemplo, de 25 a 30 años, tal como de 30 a 40 años, por ejemplo, de 40 a 50 años, tal como de 50 a 60 años, por ejemplo, de 60 a 70 años, tal como de 70 a 80 años, por ejemplo, de 80 a 90 años, tal como de 90 a 100 años.

- 5 En una realización, la esperanza de vida se puede incrementar por al menos 6 meses, tal como al menos 1 año, tal como al menos 2 años, por ejemplo, 3 años, tal como al menos 4 años, por ejemplo, 5 años, tal como al menos 6 años, por ejemplo, 7 años, tal como al menos 8 años, por ejemplo, 9 años, tal como al menos 10 años, por ejemplo, 12 años, tal como al menos 14 años, por ejemplo, 16 años, tal como al menos 18 años, por ejemplo, 20 años, tal como al menos 25 años, por ejemplo, 30 años, tal como al menos 40 años, por ejemplo, 50 años, tal como al menos 60 años, por ejemplo, 70 años, tal como al menos 80 años, por ejemplo, 90 años, tal como al menos 100 años.

También es un aspecto de la presente invención proporcionar un procedimiento para prolongación de la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, en el que dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención a un individuo que lo necesita.

- 15 En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para prolongar la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, en el que dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención a un individuo que lo necesita, en el que dicha esperanza de vida se incrementa por entre 6 meses y 1 año, tal como de 1 año a 2 años, por ejemplo, de 2 a 3 años, tal como de 3 a 4 años, por ejemplo, de 4 a 5 años, tal como de 5 a 6 años, por ejemplo, de 6 a 7 años, tal como de 7 a 8 años, por ejemplo, de 8 a 9 años, tal como de 9 a 10 años, por ejemplo, de 10 a 12 años, tal como de 12 a 14 años, por ejemplo, de 14 a 16 años, tal como de 16 a 18 años, por ejemplo, de 18 a 20 años, tal como de 20 a 25 años, por ejemplo, de 25 a 30 años, tal como de 30 a 40 años, por ejemplo, de 40 a 50 años, tal como de 50 a 60 años, por ejemplo, de 60 a 70 años, tal como de 70 a 80 años, por ejemplo, de 80 a 90 años, tal como de 90 a 100 años.
- 25 En una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para prolongar la esperanza de vida en un paciente con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, en el que dicho procedimiento comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con la presente invención a un individuo que lo necesita, en el que dicha esperanza de vida se incrementa por al menos 6 meses, tal como al menos 1 año, tal como al menos 2 años, por ejemplo, 3 años, tal como al menos 4 años, por ejemplo, 5 años, tal como al menos 6 años, por ejemplo, 7 años, tal como al menos 8 años, por ejemplo, 9 años, tal como al menos 10 años, por ejemplo, 12 años, tal como al menos 14 años, por ejemplo, 16 años, tal como al menos 18 años, por ejemplo, 20 años, tal como al menos 25 años, por ejemplo, 30 años, tal como al menos 40 años, por ejemplo, 50 años, tal como al menos 60 años, por ejemplo, 70 años, tal como al menos 80 años, por ejemplo, 90 años, tal como al menos 100 años.

### Ejemplos

- 35 ***Ejemplo 1: La interacción entre Hsp70 y bis(monoacilglicero)fosfato estabiliza los lisosomas y promueve la supervivencia celular***

#### Resumen

- La permeabilización de la membrana lisosómica es un rasgo característico conservado evolutivo de muerte celular inducida por estrés. Aquí, los inventores de la presente invención muestran que lo principal proteína de choque térmico 70 inducible por estrés (Hsp70) potencia la supervivencia celular estabilizando los lisosomas a través de una unión de alta afinidad dependiente de pH a un fosfolípido aniónico endolisosómico bis(monoacilglicero)fosfato (BMP; también denominado ácido lisobisfosfatídico). El dominio ATPasa cargado positivamente de la Hsp70 es responsable de la unión pero el dominio de unión a sustrato también se requiere para la estabilización eficaz de los lisosomas. De forma importante, el efecto crioprotector se puede obtener por la administración endocítica de rHsp70 recombinante y revertir específicamente por la administración extracelular de anticuerpos de BMP o inhibidores de Hsp70. Por tanto, esta interacción proteína-lípido abre interesantes posibilidades para el desarrollo de tratamientos específicos de lisosomas citoprotectores y citotóxicos para el tratamiento de enfermedades degenerativas y de cáncer, respectivamente.

#### Introducción

- 50 Los lisosomas son orgánulos citosólicos altamente dinámicos que reciben la entrada del tráfico de membrana desde las vías biosintética (red *trans*-Golgi), endocítica, fagocítica y autofágica. Contienen más de 50 hidrolasas ácidas que pueden procesar todas las grandes macromoléculas de la célula en productos de escisión disponibles para su reutilización metabólica. Además de sus funciones de mantenimiento catabólicas, las proteasas lisosómicas, catépsinas, se han identificado recientemente como efectores importantes en programas de muerte celular evolutivamente conservada inducidas, por ejemplo, por receptores de muerte de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, hipoxia, estrés oxidativo, estrés osmótico, calor y fármacos anticancerosos. La muerte celular dependiente de catépsina se caracteriza por una permeabilización de la membrana lisosómica temprana y la posterior translocación de catépsinas en el citosol, en el que pueden iniciar las vías de muerte celular tanto

dependiente como independiente de caspasa. Por tanto, la integridad de membrana lisosómica surge como un importante regulador de la supervivencia celular durante diversas condiciones de estrés. Aunque se ha notificado que los inhibidores de cisteína proteasas citosólicas confieren protección contra el daño celular inducido por catepsina tanto en células de mamíferos como en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, los mecanismos por los que las células regulan la estabilidad de membrana lisosómica siguen siendo en gran parte desconocidos. Las pruebas indirectas recientes sugieren, sin embargo, que el potente efecto citoprotector de la principal Hsp70 inducida por estrés se debe a la estabilización de membrana lisosómica. La disminución de Hsp70 desencadena una permeabilización temprana de membranas lisosómicas y muerte celular mediada por catepsina en células cancerosas, y la Hsp70 exógena inhibe eficazmente la desestabilización lisosómica inducida por diversos estreses. Además, los ratones deficientes de Hsp70 padecen pancreatitis provocada por la pérdida de proteasas lisosómicas en el citosol.

El mecanismo molecular subyacente al potencial protector de lisosomas de Hsp70 sigue siendo difícil, pero las claves sobre su mecanismo de acción se podrían encontrar en la translocación asociada a estrés y cáncer de una pequeña parte de Hsp70 en el compartimento endo-lisosómico. La meta principal de este estudio fue definir si la localización lisosómica, de hecho, es crucial para el efecto citoprotector de Hsp70. Notablemente, los datos presentados en el presente documento demuestran que Hsp70 se une con alta afinidad a un BMP lípido específico de lisosomas y que esta interacción proteína-lípido estabiliza los lisosomas. De forma importante, este mecanismo citoprotector novedoso se puede aprovechar por la administración extracelular de la propia Hsp70 citoprotectora o bien de compuestos que interfieren con la unión de Hsp70-BMP o la función de Hsp70 específicamente en el compartimento lisosómico.

### Resultados y discusión

Para someter a prueba si la localización lisosómica es crucial para el efecto citoprotector de Hsp70, los inventores de la presente invención produjeron Hsp70 recombinante (rHsp70) y se aprovecharon de la maquinaria endocítica de las células para dirigir la rHsp70 en el lumen lisosómico. El análisis inmunocitoquímico de células de osteosarcoma U-2-OS incubadas con rHsp70 marcada con Alexa Fluor 488 revelaron una clara colocalización de la rHsp70 de endocitosis con proteínas de marcadores endosómicas y lisosómicas (proteínas de membrana asociadas con lisosomas 1 y 2 y proteína de membrana integral lisosómica 1 (LIMP-1)) y un lípido específico de endolisosomas (BMP), mientras que no se observó ninguna colocalización con marcadores para el retículo endoplásmico ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo endoplásmico (SERCA)), aparato de golgi (golgina-97) o mitocondria (citocromo c (cyt c)). La localización lisosómica también se observó en células vivas, cuando la rHsp70 de endocitosis se colocó con Lysotracker® Red pero no con Mitotracker® Red. Para determinar la cantidad de Hsp70 de endocitosis, se cuantificó la señal fluorescente de las células cargadas con rHsp70\*, lo que reveló que se capta un promedio de 70 ng de rHsp70\* por  $1 \times 10^5$  células. Para determinar si la rHsp70\* de endocitosis estaba localizada solo en el lumen o si tendría una unión directa a las membranas endolisosómicas, se subfraccionaron células U-2-OS cargadas con rHsp70\* y se midió la cantidad de rHsp70\* presente en la fracción ligera de membrana (LMF) (orgánulos celulares incluyendo lisosomas y endosomas tempranos y tardíos). La fractura por congelación de los orgánulos en la LMF por medio de ciclos de congelado/descongelado repetidos en nitrógeno líquido, dio como resultado la liberación de total de catepsina B en el sobrenadante, mientras que se retuvo la proteína de membrana lisosómica LAMP-2 en la fracción de membrana fracturada sedimentada. La cuantificación de rHsp70\* de endocitosis reveló que apróx. 1/3 de la rHsp70\* total permaneció en el sedimento, lo que sugiere firmemente que se unió a las membranas endolisosómicas. Para evaluar si la rHsp70 de endocitosis podría estabilizar las membranas lisosómicas, se cargaron las células con naranja de acridina, una base débil metacromática que se acumula en el compartimento ácido de las células, es decir, los endosomas y lisosomas tardíos, y los sensibiliza para la fotooxidación tras la exposición a luz azul (Brunk *et al.*, 1997; Nylandsted *et al.*, 2004). La fotooxidación da como resultado la pérdida del gradiente de pH lisosómico y la pérdida de naranja de acridina en el citosol. Esto se puede visualizar y cuantificar fácilmente ya que el naranja de acridina presenta fluorescencia roja cuando se concentra en el compartimento ácido de la célula y fluorescencia verde cuando está a una concentración menor en el citosol. Notablemente, la rHsp70 de endocitosis protegió los lisosomas contra la fotooxidación inducida por luz azul, mientras que no se observó protección en células cargadas con Hsc70 recombinante y Hsp70-2, que comparten una homología de secuencia de aminoácidos con Hsp70 del 86 % y del 84 %, respectivamente. Además, un ARN corto de interferencia (siARN) específico para Hsp70 sensibilizó los lisosomas de células U-2-OS para fotooxidación, y este efecto se revirtió completamente por rHsp70 de endocitosis demostrando acertadamente que el efecto protector de Hsp70 endógena está mediado por la pequeña fracción de la proteína localizada en el lumen lisosómico en lugar del gran conjunto que reside en el citosol. Lo anterior demostró la incorporación endocítica eficaz de Hsp70 y la estabilización lisosómica puede explicar los sorprendentes efectos neuroprotectores recientemente publicados de Hsp70 extracelular administrada en los sitios de lesión siguiendo una serie de tratamientos conocidos por desencadenar la vía de muerte celular lisosómica, es decir, daño en la retina provocado por la luz y axotomía del nervio ciático.

Para someter a prueba si el efecto protector de Hsp70 podría ser consecuencia de una asociación directa de Hsp70 con las membranas lisosómicas, los inventores investigaron su interacción con vesículas unilamelares grandes (LUV) de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) que contenían una variedad de lípidos aniónicos asociados a membrana, es decir, palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (POPS; principalmente en la parte interna de la membrana plasmática), cardiolipina (principalmente mitocondrial) y BMP (principalmente en endosomas y lisosomas tardíos). Teniendo en cuenta el medio cada vez más ácido del compartimento endolisosómico después de la maduración en

lisosomas, se compararon las interacciones proteína-lípido en condiciones neutras (pH 7,4) y ácidas (pH 6,0). A pH 7,4, rHsp70 provocó un pequeño cambio relativo en la dispersión de luz a 90° en liposomas de POPC lo que indica una unión muy débil a la bicapa de POPC. Como se informó anteriormente para POP, todos los lípidos cargados negativamente potenciaron la unión de rHsp70 a los liposomas a pH neutro. Esta potenciación fue aproximadamente de 4 veces independientemente del lípido negativo o de la densidad de carga sobre la superficie del liposoma (POP tiene una carga neta de -1, y cardiolipina y BMP tienen una carga neta de -2). Notablemente, la reducción del pH desde 7,4 hasta 6,0 cambió drásticamente el perfil de asociación a lípidos de rHsp70. Aunque la unión a POP solo se incrementó ligeramente después de la acidificación, la unión a BMP fue casi 20 veces más fuerte en el pH ácido en comparación con el pH neutro. La unión de alta afinidad dependiente de pH de Hsp70 a BMP se confirmó en un conjunto independiente de experimentos de BIAcore.

Para someter a prueba si se requería la interacción de alta afinidad dependiente de pH entre Hsp70 y BMP observada *in vitro* para la estabilización mediada por Hsp70 de lisosomas en las células vivas, los inventores dirigieron el BMP celular cargando el compartimento endolisosómico de células U-2-OS con anticuerpos de BMP, como se demostró anteriormente (Kobayashi *et al.*, 1998). Notablemente, los anticuerpos de BMP inhibieron eficazmente la capacidad de rHsp70 de conferir protección contra pérdidas lisosómicas inducidas por fotooxidación. Lo que es aún más importante, los anticuerpos de BMP sensibilizaron significativamente las células de osteosarcoma U-2-OS para cisplatino, lo que induce una permeabilización de membrana lisosómica temprana en células U-2-OS así como otras líneas celulares sensibles a cisplatino usadas en este estudio. En consecuencia, también las células de carcinoma de próstata PC-3 y DU-145 se sensibilizaron significativamente para muerte celular inducida por cisplatino después del tratamiento con anticuerpos anti-BMP.

Una vez confirmado que la interacción Hsp70-BMP lisosómica es esencial para el efecto citoprotector de Hsp70, los inventores investigaron a continuación qué parte de la proteína Hsp70 es responsable de la unión a lípidos. Para determinar esto, se midió el cambio de fluorescencia de los triptófanos (W90 y W580) después del anclaje de rHsp70 en liposomas que contienen BMP a pH 6,0. Los inventores produjeron proteínas mutantes de rHsp70 con deleciones de los dos principales dominios funcionales de la proteína, es decir, el dominio de ATPasa aminoterminal (rHsp70-ΔATP; deleción de aminoácidos 119-426) y el dominio de unión a péptido carboxiterminal (rHsp70-ΔPBD; deleción de aminoácidos 437-617). La pérdida de señal en la intensidad de fluorescencia de pico relativa para Hsp70-ΔATP indicó que se requiere el dominio ATPasa para la unión de alta afinidad de Hsp70 a la bicapa POPC/BMP. A continuación, se sustituyeron los dos triptófanos en Hsp70 con fenilalaninas (W90F y W580F) para estudiar qué triptófano es responsable de la unión a lípidos y del cambio de fluorescencia. La reducción de la señal con rHsp70-w90f que carece del triptófano en el dominio ATPasa (rHsp70-W90F) y la señal inalterada con rHsp70-W580F que carece del triptófano en el dominio de unión a péptido indicó que el triptófano en la posición 90 se acopló en la capa lipídica. Como el procedimiento usado anteriormente solo midió el cambio relativo en la fluorescencia después de que el triptófano se incruste en el entorno lipófilo, los inventores también analizaron la asociación lipídica de rHsp70 y sus mutantes de un modo más cuantitativo empleando un sistema de BIAcore 2000 con LUV que contenían BMP sobre la superficie de un chip sensor L1 a pH 4,5. Tanto rHsp70 como rHsp70-ΔPBD mostraron una fuerte interacción con BMP, mientras que la unión de rHsp70-ΔATP se redujo notablemente. Confirmando que Hsp70 interacciona con BMP principalmente a través de su dominio ATPasa. Sorprendentemente, los mutantes de triptófano mostraron una diferencia notable en su capacidad para interaccionar con BMP. Mientras que el mutante de rHsp70-W580F tuvo esencialmente el mismo perfil de interacción que rHsp70, la unión del mutante de rHsp70-W90F MUTANTE disminuyó drásticamente. Ya que rHsp70-W90F se plegó apropiadamente como se analizó por diroísmo circular de UV lejano y cercano y pudo plegar la luciferasa e hidrolizar la ATP, la mutación de W90F suprimió específicamente la interacción entre Hsp70 y BMP mientras que retuvo los aspectos estructurales y funcionales de la chaperona de Hsp70. Por tanto, el mutante de rHsp70-W90F proporcionó inesperadamente una herramienta inestimable para comprobar adicionalmente si la interacción directa entre Hsp70 y BMP dota a Hsp70 con sus atributos protectores de lisosomas. De hecho, el mutante de rHsp70-w90f había perdido completamente su capacidad para proteger a las membranas lisosómicas contra la fotooxidación y a las células contra la muerte celular lisosómica inducida por cisplatino, mientras que el mutante de rHsp70-W580F mostró la misma eficacia que la proteína salvaje. También, el mutante de rHsp70-ΔPBD que mostró una capacidad inalterada a unirse a membranas ricas en BMP había perdido su capacidad para proteger frente a la fotooxidación y a cisplatino. Estos hallazgos demuestran que se requiere la unión de Hsp70 con BMP, pero no es suficiente, para dotar a las membranas lisosómicas con protección. Además, es necesario un dominio de unión a péptido carboxiterminal intacto para la estabilización de membranas lisosómicas en células vivas.

Los inhibidores de Hsp70 se han considerado durante mucho tiempo como fármacos anticancerosos interesantes. Sin embargo, la atención se ha concentrado en la inhibición de la Hsp70 citosólica, y los problemas relativos a la administración de fármacos y la falta de especificidad entre los miembros de la familia de Hsp70 han presentado barreras intransitables para el desarrollo de antagonistas de Hsp70 adecuados. Una vez establecido que se requieren tanto la unión a BMP como un dominio de unión a péptidos intacto para el efecto citoprotector de Hsp70, y una vez verificado el potencial para dirigir la interacción Hsp70 - BMP, los inventores sometieron a prueba a continuación si el efecto protector de la Hsp70 endolisosómica también se podría contrarrestar por los inhibidores de la actividad chaperona de Hsp70. Esto se llevó a cabo incubando las células con un péptido derivado del factor inductor de apoptosis (ADD70), que inhibe la función chaperona de Hsp70 uniéndola a su dominio de unión a péptidos. Debe señalarse que este gran péptido (388 aminoácidos) no atraviesa la membrana plasmática, y, por lo



tanto, proporciona otra herramienta para dirigir específicamente la Hsp70 endolisosómica. En particular, la incubación de células con péptido ADD70 bloqueó completamente el efecto protector de lisosomas de rHsp70 de endocitosis en células U-2-OS. Para someter a prueba si ADD70 también podría contrarrestar el efecto citoprotector de células con Hsp70, los inventores investigaron su efecto sobre la citotoxicidad inducida por cisplatino en fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados transgénicos con Hsp70 (iMEF), en los que la Hsp70 transgénica confiere casi una resistencia completa contra la muerte celular inducida por cisplatino. Notablemente, el tratamiento con ADD70 de iMEF transgénicos con Hsp70 suprimió eficazmente el efecto protector mediado por Hsp70 y los volvió sensibles a cisplatino como los iMEF naturales. Los iMEF naturales expresan niveles muy bajos de Hsp70, y por tanto la incapacidad de ADD70 para sensibilizarlos adicionalmente a cisplatino apoya la idea de que la sensibilización mediada por ADD70 se debe, de hecho, a la inhibición de Hsp70. Semejante al tratamiento anti-BMP, también el tratamiento con ADD70 sensibilizó células de carcinoma de próstata PC-3 y DU-145 a la citotoxicidad inducida por cisplatino.

Los datos presentados en el presente documento demuestran que Hsp70 interacciona directamente con el fosfolípido aniónico endolisosómico BMP y que esta interacción estabiliza las membranas endolisosómicas. Debido a que la concentración de BMP se incrementa en vesículas endocíticas mientras los endosomas maduran para formar cuerpos multivesiculares, endosomas y lisosomas tardíos, la regulación por pH podría ser la manera por la que Hsp70 se dirija a BMP y a lisosomas. Los subdominios de Hsp70 difieren completamente en sus valores pI, teniendo el dominio ATPasa 1,72 unidades más de pI que el dominio de unión a péptidos. Esta característica sugiere que a pH ácido, preferentemente, el dominio ATPasa está cargado positivamente, lo que podría facilitar su interacción con lípidos aniónicos. Como el pH se reduce durante la maduración endocítica, se acumularía la carga positiva y cualquier interacción aniónica se potenciaría aún más. Los datos presentados en el presente documento que demuestran la dependencia de la interacción de Hsp70 - BMP sobre el pH ácido y el dominio ATPasa apoyan esta teoría. Además, el modelado molecular de la superficie electrostática del dominio ATPasa de Hsp70 reveló que forma una estructura casi de tipo cuña con una carga predominantemente positiva en la parte inferior de la cuña incluso a pH 7,0. De forma interesante, W90 se encuentra dentro de este dominio cargado positivamente, lo que podría dar claves de por qué la mutación de Hsp70-W90F tiene este profundo impacto en la capacidad de Hsp70 para interactuar con BMP y estabilizar los lisosomas. BMP se localiza exclusivamente en las membranas internas del compartimento endolisosómico, donde apoya la desintegración y la extracción de lípidos de las vesículas lipídicas por esfingomielinasa ácida y proteínas activadoras de esfingolípidos dando lugar a metabolitos tales como ceramida y esfingosina-1-fosfato, que se han implicado en la desestabilización de membranas y la muerte celular. Debe señalarse que las membranas internas lisosómicas pueden lograr por invaginación de las membranas del perímetro al nivel de los endosomas tempranos y tardíos, y, por lo tanto, es probable que las respectivas vesículas también contengan Hsp70. En consecuencia, la Hsp70 puede interferir con el papel de BMP como cofactor para la hidrólisis de esfingolípidos y de este modo alterar la composición lipídica de los lisosomas. Para someter a prueba esta hipótesis, los inventores están desarrollando actualmente tecnología basada en espectroscopía de masas para la cuantificación de metabolitos esfingolípidos lisosómicos.

Los datos acumulados sugieren que el incremento en la expresión y la alteración del tráfico de proteasas lisosómicas pueden formar una "talón de Aquiles" para células tumorales sensibilizándolas para la permeabilización de la membrana lisosómica. Por lo tanto, la interacción de BMP-Hsp70 en las membranas endolisosómicas y la estabilización resultante del compartimento endolisosómico proporcionan a las células cancerosas protección contra esta ruta de otro modo directa para la muerte celular. El mecanismo molecular subyacente a este efecto citoprotector abre ahora nuevas posibilidades interesantes para la sensibilización de células cancerosas a agentes que inducen vías de muerte celular lisosómica por medio de la inhibición específica de la función de estabilización de lisosomas de Hsp70. Viceversa, la interacción entre Hsp70 y BMP podría proporcionar nuevas estrategias de tratamiento basándose en la citoprotección ofrecida por la función de estabilización de lisosomas de la Hsp70 administrada de forma exógena para lesiones tan diversas como pancreatitis, lesiones de nervios motores y sensoriales y daño en la retina provocado por la luz.

#### Materiales y procedimientos

##### *Cultivo celular y reactivos*

Se cultivaron líneas celulares de osteosarcoma U-2-OS humanas en RPM11640 (Invitrogen) complementado con suero de ternera inactivado con calor al 6 % y penicilina-estreptomicina. Se generaron iMEF de control apropiadas y transgénicas de Hsp70 y se mantuvieron como se describe previamente (Nylandsted *et al.*, 2004). Se hicieron crecer todas las células a 37°C en una atmósfera de aire humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % y se sometieron a prueba repetidamente y se encontró que eran negativas para micoplasma.

A menos que se indique de otro modo, todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Dinamarca A/S).

##### *Proteínas recombinantes*

Se generaron Hsp70 recombinante y sus mutantes usando el sistema de vector pET-16b (Novagen) con inducción de expresión de proteínas y posterior purificación por afinidad de Ni<sup>2+</sup> optimizado de acuerdo con el protocolo del

fabricante.

Se realizó el marcado de rHsp70 con Alexa Fluor 488 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Molecular Probes).

#### *Incorporación celular de proteínas recombinantes y anticuerpos:*

5 Se cultivaron células subconfluentes en RPM11640 (Invitrogen) complementado con suero de ternera inactivado con calor al 6 % y penicilina-estreptomina. Se añadieron proteínas recombinantes o lisados de reticulocitos directamente al medio para obtener la concentración final. Después, se hicieron crecer las células otras 20 h en presencia de la proteína/lisado.

Se realizó la carga de células con un anticuerpo hacia BMP (LBPA) (6C4) de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica.

10 Se realizó la cuantificación rHsp70\* de endocitosis haciendo crecer células 20 h en presencia de rHsp70\* después de lo cual se recogieron las células, se lavaron 3 veces en PBS y se contaron. Para la incorporación celular, se usaron  $1 \times 10^5$  células. Se lisaron las células por incubación durante 30 min sobre hielo en 100  $\mu$ l de digitonina-PBS (200  $\mu$ g/ml). Se midió la fluorescencia en un lector de placas Spectramax Gemini (Molecular Devices). Para las fracciones ligeras de membrana (LMF), se recogieron un total de  $10 \times 10^6$  células, se lavaron 3 veces en PBS y se  
15 homogeneizaron con Dounce hasta que la rotura de membrana alcanzó el 90 %, como se determinó por tinción con azul de tripano. Después, las células se sometieron a fraccionamientos de membrana eliminando en primer lugar la membrana plasmática, el núcleo y fracciones pesadas de membrana, después de lo cual, se recogió la LMF por centrifugación a 17000\*g durante 20 min. Después, se dividió la LMF en dos (la primera fracción se mantuvo como la LMF "completa"). La segunda fracción se congeló/descongeló durante 5 ciclos en nitrógeno líquido para romper las  
20 membranas y posteriormente se centrifugó a 20000\*g durante 20 min para separar las membranas de contenido luminal. Se realizó todo el trabajo celular después de la recogida a máx. 4 °C.

#### *Ensayos para determinar la integridad lisosómica y la viabilidad celular*

Se lavaron células U-2-OS subconfluentes incubadas con 2  $\mu$ g/ml de naranja de acridina durante 15 minutos a 37 °C, se irradiaron y se analizaron en solución salina equilibrada de Hank complementada con FCS al 3 %. Se  
25 seleccionaron células para obtención de imágenes celulares individuales a partir de 8 áreas predefinidas de cada pocillo en modo de luz transmitida, después de lo cual se visualizaron inmediatamente las mismas células y se expusieron a luz azul de un quemador de arco de mercurio de 100W de USH102 (electric Ushio) instalado en una carcasa U-ULS100HG (Olympus) durante 20 segundos. Se realizó una microscopia de fluorescencia en un microscopio invertido IX-70 de Olympus con un objetivo LCPlanFI x20 con NA = 0,40. Se cuantificó la pérdida de  
30 gradiente de pH lisosómico contando la pérdida de intensidad de la tinción roja.

Se evaluó la muerte celular de tipo apoptosis tiñendo las células con 0,05  $\mu$ g/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes) y contando las células con núcleos condensados en un microscopio fluorescente IX-70 de Olympus invertido (filtro U-MWU 330-385 nm). Para cada experimento, se contaron un mínimo de ocho áreas elegidas al azar. Se  
35 analizó la viabilidad de las células por el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MMT), como se describe previamente<sup>67</sup>. Se cuantificaron las células necróticas por citometría de flujo tiñendo las células durante 10 min a 37 °C con SYTOX Green 2,5  $\mu$ M (Molecular Probes) y a continuación se miden las células teñidas positivamente por su intensidad de fluorescencia en el canal FL1 de un citómetro de flujo (FACSCalibur™; Becton Dickinson).

40 Se trataron las células con cisplatino como se indicó, se obtuvieron fracciones citosólicas por tratamiento con digitonina y se determinaron las actividades de cisteína catepsina citosólica (zFRasa) y de tipo caspasa-3 (DEVDasa).

#### *Interferencia de ARN*

Los siARN usado incluían uno que dirigía los dos genes que codifican contra Hsp70 (*HSPA1A* y *HSPA1B*); 5'-GCCAUGACGAAAGACAACAAUCUGU-3' (SEQ ID NO: 7) (Invitrogen) y un siARN de Hsp70 de control descrito  
45 previamente. Se usó oligofectamina (Invitrogen) como agente de transfección.

#### *Inmunodetección*

Los anticuerpos primarios usados incluyeron anticuerpos monoclonales de ratón contra Hsp70 (2H9; proporcionados amablemente por Boris Margulis, Academia de ciencias de Rusia, San Petersburgo, Rusia), gliceraldehído-3-fosfato  
50 deshidrogenasa (GAPDH; Biogenesis), BMP (6C4; (Kobayashi *et al.*, 1998)), LIMP-1 (H5C6; desarrollado por J. Thomas August y James E.K. Hildreth y obtenido de Developmental Studies Hybridoma Bank desarrollado bajo los auspicios de NICHD y mantenido por la Universidad de Iowa, Departamento de ciencias biológicas, Ciudad de Iowa, EE. UU.), cyt C (clon 6H2.B4, BD PharMingen), SERCA (IID8, Calbiochem), y golgina-97 (CDF4, Molecular Probes). Se detectaron las proteínas separadas por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando los anticuerpos primarios indicador, anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa apropiados de  
55 Dako, reactivos de transferencia de ECL Western (Amersham), y lector de imágenes luminiscente (LAS-1000Plus,

Fujifilm).

#### *Espectros de fluorescencia de triptófano y dispersión de luz de 90° de liposomas*

Se analizaron los espectros de fluorescencia de triptófano (RFI) y dispersión de luz de 90° de liposomas (RSI) en un tampón HEPES (HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4 ó 6,0, como se indicó) empleando LUV que consistían en lípidos indicados esencialmente como se describe previamente. Para el RFI, se añadieron LUV en alícuotas de 10  $\mu$ M y se registraron los espectros después de un periodo de estabilización de 20 min. Para la RSI, se añadieron proteínas recombinantes en alícuotas de 0,12 nmol.

#### *Resonancia de plasmón superficial (BIAcore)*

Para la preparación de LUV, se secó una mezcla de lípidos que consistía en esfingomielina al 10 % en mol, fosfatidilcolina al 50 % en mol, colesterol al 20 % en mol y BMP al 20 % en mol disuelto en disolventes orgánicos, bajo una corriente de argón y se rehidrató en tampón Tris/HCl (pH 7,4) (Kolzer *et al.*, 2004). Se congeló/descongeló la mezcla nueve veces en nitrógeno líquido y después en un incubador a 37 °C. Después de baño por ultrasonidos durante 15 min, se pasó la mezcla 21 veces a través de una membrana de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm. Se realizaron medidas de resonancia de plasmón superficiales usando un sistema a BIAcore 2000 a 25 °C. Se inmovilizaron los LUV (concentración total de lípidos 0,1 mM) sobre la superficie de un chip sensor L1 (BIAcore) en PBS (tampón de carga). El tampón de desplazamiento usado fue tampón de acetato sódico (50 mM, pH 4,5). Como control, se inyectó directamente esfingomielinasa ácida (0,2  $\mu$ M 60  $\mu$ l en tampón de desplazamiento) sobre la superficie de los liposomas. Se obtuvieron unidades de respuesta entre 4100 UR - 5250 UR. Se inyectó la proteína de interés en un tampón de desplazamiento a una tasa de flujo de 20  $\mu$ l/min a las concentraciones indicadas. Después de la inyección, se añadió una fase de disociación 10 min.

#### *Modelado molecular*

Se realizó un análisis de estructura primario así como un modelado molecular con un programa informático disponible del servidor de proteómica de Expert Protein Analysis System (EXPaSy) del Instituto suizo de bioinformática (<http://expasy.org/>). Se realizó el modelado molecular sobre la base de la estructura cristalina del dominio Hsp70-ATPasa humana (código pdb: 1S3X) y el dominio de unión a sustrato de Hsc70 humana (código pdb: 7HSC) con un visualizador de PDB Deep View-Swiss. Los modelos de superficie se basaron en interacción de coulomb a pH 7,0 usando una constante dieléctrica de disolvente de 80 (H<sub>2</sub>O).

#### *Análisis estadístico*

Se realizó un análisis estadístico usando una prueba t de Student pareada de dos colas para evaluar la hipótesis nula. El nivel de corte para la significancia estadística se fijó en el 5 % y se sometieron a prueba todos los grupos de datos para determinar la comparabilidad de sus varianzas usando una prueba F. Se realizaron todas las estadísticas en un mínimo de n = 3 experimentos independientes.

#### Discusión

La literatura ha proporcionado pruebas de que Hsp70 podría estar presentes en las membranas plasmáticas de células tumorales, así como en el sistema endolisosómico. Además, se sabe que Hsp70 podría liberarse en el torrente circulatorio durante diferentes acontecimientos inductores de estrés, siendo los más típicos fiebre, traumatismo y ejercicio físico intenso, siendo los más intrigantes probablemente los de estrés psicológico, aunque este trabajo se realizó principalmente en el campo de inmunología. También se han descrito la presencia de especies de Hsp70 dentro del compartimento endolisosómico para otro miembro de la familia de Hsp70; la Hsc70 expresada de forma constitutiva. De hecho, la función de Hsc70 en este emplazamiento, había dado nombre al proceso conocido como autofagia mediada por chaperona.

Sin embargo, no se sabe nada en la literatura sobre la base molecular para la asociación de Hsp70 con membranas plasmáticas y endolisosómicas, lo que conduce a los inventores a la formulación de este proyecto.

Los datos presentados en el ejemplo 1 muestran que Hsp70 puede interaccionar con lípidos de membrana cargados negativamente tales como fosfatidilserina (PS), y cardiolipina bis(monoaciglicerol)fosfato (BMP) a pH neutro. Después de imitar la acidez que se puede esperar en el sistema endolisosómico temprano (pH 6,0), sin embargo, el perfil de interacción cambia drásticamente, y la afinidad de Hsp70 por BMP se vuelve 20 veces mayor que a pH neutro y casi 9 veces más grande que para PS. Se verificó esta interacción de Hsp70-BMP en un sistema BIAcore más elaborado, en el que el pH se fijó ahora a lo esperado en endosomas y lisosomas tardíos (pH 4,5), los sitios principales para la mayoría de BMP celular. De forma interesante, la proteína que interacción con BMP conocida; esfingomielinasa ácida (aSMasa), que se basa en BMP como cofactor, solo muestra la mitad de afinidad por BMP en comparación con la de Hsp70, que ilustra la alta afinidad relativa de Hsp70 por BMP.

La interacción de Hsp70 con PS también se ha notificado por otros, teniendo una interacción entre Hsp70 de ratón y glucoceramidas ácidas, en la que la interacción dependía del dominio ATPasa N-terminal y en algunos casos también del dominio de unión a péptido (PBD). Sin embargo, contrariamente a los sistemas empleados en el

presente documento, estos hallazgos se realizaron en sistemas que consisten básicamente solo en un lípido (90-100 % y 100 % de lípido puro, respectivamente), no es probable que se parezca a cualquier entorno lipídico marginalmente complejo, que se podrá esperar en la célula eucariota. Sin embargo, la importancia de la región N-terminal de Hsp70 para la asociación lipídica ácida, como muestra Harada *et al.* está de acuerdo con los inventores encontrando que la interacción de Hsp70 con BMP depende de su dominio ATPasa N-terminal. Los inventores muestran además que el triptófano 90 (W90) de Hsp70 es un aminoácido crítico ya que su mutación reduce significativamente la interacción de Hsp70-BMP. Un modelo hipotético sostiene que Hsp70 contiene sitios de unión específicos para las partes hidrófila y lipófila de glucolípidos ácidos, tanto en la ATPasa como en el dominio de unión a péptido (PBD).

Aunque este modelo podría ser aplicable para la unión de Hsp70 a glucolípidos ácidos, los inventores prefieren sugerir otro modelo para la interacción de Hsp70-BMP. En base a los datos presentados en la presente memoria que; I) el PBD solo puede realizar interacciones mucho más débiles con BMP; II) la importancia de W90; III) las propiedades de unión del dominio de ATPasa; y IV) el modelado molecular del potencial electrostático superficial de Hsp70, los inventores sugieren que Hsp70 interacciona con BMP por medio de un subdominio, de tipo cuña, electrostáticamente cargado de forma positiva en la hendidura de ATPasa. Ya que la mutación conservadora de W90 a fenilalanina reduce significativamente la interacción de Hsp70-BMP sin afectar al replegamiento o a las actividades de ATPasa de Hsp70, y dado que esta mutación de un solo aminoácido no cambia el perfil electrostático, es posible, sin embargo, que sea más apropiado un intermedio de los dos modelos para explicar la interacción de Hsp70 con un resto lipídico aniónico más común. En un modelo de este tipo, la carga superficial positiva podría facilitar las interacciones electrostáticas y puede que residuos particulares tales como W90 estén implicados en la determinación de la especificidad de unión de los compañeros de unión lipídica aniónica, en este caso, BMP. De forma interesante, esto podría implicar posiblemente a Hsp70 como un regulador más general de la homeostasis lipídica en la célula. En apoyo de esto, hay datos que demuestran que las membranas lipídicas de las células podrían servir como sensores principales de estrés, tales como fiebre y estrés oxidativo y por tanto, como inductores principales de la respuesta al estrés. Frente al estrés, se podría afirmar que las membranas lipídicas de la célula serían compartimentos cruciales para mantener en la homeostasis o de hecho para modificar con el fin de desencadenar acontecimientos de señalización específicos como respuesta a la exposición celular. La unión de Hsp70 a lípidos tales como BMP y el siguiente incremento en la estabilidad de las membranas lisosómicas y tal vez otros acontecimientos lipídicos celulares podrían representar, por tanto, una parte de la respuesta a estrés celular general. En el caso de cáncer, esta respuesta podría haber sido secuestrada para servir al propio fin del cáncer, pero también desde una perspectiva evolutiva más amplia, podría tener sentido una respuesta de proteína-lípido coordinada frente al estrés celular.

Los datos presentados en el presente documento que muestran que solo Hsp70, no hsc70 y Hsp70-2, pueden proteger directamente las membranas lisosómicas sostienen que una respuesta al estrés lipídico potencial se podría regular específicamente por la propia Hsp70 inducida por estrés principal y no otras especies de Hsp70. Sin embargo, como también se muestra, la disminución de Hsp70-2 también conduce a una permeabilización de la membrana lisosómica y a muerte celular, aunque en este caso, la vía es indirecta ya que depende de LEDGF. Sin embargo, el mecanismo de cómo LEDGF afecta a las membranas lisosómicas sigue sin resolverse.

Para validar la relevancia *in vivo* de la interacción de Hsp70-BMP, los inventores dirigieron BMP por anticuerpos de endocitosis y Hsp70 lisosómica por endocitosis del polipéptido derivado de AIF impermeable celular ADD70. Esto verificó que la interacción entre Hsp70 y BMP sirve para estabilizar las membranas lisosómicas ya que las células posteriormente se sensibilizaron significativamente a los efectos de los estímulos que alteran la membrana lisosómica directa así como el agente quimioterapéutico inductor de LMP cisplatino, el perfil de muerte celular programada se caracterizó como parte de este proyecto. Se ha demostrado anteriormente que la expresión de ADD70 sensibiliza las células cancerosas hacia una variedad de estímulos de muerte y disminuye la oncogenicidad de carcinoma de colon de rata y las células con melanoma de ratón en animales singénicos. La principal diferencia entre este enfoque y el enfoque presentado en el presente documento es que los inventores de la presente invención trataron de dirigir específicamente la Hsp70 lisosómica a través de endocitosis de ADD70, mientras que los estudios anteriores utilizaron una expresión citosólica de ADD70 para dirigir la Hsp70 citoplásmica más abundante. El éxito para dirigir la interacción Hsp70-BMP endolisosómica también proporcionó una determinada prueba de concepto de la idea de dirigir componentes lisosómicos a través de endocitosis por medios terapéuticos, un concepto que podría tener implicaciones terapéuticas amplias, como se puede imaginar, sensibilizando, por ejemplo, células cancerosas a fármacos que inducen vías de muerte celular lisosómica por medio de la inhibición específica de la función estabilizadora de lisosomas de Hsp70. Viceversa, la interacción entre Hsp70 y BMP podría proporcionar nuevas estrategias de tratamiento basándose en la citoprotección ofrecida por la función de estabilización de lisosomas de la Hsp70 administrada de forma exógena para lesiones tan diversas como pancreatitis, lesiones de nervios motores y sensoriales y daño en la retina provocado por la luz. De hecho, ya se ha explorado el concepto de utilizar la maquinaria endocítica para la introducción de compuestos citotóxicos específicos, ya que la administración endocítica de una hélice de BH3 fundamental de hidrocarburo basada en el agonista de muerte del dominio de interacción con BH3 proapoptósico, Bid, mostró que inducía apoptosis en células de leucemia. Este proceso dependía de que la hélice de BH3 abandone el compartimento endocítico intacto y active Bax y Bak para inducir una liberación de citocromo c y activar un programa mitocondrial de apoptosis. Sin embargo, el mecanismo de salida del sistema endocítico no se trató, desafortunadamente, en el presente documento.

Como se muestra en el presente documento, la interacción entre Hsp70 y BMP depende del dominio ATPasa de Hsp70. De forma interesante, recientes informes sobre la cochaperona Hsp70, proteína de unión a Hsp70 1 (HspBP1), podrían reforzar la importancia de esta área cargada positivamente de Hsp70. Un estudio de la estructura cristalina de HspBP1 complejada con parte del dominio de ATPasa de Hsp70 ha revelado que la interacción entre ambas estaba mediada por un pliegue todo  $\alpha$ -helicoidal, curvado en HspBP1 que contenía cuatro repeticiones de tipo armadillo. La cara cóncava de este pliegue curvado abarca el lóbulo II del dominio de ATPasa, el mismo lóbulo que forma la mayor parte del volumen electrostáticamente cargado de forma positiva del dominio de ATPasa de Hsp70s, que los inventores argumentan que media en la interacción entre Hsp70 y BMP. Otra perspectiva sobre esto se proporciona por otro estudio, en el que se caracterizaron 14 líneas celulares de cáncer con respecto a sus niveles de Hsp70/HspBP1 relativos. Este otro estudio encontró que las líneas celulares con una proporción molar de HspBP1/Hsp70 alta eran más susceptibles a fármacos anticancerígenos que las de proporción baja y que la sobreexpresión de HspBP1 promovió la permeabilización de la membrana lisosómica. En base a estos informes, y a los datos presentados en este ejemplo, se podría decir para un modelo en el que HspBP1 al unirse al área cargada positivamente del dominio ATPasa de Hsp70, altera su interacción con BMP y, por lo tanto, su efecto estabilizador sobre las membranas endolisosómicas, dando como resultado un incremento en la sensibilidad para estímulos inductores de LMP. Como tal, el dominio de tipo armadillo de HspBP1 podría formar potencialmente la base de un diseño de fármaco inteligente, como es el caso de ADD70. Sería fácil someter a prueba la eficacia de estas moléculas derivadas de HspBP1 en los sistemas descritos en el presente documento y presenta una vía interesante hacia otras aplicaciones del mecanismo molecular descrito en el presente documento.

Como muestran los inventores en el presente documento, Hsp70 se une con alta afinidad a BMP a pH ácido de 4,5, incluso casi 2 veces mayor que en el caso del compañero de unión a BMP "clásico" esfingomielinasa ácida (aSMasa). De forma interesante, BMP sirve como un cofactor estimulante para la hidrólisis enzimática no solo de esfingomielina por medio de aSMasa, sino de la mayoría de los esfingolípidos unidos a membrana ya que también funciona como un cofactor para proteínas activadoras de esfingolípidos (SAP/saposinas) A-D. Por tanto, una pregunta obvia sería, si Hsp70 por su unión a BMP altera de alguna manera las propiedades de unión de aSMasa y saposinas, modificando de este modo el catabolismo de esfingolípidos y glucoesfingolípidos de membrana y la generación de moléculas efectoras corriente abajo, tales como ceramida y su metabolitos, ceramida-1-fosfato, esfingosina y esfingosina-1-fosfato, de las que todas han estado implicadas tanto en la supervivencia como en la muerte celular. De hecho, los inventores han encontrado que Hsp70 puede modular la unión de aSMasa a liposomas que contienen BMP a pH 4,5, dependiendo de la concentración de Hsp70. Como se puede ver, concentraciones bajas (3-150 nM) de Hsp70 facilitan la interacción de aSMasa con liposomas de BMP-Hsp70, mientras que concentraciones mayores de Hsp70 (300-1500 nM) tienen el efecto opuesto. Aunque esta concentración de trabajo en el medio cuando se añade Hsp70 para endocitosis es de 300 nM, sería difícil estimar una concentración intralisosómica dada sobre esta base y cualquier conclusión como qué efecto tendría la Hsp70 sobre la actividad de aSMasa *in vivo* seguiría siendo especulativa. Sin embargo, la tinción de los iMEF transgénicos con Hsp70 (Hsp70-TG) y naturales (WT) con un anticuerpo monoclonal contra ceramida reveló que los ratones transgénicos con Hsp70 muestran una clara regulación por incremento de ceramida, que está presente en un patrón de cuentas sobre una cadena característico en la periferia de las células así como cerca del núcleo. Otro análisis del perfil de ceramida de los iMEF por medio de extracción lipídica y posterior espectroscopía de masas de los lípidos ha confirmado estos hallazgos, ya que se incrementaron los niveles acumulativos de ceramida desde un promedio de 10,2 ng ceramida/mg de proteína para iMEF-WT hasta 14,9 ng/mg para los transgénicos con Hsp70. Los inventores han justificado además que este efecto se puede atribuir a la acción de Hsp70, ya que los inventores también han determinado el perfil de estas células U-2-OS cargadas con rHsp70 (es decir, rHsp70 300 nM en medio completo durante 24 h, análogo a todos los demás experimentos de endocitosis de Hsp70 presentados en el presente documento). La cuantificación de ceramida en células U-2-OS cargadas con Hsp70 mostró un incremento en los niveles acumulativos de ceramida desde 2,99 ng ceramida/mg de proteína para las células de control hasta 5,10 ng/mg para las células cargadas con Hsp70 (el experimento solo se ha realizado una vez en el momento de redactar). Sin embargo, tomados conjuntamente, todos ellos apoyan un papel para Hsp70 en la modulación de los niveles de ceramida en células, aunque por supuesto se necesita una validación adicional. Sin embargo, si esos datos se pueden verificar, se presentan una serie de cuestiones, tales como la compartimentación de las especies de ceramida, la cuantificación de especies de ceramida específicas (de las que existen al menos 50 especies moleculares distintas), la realización del perfil de los niveles de ceramida frente a diversos estreses, la categoría de la transformación de las células etc.

De forma interesante, se ha abordado un estudio previo de una de estas cuestiones, que demuestra que el choque térmico (42,5 °C durante 2 h) provoca la acumulación de ceramida en linfocitos de leucemia aguda de Molt-4. Esta acumulación se pudo bloquear por los inhibidores farmacológicos Fumonisin B1 y miriocina, de los que el último se considera como un inhibidor específico de la vía *de novo* de la síntesis de ceramida ya que bloquea la acción de serina palmitoiltransferasa, la enzima que inicia la síntesis *de novo* de nuevos esfingolípidos a partir de serina y palmitoil-CoA. Un mecanismo parcial para este incremento en la síntesis *de novo* de ceramida se ha descrito en levaduras, en las que estrés por calor induce una entrada aguda de serina en el RE que impulsan la síntesis *de novo*. Será interesante someter a prueba si el incremento en los niveles de ceramida observados tras la endocitosis de rHsp70 se puede modular por estos inhibidores farmacológicos o si los incrementos observados provienen de las vías catabólicas de degradación de esfingolípidos y la estimulación de éstos por la unión de Hsp70 a BMP. Por supuesto, también se podría plantear la hipótesis de un modelo de compuesto. En este modelo, un estrés por calor

inicial podrían conducir a una fluidización de la membrana, entrada de serina e inicio rápido de síntesis de esfingolípidos *de novo*. Posteriormente, la inducción de Hsp70, como consecuencia del estrés por calor, podría conducir a un incremento en los niveles de Hsp70 en la célula, interacción de Hsp70 con BMP, incremento en la actividad de aSMasa y posiblemente también en la actividad de SAP, dando como resultado la generación de ceramida por las vías catabólicas. Esta respuesta secundaria podría complementar la inducción *de novo* inicial o bien tal vez asumirla ya que la respuesta *de novo* continua podría basarse en un suministro continuo de serina y palmitoil-CoA. Sin embargo queda por someter a prueba si la protección celular es una consecuencia del incremento de la propia ceramida o tal vez podría contribuir a una alteración en los niveles de sus metabolitos corriente arriba y corriente abajo.

En este punto, siguen sin responderse algunas cuestiones importantes, ¿Cómo termina la Hsp70 en el medio extracelular y dentro del compartimento endolisosómico? ¿Se secreta la Hsp70 y después se vuelve a captar por endocitosis? o ¿está presente dentro de los lisosomas o lisosomas secretorios más especializados, esperando una señal de liberación en forma de estrés? Y tal vez la más importante, ¿cuál es el significado biológico de la presencia de Hsp70 en el entorno extracelular?

Aunque el trabajo presentado en este trabajo no puede responder a estas cuestiones complejas, no obstante, se pueden realizar algunas deducciones. En primer lugar, la Hsp70 se pudo someter a endocitosis en todas las líneas celulares estudiadas en este proyecto, defendiendo un camino común para reconocer la Hsp70 extracelular (eHsp70). Esto está de acuerdo con los datos que muestran que la eHsp70 se puede unir a una serie de receptores en diferentes subpoblaciones de leucocitos. Los receptores implicados en el reconocimiento de eHsp70 extracelular incluyen principalmente receptores de reconocimiento de patrón (PRR) y consisten en varios receptores de diferentes familias de receptores, tales como los receptores tipo Toll (TLR), receptores secuestrantes y lectinas de tipo c. Como el trabajo en el proyecto de la presente invención no ha abordado a través de qué mecanismo inicial se somete a endocitosis Hsp70 (mediada por receptor, dependiente de balsa, dependiente de clatrina, etc.) no se puede decir si las PRR son responsables de la endocitosis de eHsp70 vista en los sistemas de la presente invención. Sin embargo, un exceso de 10 veces de Hsp70 no marcada no pudo competir con la incorporación de Hsp70 marcada con Af488 ni en células U-2-OS ni en iMEF, por el contrario, la endocitosis se potenció significativamente en presencia de un exceso de Hsp70 no marcada, lo que hasta cierto punto contradice un mecanismo saturable de incorporación.

El objetivo central del campo inmunológico ha sido principalmente la respuesta de citoquinas y la activación de la defensa inmunológica innata generada por la unión de eHsp70 a las PRR y, por tanto, no se ha tenido mucho en cuenta el efecto de eHsp70 después de la unión a receptor y el inicio de la señalización.

Los mecanismos de liberación de Hsp70 en el medio extracelular y los efectos de Hsp70 una vez en el presente documento se han abordado en cierta medida aunque aún falta una comprensión molecular satisfactoria en estos interesantes mecanismos. No obstante, existen pruebas abundantes de la presencia de Hsp70 en el sistema circulatorio después de estrés y los datos acumulados apoyan un papel para eHsp70, ya sea inducido por estrés o administrado de forma exógena, en la neuroprotección así como en la preparación del sistema de defensas inmunitario primario. En relación con la liberación de Hsp70, las primeras pruebas de la transferencia de Hsp70 de una célula a otra llegaron a partir de estudios en el axón gigante del calamar, y durante la reproducción de estos resultados en células de embrión de rata cultivadas, se presentaron pruebas de que una vía no clásica de exocitosis podría ser responsable de la liberación de Hsp70.

Se ha sugerido que Hsp70 junto con otras proteínas de choque térmico solo se liberan bajo circunstancias patológicas dando como resultado la muerte necrótica y no durante la muerte celular programada. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que Hsp70 se puede liberar de células intactas por mecanismos activos y que el grado de estímulo determina el modo de liberación. De forma importante, ningún estudio conocido ha notificado una correlación directa entre la eHsp70 y los marcadores de daño muscular, aunque se pueden detectar grandes incrementos de eHsp70 en el torrente sanguíneo periférico después del ejercicio físico. Lo más convincente, y quizás también lo más intrigante, son los descubrimientos que muestran que el estrés psicológico, tal como el miedo a los depredadores y el choque eléctrico, pueden provocar una liberación de eHsp70 inducida por estrés, un proceso que se sugirió que era dependiente de la señalización de catecolamina. Esto es particularmente interesante, ya que las catecolaminas por medio del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico pueden conducir a flujos de calcio intracelular, y los flujos de calcio pueden provocar la exocitosis de exosomas, cuerpos multivesiculares y lisosomas. Como tales, durante los momentos de estrés, los incrementos en la noradrenalina que actúa sobre los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos pueden dar como resultado un flujo de calcio dentro de la célula con la consiguiente liberación de Hsp70 dentro de los exosomas. Las pruebas de esta hipótesis surgen de las demostraciones de que se puede liberar eHsp70 en vesículas caracterizadas como exosomas, pero también se han presentado pruebas de que se puede liberar eHsp70 como eHsp70 libre, tanto en los sistemas celulares como *in vivo*. También se ha sugerido que se necesitan balsas lipídicas para la liberación de eHsp70 aunque esto también se ha cuestionado. Además, se ha demostrado que es necesario un compartimento lisosómico funcional para la liberación de eHsp70 y que esta liberación está acompañada por la presencia de proteínas marcadoras lisosómicas sobre la superficie de las células, lo que sugiere una secreción dependiente de la fusión de membrana plasmática y lisosómica.

Independientemente de si laHsp70 liberada está presente en exosomas o como Hsp70 libre, es interesante observar

que aparentemente está implicado algún tipo de compartimento MVB secretor/endosómico tardío/lisosómico en todos los modos de liberación. Basándose en estos datos y en los resultados obtenidos en el presente documento, se puede formular una hipótesis más compleja de cómo la Hsp70 sale del citosol al entorno extracelular. La liberación de Hsp70 aún dependería de incrementos en el calcio intracelular, ya que esto serviría como la señal para la exocitosis de endolisosomas. La presencia de Hsp70 dentro de este compartimento, sin embargo, sería dependiente de la interacción de Hsp70 y BMP, como se describe en el presente documento, ya que Hsp70 se agregaría eficazmente sobre las membranas internas que contienen BMP en endosomas/MVB/lisosomas tardíos. La Hsp70 podría llegar en endosomas y lisosomas tardíos a partir de la incorporación extracelular tal como endocitosis como también se describe en el presente documento, o bien a través de invaginaciones de las membranas de perímetro de endosomas tempranos y tardíos, así como lisosomas, que acercarian la Hsp70 intracelular y BMP en proximidad. La acidez del compartimento mantendría una fuerte preferencia por la localización de Hsp70s para las membranas que contienen BMP. Después de la exocitosis, algo de Hsp70 aún seguiría unida a exosomas que contienen BMP, pero el pH neutro encontrado en el entorno extracelular favorecería ahora un equilibrio de Hsp70-BMP desplazado significativamente más hacia la Hsp70 no unida, dando como resultado Hsp70 tanto libre como unida a exosomas, que después podría ejercer sus funciones extracelulares.

En resumen, los datos presentados en el presente documento muestran que Hsp70 interacciona directamente y de forma dependiente del pH con el fosfolípido aniónico endolisosómico. Los inventores demuestran que la unión de Hsp70 a BMP está mediada por medio del dominio ATPasa de Hsp70, que implica triptófano 90, y que esta interacción da como resultado la estabilización de las membranas endolisosómicas, posiblemente influenciando en la actividad de otras proteínas de unión a BMP. Los inventores también muestran que la aclaración de este mecanismo molecular abre nuevas posibilidades interesantes para la sensibilización de células cancerosas a agentes que inducen vías de muerte celular lisosómica por medio de la inhibición específica de la función de estabilización de lisosomas de Hsp70. Viceversa, la interacción entre Hsp70 y BMP podría proporcionar nuevas estrategias de tratamiento apoyándose en la citoprotección ofrecida por la función estabilizadora de los lisosomas de la Hsp70 administrada de forma exógena.

***Ejemplo 2: La interacción entre Hsp70 y bis(monoacilglicero)fosfato activa la esfingomielinasa ácida, estabiliza las membranas lisosómicas y promueve la supervivencia celular***

La proteína de choque térmico 70 (Hsp70) es una chaperona molecular evolutiva altamente conservada que promueve la supervivencia de las células estresadas inhibiendo la permeabilización de la membrana lisosómica, una característica distintiva de muerte celular inducida por estrés. Se pueden establecer las claves para su mecanismo de acción molecular en la translocación asociada a cáncer y estrés recientemente notificada de una pequeña parte de Hsp70 en el compartimento lisosómico. Aquí, se muestra que la Hsp70 estabiliza los lisosomas potenciando la actividad de esfingomielinasa ácida (ASM), una lipasa lisosómica que hidroliza la esfingomielina y ceramida y fosforilcolina. En un entorno ácido, la Hsp70 se une con alta afinidad y especificidad a un fosfolípido aniónico endolisosómico bis(monoacilglicero)fosfato (BMP), un cofactor esencial para ASM, facilitando así la unión de ASM a BMP y estimulando la actividad de ASM. La inhibición de la interacción de Hsp70 - BMP por anticuerpos de BMP o una mutación puntual (W90A) en Hsp70 así como la inhibición de la actividad ASM por desipramina revierte eficazmente la estabilización mediada por Hsp70 de los lisosomas. En particular, la actividad de ASM reducida en células de pacientes con la enfermedad de Niemann-Pick A (NPDA), un trastorno de almacenamiento lisosómico grave provocado por mutaciones en el gen ASM, también se asocia con una disminución drástica en la estabilidad lisosómica, y este fenotipo se puede corregir eficazmente restaurando la actividad de ASM lisosómica por tratamiento con Hsp70 recombinante o ASM. Tomados conjuntamente, estos datos abren interesantes posibilidades para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosómico y de cáncer con compuestos no permeables a las células que entran en el lumen lisosómico por medio de la vía de administración endocítica.

Las proteasas lisosómicas, catepsinas, son efectores importantes en programas de muerte celular evolutivamente conservada por una amplia variedad de estreses. La muerte celular dependiente de catepsina se caracteriza por una permeabilización de la membrana lisosómica temprana y la posterior translocación de catepsinas en el citosol, en el que pueden iniciar las vías de muerte celular tanto dependiente como independiente de caspasa. Para someter a prueba si la localización lisosómica es crucial para la capacidad notificada de Hsp70 para estabilizar las membranas lisosómicas y proteger las células contra la muerte celular inducida por estrés, se ha hecho uso de la maquinaria endocítica de las células para dirigir la Hsp70 recombinante (rHsp70) en los lisosomas. El análisis inmunocitoquímico y bioquímico de las células de osteosarcoma U-2-OS incubadas con rHsp70 marcada con fluorocromo reveló una incorporación eficaz de rHsp70, su colocalización específica con los marcadores endosómicos y lisosómicos tardíos y la unión a las membranas lisosómicas (Fig. 5a, b y Fig. 9). Con el uso de formación de imágenes en tiempo real para monitorizar la integridad de la membrana lisosómica (Fig. 5c), se mostró que la rHsp70 de endocitosis protegió los lisosomas contra la fotooxidación (Fig. 5d). Además, un ARN corto de interferencia (siARN) específico para Hsp70 sensibilizó los lisosomas para fotooxidación, y este efecto se revirtió completamente por rHsp70 de endocitosis demostrando acertadamente que el efecto protector de Hsp70 endógena está mediado por la pequeña fracción de la proteína en el lumen lisosómico (Fig. 5e). A pesar de la incorporación similar (datos no mostrados), no se observó estabilización lisosómica con Hsc70 recombinante ni con Hsp70-2, que comparten el 86 % y el 84 % de homología de secuencia de aminoácidos con Hsp70, respectivamente (Fig. 5d).

La presencia de Hsp70 en las membranas lisosómicas y su capacidad para sobrevivir en el entorno lisosómico

hidrolítico sugiere que se une a los lípidos de la membrana lisosómica. Así, se investigó la interacción de Hsp70 con vesículas unilamelares grandes (LUV) de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) que contienen diversos lípidos aniónicos asociada a membrana, es decir, palmitoil-oleoil-fosfatidilserina (POPS; principalmente en la membrana plasmática), cardiolipina (principalmente mitocondrial) y BMP (principalmente en endosomas/lisosomas tardíos). Teniendo en cuenta el medio cada vez más ácido del compartimento endolisosómico después de la maduración en lisosomas, se compararon las interacciones proteína-lípido en condiciones neutras (pH 7,4) y ácidas (pH 6,0) (Fig. 6a). A pH 7,4, rHsp70 provocó un pequeño cambio relativo en la dispersión de luz a 90° en liposomas de POPC lo que indica una unión muy débil. Como se notificó anteriormente para POPS, todos los lípidos cargados negativamente potenciaron la unión de rHsp70 a los liposomas a pH neutro aproximadamente 4 veces independientemente de la densidad de carga sobre la superficie del liposoma (variando desde -1 hasta -2) (Fig. 6a). Sorprendentemente, la unión a BMP fue casi 20 veces más fuerte a pH ácido que en comparación con el pH neutro, mientras que la unión a POPS solo se incrementó ligeramente después de la acidificación (Fig. 6a). La unión de alta afinidad de Hsp70 a BMP en pH ácido se confirmó en un conjunto independiente de experimentos con BIAcore (Fig. 6e y 7a). De forma importante, los anticuerpos de BMP administrados al compartimento endolisosómico por endocitosis inhibieron eficazmente la capacidad de rHsp70 para estabilizar los lisosomas en células vivas (Fig. 6b), y sensibilizó las células para cisplatino (Fig. 6c), un fármaco anticanceroso que induce pérdidas lisosómicas.

Para investigar qué parte de la proteína Hsp70 es responsable de la unión a BMP, se midió el cambio en la fluorescencia de los triptófanos después del anclaje de rHsp70 y sus mutantes en los liposomas que contienen BMP. La pérdida de señal en la intensidad de fluorescencia de pico relativa para el mutante de Hsp70 que carece de los aminoácidos 119-426 en el dominio ATPasa amino terminal (rHsp70-AATP), pero no para el que carece de aminoácidos 437-617 en el dominio de unión a péptido carboxi terminal (rHsp70-APBD), indicó que se requiere el dominio ATPasa para la unión de alta afinidad de Hsp70 a BMP (Fig. 6d). A continuación, se sustituyeron los dos triptófanos en Hsp70 con fenilalaninas (W90F y W580F) y se estudió qué triptófano es responsable del cambio en la fluorescencia inducida por la unión a lípidos. La reducción de la señal solo con rHsp70-W90F indicó que el extremo NH<sub>2</sub> terminal de la proteína se acopló en la capa lipídica (Fig. 6d). Un análisis de BIAcore más cuantitativo de la interacción de BMP - rHsp70 confirmó que Hsp70 interactuó con BMP principalmente a través de su dominio ATPasa (Fig. 6e). Sorprendentemente, la mutación W90F suprimió específicamente la interacción entre rHsp70 y BMP mientras que mantuvo los aspectos estructurales (plegamiento como se analizó por dicroísmo circular de UV lejano y cercano) y funcionales (plegamiento de luciferasa e hidrólisis de ATP) de la chaperona Hsp70 (Fig. 6e y datos no mostrados). Por tanto, el mutante de rHsp70-W90F proporcionó una herramienta inestimable para comprobar adicionalmente si la interacción directa entre Hsp70 y BMP dota a Hsp70 con sus atributos protectores de lisosomas. De hecho, el mutante de rHsp70-w90f había perdido completamente su capacidad para proteger a las membranas lisosómicas contra la fotooxidación y a las células contra la muerte celular lisosómica inducida por cisplatino, mientras que el mutante de rHsp70-W580F mostró el mismo efecto protector que la proteína salvaje (Fig. 6f y g). De forma importante, las proteínas Hsp70 mutantes se sometieron a endocitosis esencialmente de forma tan eficaz como la Hsp70 natural (datos no mostrados). Por tanto, se concluye que la unión de Hsp70 a BMP es esencial para el efecto estabilizador de los lisosomas de Hsp70.

Debido a que la concentración de BMP se incrementa en las vesículas endocíticas mientras que los endosomas maduran para formar lisosomas, la regulación por pH podría ser la manera por la que Hsp70 se dirige a los lisosomas. Los cálculos (servidor proteómico de EXPaSy, PROTPARAM, Instituto suizo de bioinformática) reveló que el dominio ATPasa de Hsp70 tiene 1,72 unidades más de pI teórico que el dominio de unión a péptido (6,62 frente a 4,9). Esta característica sugiere que a pH ácido, preferentemente, el dominio de ATPasa está cargado positivamente, lo que podría facilitar su interacción con lípidos aniónicos. Los datos del presente documento que demuestran la dependencia de la interacción de Hsp70 - BMP sobre el pH ácido y el dominio de ATPasa apoyan esta teoría. Además, el modelado molecular de la superficie electrostática del dominio ATPasa de Hsp70 reveló que forma una estructura casi de tipo cuña con una carga predominantemente positiva en la parte inferior de la cuña que contiene W90 explicando posiblemente el profundo impacto de la mutación W90F en la capacidad de Hsp70 para interactuar con BMP y estabilizar los lisosomas (Fig. 6h).

BMP se une a ASM con alta afinidad y estimula su capacidad para hidrolizar esfingomielina a ceramida y fosforilcolina. El análisis de BIAcore reveló que el tratamiento previo de LUV que contienen BMP con rHsp70 a concentraciones subequimolares facilitó la posterior unión de ASM, mientras que concentraciones de rHsp70 mayores mostraron un efecto inhibitorio (Fig. 7a y 10). Notablemente, los fibroblastos embrionarios murinos transgénicos con Hsp70 (Hsp70-MEF), que están protegidos contra daño lisosómico inducido por estrés (Fig. 7e), presentaron una actividad de ASM significativamente mayor que los MEF naturales (WT-MEF), y el tratamiento de WT-MEF con rHsp70 en una concentración citoprotectora (300 nM) incrementó la actividad de ASM hasta un nivel comparable al de los Hsp70-mMEF (Fig. 7b). Para someter a prueba si ASM es responsable del efecto estabilizador de los lisosomas, se trataron las células con desipramina, un inhibidor de ASM farmacológico bien caracterizado. La desipramina redujo la viabilidad de los MEF de un modo dependiente de la dosis y la muerte celular se asoció con una permeabilización masiva de los lisosomas como se demuestra por la pérdida de catepsinas lisosómicas en el citosol (Fig. 7c y d). En particular, la muerte celular inducida por desipramina y las pérdidas lisosómicas disminuyeron significativamente en Hsp70-MEF en comparación con WT-MEF. Además, la inhibición de ASM con concentración subtóxica de desipramina revirtió la resistencia al estrés lisosómico de Hsp70-MEF hasta el nivel de WT-MEF como se demuestra por la pérdida acelerada de la integridad de la membrana lisosómica después de la



fotooxidación (Fig. 7e). El papel protector de lisosomas de ASM también está respaldado por datos que muestran que los lisosomas en fibroblastos de pacientes con NPDA, un trastorno de almacenamiento lisosómico mortal provocado por mutaciones en el gen ASM, presentaban una sensibilidad extrema al daño inducido por fotooxidación (Fig. 8a). Notablemente, rHsp70 también puede potenciar la actividad enzimática del ASM mutada endógena así como la rASM simultáneamente cargada en las células del paciente (Fig. 8b). El incremento en la actividad de ASM obtenida cargando los lisosomas con rHsp70, rASM o la combinación de los dos se correlacionó con su capacidad para estabilizar los lisosomas y para normalizar el volumen del compartimento lisosómico drásticamente ampliado en células de NPDA (Fig. 8b-d). Cabe señalar que al igual que rHsp70, rASM también localizó para los lisosomas (Fig. 8b).

Tomados conjuntamente, los datos de la presente invención indican que la interacción de Hsp70-BMP estabiliza los lisosomas por medio de un mecanismo que implica la regulación del metabolismo de esfingomielina en lugar de la estabilización física directa de la membrana. Este efecto indirecto está apoyado por el hecho de que BMP se localiza exclusivamente en las membranas internas del compartimento endolisosómico, en el que su función principal es apoyar la desintegración y la extracción de lípidos de las vesículas lipídicas por ASM y proteínas activadoras de esfingolípidos. De forma interesante, el incremento mediado por ASM en la concentración de ceramida lisosómica modifica la conformación estérica de las membranas lisosómicas y por lo tanto facilita su fusión con otras vesículas intracelulares y la membrana plasmática. Por tanto, los cambios en la composición y el volumen de la membrana lisosómica como resultado de la capacidad de fusión potenciada inducida por ceramida pueden contribuir al incremento mediado por Hsp70 en la estabilidad lisosómica. Por otra parte, diversos estímulos apoptóticos inducen la translocación de ASM a la parte exterior de la membrana plasmática, en la que la ceramida puede formar microdominios de lípidos que funcionan como sitios para la activación de moléculas de señalización asociadas a las membranas implicadas en la señalización apoptótica. Por tanto, la ceramida puede tener efectos opuestos sobre la supervivencia celular dependiendo de si se produce dentro del lisosoma o sobre la membrana plasmática. El mecanismo molecular descrito anteriormente subyacente al efecto citoprotector de Hsp70 abre nuevas posibilidades interesantes para la sensibilización de células cancerosas a agentes que inducen vías de muerte celular lisosómica por medio de la inhibición específica de la función de estabilización de lisosomas de Hsp70. Viceversa, la capacidad de administrar de forma exógena rHsp70 sola o en combinación con rASM se puede exponer directamente como un tratamiento novedoso para pacientes con NPD, cuyas opciones terapéuticas están actualmente limitadas a tratamientos génicos y de células madre.

### Resumen de procedimientos

Se generaron WT- y Hsp70-MEF, se immortalizaron y se mantuvieron como se describe en la técnica. Los fibroblastos de NPDA humanos (83/24) se originan a partir de una biopsia cutánea de un paciente de 5 semanas de edad con hepatoesplenomegalia. Se generaron las proteínas recombinantes usando el sistema de vector pET-16b y purificación por afinidad de  $\text{Ni}^{2+}$  (Novagen), y se marcó con Alexa Fluor 488 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Molecular Probes). Para analizar la integridad lisosómica, se desarrolló un procedimiento de formación de imágenes en tiempo real de células teñidas con naranja de acridina, una base débil metacromática que se acumula en el compartimento ácido de las células tiñéndolas de rojo y sensibilizándolas para la fotooxidación. La pérdida inducida por fotooxidación del gradiente de pH lisosómico y la pérdida de naranja de acridina en el citosol de lisosomas individuales se cuantificó visualmente como "pérdida de puntos rojos" en células U-2-OS y como una disminución en el color rojo y un incremento en fluorescencia verde por el programa informático LSM DUO de Zeiss en los fibroblastos. Se midieron las actividades de captasinas totales y citoplásmicas (extraída con digitonina) en muestras tratadas con digitonina usando una sonda zFR-AFC (Enzyme System Products) como se describen en la técnica. Se analizaron los espectros de fluorescencia de triptófano y la dispersión de luz de 90° de liposomas en un tampón HEPES (HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH como se indica) esencialmente como se describen en la técnica. Se realizaron medidas de resonancia de plasmón superficial con LUV inmovilizadas usando un sistema BIAcore 2000 como se describe en la técnica. Se transfectaron si ARN de Hsp70 (5'-GCCAUGACGAAAGACAACAAUCUGU-3') y un siARN de Hsp70 de control con oligofectamina (Invitrogen). Se realizó la inmunodetección con protocolos estándar. Se analizaron la muerte celular de tipo apoptosis y la permeabilización de la membrana lisosómica esencialmente como se describe en la técnica. Se analizó la actividad de ASM por el kit en ensayo de esfingomielinasa Amplex Red (A12220) de Molecular Probes con modificaciones descritas en la técnica. Se realizaron análisis estadísticos usando una prueba t de Student pareada de dos colas y se sometieron a prueba todos los grupos de datos para determinar la comparabilidad de sus varianzas usando una prueba F.

### Procedimientos

**Cultivo celular y reactivos.** Se cultivaron células de osteosarcoma U-2-OS humanas en RPMI 1640 (Invitrogen) complementadas con suero de ternera inactivado con calor al 6 % y penicilina-estreptomycin. Se generaron MEF de control apropiados y transgénicos con Hsp70 y se mantuvieron como se describe en la técnica. Se hicieron crecer fibroblastos de NPDA primarios humanos en medio MFE complementados además con Na-piruvato al 1 %, HEPES al 1 %, L-glutamina al 1 %. Se hicieron crecer todas las células a 37 °C en una atmósfera de aire humidificado con  $\text{CO}_2$  al 5 % y se sometieron a prueba repetidamente y se encontró que eran negativas para micoplasma. A menos que se indique de otro modo, todos los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Dinamarca A/S).

*Ensayos para integridad lisosómica.* Se lavaron células subconfluentes incubadas con 2 µg/ml de naranja de acridina durante 15 minutos a 37 °C, se irradiaron y se analizaron en solución salina equilibrada de Hank complementada con suero fetal bovino al 3 %. Se seleccionaron células para obtención de imágenes celulares individuales a partir de 8 áreas predefinidas de cada pocillo en modo de luz transmitida, después de lo cual se visualizaron inmediatamente las mismas células y se expusieron a luz azul de un quemador de arco de mercurio de 100W de USH102 (electric Ushio) instalado en una carcasa U-ULS100HG (Olympus) durante 20 segundos. Se realizó una microscopia de fluorescencia en un microscopio invertido IX-70 de Olympus con un objetivo LCPlanFI x20 con NA = 0,40. Se cuantificó la pérdida de gradiente de pH lisosómico contando la pérdida de intensidad de la tinción roja. Se desarrolló un procedimiento más elaborado para el ensayo de la integridad lisosómica para manejar el compartimento lisosómico más grande de los diversos fibroblastos usados en este estudio. Se seleccionaron células para la formación de imágenes celulares individuales a partir de 8 áreas predefinidas de cada pocillo en modo de luz transmitida después de lo cual se expusieron inmediata y continuamente las mismas células a luz 489 nm desde un diodo láser de 100 mW mientras se capturaban micrografías de barrido láser cada 330 ms sobre un sistema confocal LSM LIVE DUO de Zeiss en dos canales definidos por filtros pasabanda para luz 495-555 nm (verde) y LP650 nm (rojo). Subsiguientemente, se analizaron las películas a intervalos prefijados resultantes por el programa informático LSM DUO de Zeiss. Se midieron las actividades de catepsinas totales y citoplásmicas (extraídas con digitonina) en muestras tratadas con digitonina usando una sonda zFR-AFC (Enzyme System Products) como se describe en la técnica.

*Ensayos para determinar la viabilidad celular.* Se evaluó la densidad celular por el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrasodio (MTT, SIGMA-Aldrich) esencialmente como se describe en la técnica. Se evaluó la muerte celular de tipo apoptosis tiñendo las células con 0,05 µg/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes) y contando las células con núcleos condensados en un microscopio fluorescente IX-70 de Olympus invertido (filtro U-MWU 330-385 nm). Para cada experimento, se contaron un mínimo de ocho áreas elegidas al azar.

*Inmunodetección y microscopía.* Los anticuerpos primarios usados incluyeron anticuerpos monoclonales de ratón contra Hsp70 (2H9; proporcionados amablemente por Boris Margulis, Academia de ciencias de Rusia, San Petersburgo, Rusia), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH; Biogenesis), BMP (6C4), proteína de membrana integral lisosómica 1 (H5C6; desarrollado por J. Thomas August y James E.K. Hildreth y obtenido de Developmental Studies Hybridoma Bank desarrollado bajo los auspicios de NICHD y mantenido por la Universidad de Iowa, Departamento de ciencias biológicas, Ciudad de Iowa, EE. UU.). Se detectaron las proteínas separadas por SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando los anticuerpos primarios indicador, anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa apropiados de Dako, reactivos de transferencia de ECL Western (Amersham), y lector de imágenes luminiscente (LAS-1000Plus, Fujifilm). Para inmunocitoquímica, se usaron anticuerpos conjugados con Alexa Fluor® -576- o Alexa Fluor -488-®. Se usó Lysotracker Red® para visualización en tiempo real del compartimento lisosómico. Se tomaron imágenes de fluorescencia usando un microscopio de barrido láser Axiovert 100m de Zeiss. Se realizaron la cuantificación de Lysotracker y películas a intervalos prefijados para determinar la integridad lisosómica en un sistema LSM LIVE DUO de Zeiss.

*Espectros de fluorescencia de triptófano y dispersión de luz de 90° de liposomas.* Se analizaron los espectros de fluorescencia de triptófano (RFI) y la dispersión de luz de 90° de liposomas (RSI) en un tampón HEPES (HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4 ó 6,0 como se indica) empleando LUV que consistían en lípidos indicados esencialmente como se describe en la técnica. Para RFI, se añadieron LUV en alícuotas de 10 nM y se registraron espectros después de un periodo de estabilización de 20 min. Para la RSI, se añadieron proteínas recombinantes en alícuotas de 0,12 nmol.

*Resonancia de plasmón superficial (BIAcore).* Para la preparación de LUV, se secó una mezcla de lípidos que consistía en esfingomielina al 10 % en mol, fosfatidilcolina al 50 % en mol, colesterol al 20 % en mol y BMP al 20 % en mol disuelto en disolventes orgánicos, bajo una corriente de argón y se rehidrató en tampón Tris/HCl (pH 7,4). Se congeló/descongeló la mezcla nueve veces en nitrógeno líquido y después en un incubador a 37 °C. Después de baño de ultrasonidos durante 15 min, se pasó la mezcla 21 veces a través de una membrana de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm. Se realizaron medidas de resonancia de plasmón superficial usando un sistema BIAcore 2000 a 25 °C. Se inmovilizaron LUV (concentración total de lípidos 0,1 mM) sobre la superficie de un chip sensor L1 (BIAcore) en PBS (tampón de carga). El tampón de desplazamiento usado fue tampón de acetato sódico (50 mM, pH 4,5). Como control, se inyectó directamente esfingomielinasa ácida (0,2 µM 60 µl en tampón de desplazamiento) sobre la superficie de los liposomas. Se obtuvieron unidades de respuesta entre 4100 UR - 5250 UR. Se inyectó la proteína de interés en un tampón de desplazamiento a una tasa de flujo de 20 µl/min a las concentraciones indicadas. Después de la inyección, se añadió una fase de disociación 10 min. En el caso en el que rASM siguió a rHsp70, se añadió rASM durante 180 segundos después de la fase de disociación de rHsp70 de 10 min seguido aún por una fase de disociación de 10 min.

*Modelado molecular.* Se realizó un análisis de estructura primaria así como un modelado molecular con un programa informático disponible del servidor de proteómica de Expert Protein Analysis System (EXPaSy) del Instituto suizo de bioinformática (<http://expasy.org/>). Se realizó el modelado molecular sobre la base de la estructura cristalina del dominio Hsp70-ATPasa humana (código pdb: 1S3X) y el dominio de unión a sustrato de Hsc70 humana (código pdb: 7HSC) con un visualizador de PDB Deep View-Swiss. Los modelos de superficie se basaron en interacción de

coulomb a pH 7,0 usando una constante dieléctrica de disolvente de 80 (H<sub>2</sub>O).

*Análisis estadístico.* Se realizó un análisis estadístico usando una prueba t de Student pareada de dos colas para evaluar la hipótesis nula. El nivel de corte para la significancia estadística se fijó en el 5 % y se sometieron a prueba todos los grupos de datos para determinar la comparabilidad de sus varianzas usando una prueba F. Se realizaron todas las estadísticas en un mínimo de n = 3 experimentos independientes.

### **Ejemplo 3: Efecto de alcohol bencílico sobre la enfermedad de almacenamiento lisosómico**

En los ejemplos 2 y 3 se muestra que Hsp70 tiene un efecto estabilizador de lisosomas por medio de una interacción con BMP. Para evaluar si este efecto también se observa cuando se exponen las células a un inductor de Hsp70 químico, se trataron fibroblastos de un paciente con Niemann-Pick de Tipo A (NPDA) con el inductor de Hsp70 de moléculas pequeñas; alcohol bencílico (BA). Los resultados se muestran en la figura 11. En primer lugar, se trataron células de NPDA con dosis crecientes de BA (0, 20, 30, 35, 40, 45 mM), se lisaron y se analizaron por transferencia de tipo western. Se cargó la misma cantidad de proteína en cada pocillo. Se evaluó la expresión de la proteína Hsp70 para cada condición, y se muestra que BA indujo la expresión de Hsp70 de un modo dependiente de la dosis (anticuerpo primario: Stressgen SPA-810, específico para Hsp70). A continuación, se evaluó la estabilidad de lisosomas de Gotz de NPDA después del tratamiento con BA 40 mM, usando los mismos procedimientos que se describen en el ejemplo 2. Se observó un incremento en la estabilidad lisosómica en respuesta a BA. Por último, se evaluó el área de sección transversal lisosómica en células de Gotz de NPDA después del tratamiento con BA 40 mM, usando los mismos procedimientos que se describen en el ejemplo 2. Se observó una disminución de la patología.

### **Puntos**

1. Procedimiento para modular la actividad enzimática de una enzima, en el que dicha enzima interacciona con BMP, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar Hsp70, o un fragmento funcional de la misma, en una forma adecuada para permitir la interacción entre BMP y Hsp70, o dicho fragmento funcional de la misma, y de este modo modular la actividad enzimática de una enzima que interacciona con BMP.
2. Procedimiento del punto 1, en el que Hsp70 o dicho fragmento funcional de la misma forma un complejo covalente o no covalente con BMP.
3. Procedimiento de uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que BMP interacciona con una saposina.
4. Procedimiento del punto 3, en el que dicha saposina se selecciona del grupo que consiste en saposina A, saposina B, saposina C y saposina D.
5. Procedimiento de uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en esfingomielinasa, esfingomielinasa ácida, sialidasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, beta-galactosilceramidasa, glucosilceramidasa y ceramidasa ácida.
6. Hsp70, o un fragmento funcional de la misma, para su uso como medicamento.
7. Hsp70, o un fragmento funcional de la misma, para su uso en el tratamiento, alivio o profilaxis de un trastorno de almacenamiento lisosómico.
8. Uso del punto 7, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en los trastornos de Niemann-Pick, de Gaucher, de Farber, de Krabbe, de Fabry y la sialidosis.
9. Un procedimiento para incrementar la incorporación de un compuesto, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de administrar dicho compuesto junto con Hsp70 o un fragmento funcional de la misma.
10. Procedimiento del punto 9, en el que dicha Hsp70 o un fragmento funcional de la misma se une de forma covalente a dicho compuesto.

### **Puntos**

1. Un agente bioactivo capaz de incrementar la concentración intracelular y/o actividad de Hsp70 para su uso como medicamento o en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.
2. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho agente bioactivo es Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma.
3. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, tiene una homología del 100 % con la proteína Hsp70 salvaje.
4. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, tiene una homología de entre el 99,9 y el 95 %, por ejemplo, una homología del 95 al 90 %, tal como una homología del 90 al 85 %, por ejemplo, una homología del 85 al 80 %, tal como una homología del 80 al 75 %, por ejemplo, una homología del 75 al 60 % con la proteína salvaje.
5. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicho agente bioactivo es Hsp70.
6. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicha Hsp70 es Hsp70 de longitud completa.
7. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicho agente bioactivo es un fragmento o variante funcional de Hsp70.
8. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 7, en el que dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 tiene una longitud total menor de 641 aminoácidos, tal como menor de 625 aminoácidos, por ejemplo menor de 600 aminoácidos, tal como menor de 575 aminoácidos, por ejemplo menor de 550 aminoácidos, tal como menor de 525 aminoácidos, por ejemplo, menor de 500 aminoácidos, tal como menor de 475 aminoácidos, por ejemplo, menor de

450 aminoácidos, tal como menor de 425 aminoácidos, por ejemplo, menor de 400 aminoácidos, tal como menor de 375 aminoácidos, por ejemplo, menor de 350 aminoácidos, tal como menor de 325 aminoácidos, por ejemplo, menor de 300 aminoácidos, tal como menor de 275 aminoácidos, por ejemplo, menor de 250 aminoácidos, tal como menor de 225 aminoácidos, por ejemplo, menor de 200 aminoácidos, tal como menor de 175 aminoácidos, por ejemplo, menor de 150 aminoácidos, tal como menor de 125 aminoácidos, por ejemplo, menor de 100 aminoácidos, tal como menor de 75 aminoácidos, por ejemplo, menor de 50 aminoácidos, tal como menor de 25 aminoácidos.

9. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 7, en el que dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 tiene una longitud total mayor de 10 aminoácidos, tal como mayor de 25 aminoácidos, por ejemplo mayor de 50 aminoácidos, tal como mayor de 75 aminoácidos, por ejemplo mayor de 100 aminoácidos, tal como mayor de 125 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 150 aminoácidos, tal como mayor de 175 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 200 aminoácidos, tal como mayor de 225 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 250 aminoácidos, tal como mayor de 275 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 300 aminoácidos, tal como mayor de 325 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 350 aminoácidos, tal como mayor de 375 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 400 aminoácidos, tal como mayor de 425 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 450 aminoácidos, tal como mayor de 475 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 500 aminoácidos, tal como mayor de 525 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 550 aminoácidos, tal como mayor de 575 aminoácidos, por ejemplo, mayor de 600 aminoácidos, tal como mayor de 625 aminoácidos.

10. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 7, en el que dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 tiene sustituciones de aminoácidos de entre el 0,1 al 1 % de los residuos de aminoácidos de Hsp70, tal como de entre el 1 al 2 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 2 al 3 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 3 al 4 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 4 al 5 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 5 al 10 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 10 al 15 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 15 al 20 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 20 al 30 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 30 al 40 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 40 al 50 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 50 al 60 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 60 al 70 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 70 al 80 % de residuos de aminoácidos, por ejemplo, de entre el 80 al 90 % de residuos de aminoácidos, tal como de entre el 90 al 100 % de residuos de aminoácidos.

11. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 7, en el que dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 tiene una longitud total dentro del intervalo de 5 a 25 aminoácidos, tal como de 25 a 50 aminoácidos, por ejemplo, de 50 a 75 aminoácidos, tal como de 75 a 100 aminoácidos, por ejemplo, de 100 a 125 aminoácidos, tal como de 125 a 150 aminoácidos, por ejemplo, de 150 a 175 aminoácidos, tal como de 175 a 200 aminoácidos, por ejemplo, de 200 a 225 aminoácidos, tal como de 225 a 250 aminoácidos, por ejemplo, de 250 a 275 aminoácidos, tal como de 275 a 300 aminoácidos, por ejemplo, de 300 a 325 aminoácidos, tal como de 325 a 350 aminoácidos, por ejemplo, de 350 a 375 aminoácidos, tal como de 375 a 400 aminoácidos, por ejemplo, de 400 a 425 aminoácidos, tal como de 425 a 450 aminoácidos, por ejemplo, de 450 a 475 aminoácidos, tal como de 475 a 500 aminoácidos, por ejemplo, de 500 a 525 aminoácidos, tal como de 550 a 525 aminoácidos, por ejemplo, de 550 a 575 aminoácidos, tal como de 575 a 600 aminoácidos, por ejemplo, de 600 a 625 aminoácidos, tal como de 625 a 640 aminoácidos.

12. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 7, en el que dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 comprende todo o parte del dominio ATPasa de Hsp70.

13. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 7, en el que dicho fragmento o variante funcional de Hsp70 comprende triptófano en la posición aminoacídica 90 del dominio ATPasa de Hsp70.

14. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicha Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, es Hsp70 recombinante (rHsp70)

15. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 2, en el que dicha Hsp70 deriva de un mamífero seleccionado del grupo que consiste en ser humano (*homo sapiens*), ratón (*mus musculus*), vaca, perro, rata, hurón, cerdo, oveja y mono.

16. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho agente bioactivo es un inductor o coinductor de Hsp70.

17. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 16, en el que dicho agente bioactivo es un inductor de Hsp70.

18. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 16, en el que dicho agente bioactivo es un coinductor de Hsp70.

19. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 18, en el que dicho coinductor de Hsp70 es un derivado de hidroxilamina.

20. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 19, en el que dicho derivado de hidroxilamina se selecciona del grupo que consiste en Bimoclomol (BRLP-42), Arimoclomol (BRX-220), BRX-345 y BGP-15

21. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 19, en el que dicho derivado de hidroxilamina es Arimoclomol (BRX-220).

22. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 17, en el que dicho inductor de Hsp70 es un fluidificante de membrana.

23. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 22, en el que dicho fluidificante de membrana se selecciona del grupo que consiste en alcohol bencílico, heptanol, AL721, ácido docosahexaenoico, alcoholes alifáticos, alcohol oleílico, dimetilaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol, lidocaína, ropivacaína, bupivacaína y mepivacaína.

24. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 16, en el que dicho inductor o coinductor de Hsp70 se selecciona del grupo que consiste en Edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub> o 1-octadecil-2-metil-rac-glicero-3-fosfocolina), celecoxib, rofecoxib, ácido acetilsalicílico, salicilato de sodio, indometacina, PGA1, PGj2, 2-ciclopenten-1-ona, agonistas de receptor gamma activado por proliferadores de peroxidasa, vincristina, paclitaxel, pioglitazona,

carboplatino, doxorubicina, fludarabina, ifosfamida citarabina, geldanamicina, 17-AAG, 17-DMAG, radicicol, herbimicina-A, ácido araquidónico, MG132, lactacistina, DCIC, TLCK, TPCK, geranilgeranilacetona (GGA), rebamipida, carbenoxolona, polaprezinc (L-carnosina de zinc), dexametasona, cocaína, nicotina, alcohol, agonistas alfa-adrenérgicos, prostanoides de ciclopentenona, paeoniflorina, glicirricina, celastrol, dihidrocelastrol, diacetato de dihidrocelastrol y curcuma.

25. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho agente bioactivo es tratamiento térmico subletal.

26. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 25, en el que dicho tratamiento térmico subletal comprende incrementar la temperatura de un individuo hasta una temperatura de núcleo de aproximadamente 38 °C, tal como aproximadamente 39 °C, por ejemplo, aproximadamente 40 °C, tal como aproximadamente 41 °C, por ejemplo, aproximadamente 42 °C, tal como aproximadamente 43 °C.

27. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho agente bioactivo comprende una combinación de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y un inductor o coinductor de Hsp70.

28. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho agente bioactivo comprende una combinación de Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, y una sustancia que incrementa la interacción entre Hsp70 y BMP.

29. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho tratamiento es profiláctico, curativo o de mejora.

30. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en los trastornos de Niemann-Pick, Farber, Krabbe, Fabry, Gaucher, sialidosis, leucodistrofia metacromática y deficiencia de saposina.

31. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, en el que dicho agente bioactivo se administra a un individuo que lo necesita por vía parenteral.

32. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 31, en el que dicha administración parenteral es una inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarterial, subcutánea o intraperitoneal.

33. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 31, en el que dicha administración parenteral es una infusión intravenosa.

34. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 33, en el que dicha infusión intravenosa se produce durante un periodo de tiempo de desde 10 minutos hasta 20 minutos, tal como de 20 a 30 minutos, por ejemplo, de 30 a 40 minutos, tal como de 40 a 50 minutos, por ejemplo, de 50 a 60 minutos, tal como de 60 a 90 minutos, por ejemplo, de 90 a 120 minutos, tal como de 2 horas a 3 horas, por ejemplo, de 3 a 4 horas, tal como de 4 a 5 horas, por ejemplo, de 5 a 6 horas, tal como de 6 a 7 horas, por ejemplo, de 7 a 8 horas.

35. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 31, en el que dicha administración parenteral es una administración transmucosa.

36. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 35, en el que dicha administración transmucosa es una administración sublingual.

37. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 35, en el que dicha administración transmucosa es una administración bucal.

38. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 35, en el que dicha administración transmucosa es insuflación.

39. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 35, en el que dicha administración transmucosa es una administración intranasal.

40. Hsp70, o un fragmento o variante funcional de la misma, para su uso como medicamento.

41. Un procedimiento para modular la actividad enzimática de una enzima, en el que dicha enzima interacciona con BMP (bis(monoacilglicero)fosfato), comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

i) administrar el agente bioactivo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39;

- ii) permitir la interacción entre BMP y Hsp70, y

- iii) modular la actividad enzimática de una enzima que interacciona con BMP.

42. El procedimiento de acuerdo con el punto 41, en el que dicha Hsp70 forma un complejo covalente o no covalente con BMP.

43. El procedimiento de acuerdo con el punto 41, en el que BMP interacciona con una saposina.

44. El procedimiento de acuerdo con el punto 43, en el que dicha saposina se selecciona del grupo que consiste en saposina A, saposina B, saposina C, y saposina D.

45. El procedimiento de acuerdo con el punto 41, en el que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en esfingomielinasa, esfingomielinasa ácida (aSMasa), ceramidasa ácida, beta-galactosilceramidasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucosilceramidasa, sialidasa y arilsulfatasa.

46. El procedimiento de acuerdo con el punto 41, en el que la modulación de la actividad enzimática es un incremento en la actividad enzimática.

47. El procedimiento de acuerdo con el punto 46, en el que dicho incremento en la actividad enzimática es un incremento en el intervalo del 1 al 5 %, tal como en el intervalo del 5 al 10 %, por ejemplo, en el intervalo del 10 al 15 %, tal como en el intervalo del 15 al 20 %, por ejemplo, en el intervalo del 20 al 25 %, tal como en el intervalo del 25 al 30 %, por ejemplo, en el intervalo del 30 al 35 %, tal como en el intervalo del 35 al 40 %, por ejemplo, en el intervalo del 40 al 45 %, tal como en el intervalo del 45 al 50 %, por ejemplo, en el intervalo del 50 al 60 %, tal como en el intervalo del 60 al 70 %, por ejemplo, en el intervalo del 70 al 80 %, tal como en el intervalo del 80 al 90 %, por ejemplo, en el intervalo de 90 al 100 %, tal como en el intervalo del 100 al 120 %, por ejemplo, en el intervalo del 120 al 140 %, tal como en el intervalo del 140 al 160 %, por ejemplo, en el intervalo del 160 al 180 %, tal como en el intervalo del 180 al 200 %, por ejemplo, en el intervalo del 200 al 250 %, tal como en el intervalo del 250 al 300 %.

por ejemplo, en el intervalo del 300 al 400 %, tal como en el intervalo del 400 al 500 %, por ejemplo, en el intervalo del 500 al 750 %, tal como en el intervalo del 750 al 1000 %, por ejemplo, en el intervalo del 1000 al 1500 %, tal como en el intervalo del 1500 al 2000 %, por ejemplo, en el intervalo del 2000 al 5000 %.

48. Un procedimiento para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende la administración del agente bioactivo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39 a un individuo que lo necesita.

49. El procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho tratamiento es profiláctico, curativo o de mejora.

50. El procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho tratamiento prolonga la esperanza de vida de dicho individuo que lo necesita.

51. El procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicha la esperanza de vida se incrementa en entre 6 meses y 1 año, tal como de 1 año a 2 años, por ejemplo, de 2 a 3 años, tal como de 3 a 4 años, por ejemplo, de 4 a 5 años, tal como de 5 a 6 años, por ejemplo, de 6 a 7 años, tal como de 7 a 8 años, por ejemplo, de 8 a 9 años, tal como de 9 a 10 años, por ejemplo, de 10 a 12 años, tal como de 12 a 14 años, por ejemplo, de 14 a 16 años, tal como de 16 a 18 años, por ejemplo, de 18 a 20 años, tal como de 20 a 25 años, por ejemplo, de 25 a 30 años, tal como de 30 a 40 años, por ejemplo, de 40 a 50 años, tal como de 50 a 60 años, por ejemplo, de 60 a 70 años, tal como de 70 a 80 años, por ejemplo, de 80 a 90 años, tal como de 90 a 100 años.

52. El procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en Niemann-Pick, Farber, Krabbe, Fabry, Gaucher, sialidosis, leucodistrofia metacromática y deficiencia de saposina.

53. El procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicha enfermedad lisosómica está caracterizada por un incremento en la acumulación intracelular de un esfingolípido.

54. El procedimiento de acuerdo con el punto 53, en el que el tratamiento reduce la acumulación intracelular de un esfingolípido por al menos el 5 %, tal como al menos el 10 %, por ejemplo, al menos el 15 %, tal como al menos el 20 %, por ejemplo, al menos el 25 %, tal como al menos el 30 %, por ejemplo, al menos el 35 %, tal como al menos el 40 %, por ejemplo, al menos el 45 %, tal como al menos el 50 %, por ejemplo, al menos el 55 %, tal como al menos el 60 %, por ejemplo, al menos el 65 %, tal como al menos el 70 %, por ejemplo, al menos el 75 %, tal como al menos el 80 %, por ejemplo, al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, tal como al menos el 100 %.

55. El procedimiento de acuerdo con el punto 54, en el que dicho esfingolípido se selecciona del grupo que consiste en esfingomielina, ceramida, galactosilceramida, globotriaosilceramida, glucosilceramida, GM3 y sulfatida.

56. El procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho agente bioactivo se formula como una composición farmacéutica.

57. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1 o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Niemann-Pick de tipo A o de tipo B.

58. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Farber.

59. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Krabbe.

60. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es sialidosis.

61. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es leucodistrofia metacromática.

62. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Gaucher.

63. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es la enfermedad de Fabry.

64. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es deficiencia de saposina.

65. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico está caracterizada por tener una actividad enzimática residual de la enzima defectuosa implicada en la patología de la enfermedad.

66. El agente bioactivo de acuerdo con el punto 1, o el procedimiento de acuerdo con el punto 48, en el que dicha actividad enzimática residual está en el intervalo de desde el 0,1 % al 50 %, tal como en el intervalo del 0,1 al 1 %, por ejemplo, del 1 al 2 %, tal como del 2 al 3 %, por ejemplo, del 3 al 4 %, tal como del 4 al 5 %, por ejemplo, del 5 al 6 %, tal como del 6 al 7 %, por ejemplo, del 7 al 8 %, tal como del 8 al 9 %, por ejemplo, del 9 al 10 %, tal como del 10 al 11 %, por ejemplo, del 11 al 12 %, tal como del 12 al 13 %, por ejemplo, del 13 al 14 %, tal como del 14 al 15 %, por ejemplo, del 15 al 20 %, tal como del 20 al 25 %, por ejemplo, del 25 al 30 %, tal como del 30 al 35 %, por ejemplo, del 35 al 40 %, tal como del 40 al 45 %, por ejemplo en el intervalo del 45 al 50 % de la actividad enzimática residual.

67. Un procedimiento de tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico que comprende administrar el agente bioactivo de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39 en combinación con al menos otra modalidad de tratamiento.

68. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es una modalidad de tratamiento convencional o conocida para una enfermedad de almacenamiento lisosómico.

69. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento

se administra simultánea o secuencialmente.

70. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es un tratamiento de restitución de enzimas (ERT).
- 5 71. El procedimiento de acuerdo con el punto 70, en el que dicho ERT se selecciona del grupo que consiste en Cerezyme® (imiglucerasa para inyección), Miglustat, Fabrazyme® (agalsidasa beta) y Replagal (Agalsidasa alfa).
72. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicho agente bioactivo se administra a un individuo con la enfermedad de Gaucher en combinación con Cerezyme® (imiglucerasa para inyección) o Miglustat.
73. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicho agente bioactivo se administra a un individuo con la enfermedad de Fabry en combinación con Fabrazyme® (agalsidasa beta) o Replagal (Agalsidasa alfa).
- 10 74. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es analgésicos.
75. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es corticosteroides.
76. El procedimiento de acuerdo con el punto 56, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es un trasplante.
- 15 77. El procedimiento de acuerdo con el punto 76, en el que dicho trasplante se selecciona del grupo que consiste en trasplante de médula ósea, trasplante de sangre del cordón umbilical o trasplante de células madre.
78. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es tratamiento de reducción de sustrato.
- 20 79. El procedimiento de acuerdo con el punto 67, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento es tratamiento sintomático y de soporte, tal como fisioterapia.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Jensen, Thomas Kirkegaard

Jaattela, Marja Helena

<120> Uso de Hsp70 como regulador de la actividad enzimática

5

<130> P2146 EPO2

<150> PA 2008 00885

<151> 26-06-2008

10

<160> 7

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

15

<210> 1

<211> 641

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

20

<400> 1



Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser
1				5					10					15	
Cys	Val	Gly	Val	Phe	Gln	His	Gly	Lys	Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp
			20					25					30		
Gln	Gly	Asn	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu
		35					40					45			
Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Asn	Pro	Gln
	50					55					60				
Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp
65					70					75				80	
Pro	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Met	Lys	His	Trp	Pro	Phe	Gln	Val	Ile	Asn
				85					90					95	
Asp	Gly	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys
			100					105					110		
Ala	Phe	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys
		115					120					125			
Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Ala	Val	Ile
	130					135					140				
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp
145					150					155				160	
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro
				165				170					175		
Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu
			180					185					190		
Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser
	195						200					205			
Ile	Leu	Thr	Ile	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly
	210					215					220				
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	Asp	Asn	Arg	Leu	Val	Asn	His
225					230					235				240	
Phe	Val	Glu	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Lys	Lys	Asp	Ile	Ser	Gln	Asn
				245					250					255	
Lys	Arg	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg
			260					265					270		
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe

			275					280				285					
Glu	Gly	Ile	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu		
	290					295					300						
Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Ala		
305				310						315				320			
Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile	His	Asp	Leu	Val	Leu		
			325						330					335			
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp		
			340					345						350			
Phe	Phe	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala		
	355					360						365					
Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Asp	Lys		
	370					375						380					
Ser	Glu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Leu	Ser		
385				390						395				400			
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg		
			405					410						415			
Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Gln	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser		
			420					425					430				
Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala		
	435					440						445					
Met	Thr	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Ile		
	450					455					460						
Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Ile		
465				470						475				480			
Asp	Ala	Asn	Gly	Ile	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly		
			485					490						495			
Lys	Ala	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys		
			500					505						510			
Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Ala	Glu		
	515					520						525					
Asp	Glu	Val	Gln	Arg	Glu	Arg	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Glu	Ser		
	530					535						540					
Tyr	Ala	Phe	Asn	Met	Lys	Ser	Ala	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly		
545				550						555				560			
Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu		
			565						570					575			
Val	Ile	Ser	Trp	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Glu	Phe		
			580					585						590			
Glu	His	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Gln	Val	Cys	Asn	Pro	I				

 $\langle 210 \rangle$  2

<211> 2445

5      <212> ADN

### <213> Homo Sapiens

<400> 2

ataaaagccc aggggcaagc ggtccggata acggctagcc tgaggagctg ctgcgacagt 60  
 ccaactacctt ttctgagagt gactcccggt gtcccaaggc ttccagagc gaacctgtgc 120  
 ggctgcaggc accgggcgcgt cgagtttccg gcgtccggaa ggaccgagct cttctcgcgg 180  
 atccagtggt ccgtttccag cccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcagggaacc 240

```

ggcatggcca aagccgcggc gatcggcac gacctgggca ccacctactc ctgcgtgggg 300
gtgttccaac acggcaaggt ggagatcac gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc 360
agctacgtgg ccttcacgga caccgagcgg ctcatcgggg atgcggccaa gaaccaggtg 420
gcgctgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg caagttcggc 480
gacccggtgg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac 540
aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccc cgaggagatc 600
tcgtccatgg tgctgaccaa gatgaaggag atcgccgagg cgtacctggg ctaccgggtg 660
accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca ggccaccaag 720
gatgcggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgcggatca tcaacgagcc caccggcgcc 780
gccatcgct acggcctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct catctttgac 840
ctggggcggg gcaccttcga cgtgtccatc acgacggcat cttcgaggtg 900
aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac 960
cacttcgtgg aggagttcaa gaaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc 1020
gtgaggcggc tgcgcaccgc ctgagagagg gccaaagaga ccctgtcgtc cagcaccag 1080
gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcacgact tctacacgtc catcaccagg 1140
gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag 1200
gctctgcgc acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcgggggc 1260
tccacccgga ccccaaggt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgcgacctg 1320
aacaagagca tcaacccgga cgaggtgtg gcctacgggg cggcggtgca ggcgccatc 1380
ctgatggggg acaagtccga gaacgtgcag gacctgctgc tgctggacgt ggctccctg 1440
tcgctggggc tggagacggc cggaggtgtg atgactgccc tgatcaagcg caactccacc 1500
atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgtcg 1560
atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt ggggcgcttc 1620
gagctgagcg gcatccctcc ggcccccagg ggcgtgcccc agatcgaggt gaccttcgac 1680
atcgatgcca acggcatcct gaacgtcacg gccacggaca agagcacgg caaggccaac 1740
aagatcacca tcaccaacga caaggccgc ctgagcaagg aggatcga gcgcattgtg 1800
caggagggcg agaagtacaa agcggaggac gaggtgcagc gcgagagggt gtcagccaag 1860
aacgccttg agtccacgc cttcaacatg aagagcgccg tggaggatga ggggctcaag 1920
ggcaagatca gcgagggcga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga ggtcatctcg 1980
tggttgagc ccaacacctt ggccgagaag gacgagtttg agcacaagag gaaggagctg 2040
gagcaggtgt gtaaccccat catcagcgga ctgtaccagg gtgccggtgg tcccgggcct 2100
gggggcttcg gggctcaggg tcccaaggga gggctggtg caggcccccac cattgaggag 2160
gtagattagg ggcctttcca agattgctgt tttgttttg gagcttcaag actttgcatt 2220
tcctagtatt tctgtttgtc agttctcaat ttctgtgtt tgcaatgttg aaatttttg 2280
gtgaagtact gaacttgctt tttttccggt ttctacatgc agagatgaat ttatactgcc 2340
atcttacgac tatttcttct ttttaataca cttaactcag gccatttttt aagttggtta 2400
cttcaaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaa aaaaaa 2445

```

<210> 3

<211> 641

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

# ES 2 555 908 T3

Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser
1				5					10					15	
Cys	Val	Gly	Val	Phe	Gln	His	Gly	Lys	Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp
			20					25					30		
Gln	Gly	Asn	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu
		35					40					45			
Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Asn	Pro	Gln
	50					55					60				
Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp
65					70					75					80
Pro	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Met	Lys	His	Trp	Pro	Phe	Gln	Val	Ile	Asn
				85					90					95	
Asp	Gly	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys
			100					105					110		
Ala	Phe	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys

Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Ala	Val	Ile	
	130					135					140					
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp	
145					150					155					160	
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro	
				165				170							175	
Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu	
			180					185					190			
Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser	
	195					200					205					
Ile	Leu	Thr	Ile	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly	
	210					215					220					
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	Asp	Asn	Arg	Leu	Val	Asn	His	
225					230					235					240	
Phe	Val	Glu	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Lys	Lys	Asp	Ile	Ser	Gln	Asn	
				245					250					255		
Lys	Arg	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg	
			260					265					270			
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe	
	275					280						285				
Glu	Gly	Ile	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu	
	290					295					300					
Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	
305					310					315					320	
Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile	His	Asp	Leu	Val	Leu	
				325					330					335		
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	
			340					345				350				
Phe	Phe	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	
	355					360					365					
Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	
	370					375					380					
Ser	Glu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Leu	Ser	
385					390					395					400	
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	
				405				410						415		
Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Gln	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	
			420					425					430			
Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala	
	435					440					445					
Met	Thr	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly		

Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser  
 595 600 605  
 Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala  
 610 615 620  
 Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val  
 625 630 635 640  
 Asp

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2551

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 4

```

ggaaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg agggtoogct tcgtctttcg agagtgactc 60
ccgcggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgcggctg caggcaccgg cgtgttgagt 120
ttccggcggtt ccgaaggact gagctcttgt cgcggatccc gtccgcggtt tccagccccc 180
agtctcagag cggagccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc gccgatcggc 240
atcgacctgg gcaccacctc ctctgctggt ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc 300
atcgccaacg accagggcaa ccgcaccacc ccagctacg tggccttcac ggacaccgag 360
cggctcatcg gggatgcggc caagaaccag gtggcgctga accgcagaa caccgtgttt 420
gacgcgaagc ggtgatcg ccgcaagtcc ggcgaccggc tgggtgcagtc ggacatgaag 480
cactggcctt tccaggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagtacaag 540
ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgtcca tgggtctgac caagatgaag 600
agggtcggcg aggcgtacct gggtacctcg gtgaccaacg cggtgatcac cgtgcgggcc 660
tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgcgg gtgtgatcgc ggggctcaac 720
gtgtgcgga tcatcaacga gccacggccc gccgcctcgc cctacggcct ggacagaacg 780
ggcaaggggg agcgaacgt gctcatcttt gacctgggcg ggggcacctt cgacgtgtcc 840
atcctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacctg 900
ggtggggagg actttgacaa caggctggtg aaccacttcg tggaggagt tcaagagaaa 960
cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggctgcgcac cgcctgcgag 1020
agggtccaaga ggacctgtgc gtccagcacc caggccagcc tggagatcga ctccctgttt 1080
gagggcatcg acttctacac gtccatcacc agggcgaggt tcgaggagct gtgtccgac 1140
ctgttccgaa gcacctgga gcccggtggg aaggctctgc gcgacgcaa gctggacaag 1200
gcccagattc acgacctggt cctggctggg ggctccaccc gcatcccaa ggtgcagaag 1260
ctgctgcagg acttcttcaa cggcgcgac ctgaacaaga gcatcaaccc cgacgaggct 1320
gtggcctacg gggcgcggt gcaggcgccc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg 1380
caggacctgc tgctgtcga cgtggctccc ctgtcgtgg ggctggagac ggccggaggc 1440
gtgatgactg ccttgatcaa gcgcaactcc accatcccca ccaagcagac gcagatcttc 1500
accacctact ccgacaacca acccggggtg ctgatccagg tgtacgagg cgagagggcc 1560
atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggccccc 1620
aggggcgtgc cccagatcga ggtgaccttc gacatcgatg ccaacggcat cctgaacgtc 1680
acggccacgg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatca ccatcaccaa cgacaagggc 1740
cgctgagca aggaggagat cgagcgcag gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag 1800
gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacgccc tggagtecta cgccttcaac 1860
atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggcaaga tcagcgaggc ggacaagaag 1920
aaggttctgg acaagtgtca agaggtcatc tcgtggctgg acgccaacac cttggccgag 1980
aaggacgagt ttgagcaca gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaaccc catcatcagc 2040
ggactgtacc aggggtcccg tggccccgg cctggcggtc toggggctca gggtoccaag 2100
ggagggctcg ggtcaggccc taccattgag gagggtgatt aggggccttt gttctttagt 2160
atgtttgtct ttgaggtgga ctgttgggac tcaaggactt tgctgtgtt ttcttatgtc 2220
atcttctgct cagctctttg ctgttctact tctttgtaa gttgtaacct gatggtaatt 2280
agctggcttc attattttt tagtacaacc gatattgttc ttagaattct ttgcatttaa 2340
tgttgatact gtaagggtgt ttcgttccct ttaaataaat caaacctgcc acctctgtta 2400
cgagtttgtt tgttttttt ttttttttt ttttttgctt ggcgaaaaca ctacaaaggc 2460
tgggaatgta tgtttttata atttgtttat ttaaataatga aaaataaaat gttaaacttt 2520
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2551

```

<210> 5

<211> 9

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 5

atgcacggg

10 <210> 6

<211> 9

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

15 <400> 6

cccgtgcat

<210> 7

<211> 25

20 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 7

gccaugacga aagacaacaa ucugu

25

# REIVINDICACIONES

1. Un agente bioactivo capaz de incrementar la concentración intracelular de Hsp70 amplificando la expresión génica de Hsp70, en el que dicho agente bioactivo es un derivado de hidroxilamina, para su uso en el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.
- 5 2. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente bioactivo es capaz de amplificar la expresión génica de Hsp70 con un estrés concomitante.
3. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente bioactivo es una sal farmacéuticamente aceptable de un derivado de hidroxilamina seleccionado del grupo que consiste en bimoclomol, o un análogo estructural del mismo, arimoclomol y BGP-15.
- 10 4. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente bioactivo está en una forma de dosificación que comprende un derivado de hidroxilamina seleccionado del grupo que consiste en bimoclomol, arimoclomol, BRX-220, BRX-345 y BGP-15; tales como cápsulas, comprimidos, troscos, dispersiones, suspensiones, disoluciones, cremas, pomadas, emulsiones, geles, lociones, pastas y aerosoles.
- 15 5. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho agente bioactivo es un derivado de hidroxilamina seleccionado del grupo que consiste en bimoclomol, arimoclomol, BRX-220, BRX-345 y BGP-15, y dicho derivado de hidroxilamina va a administrarse a una dosificación diaria de 1 microgramo a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal.
- 20 6. El agente bioactivo para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho agente bioactivo es un derivado de hidroxilamina seleccionado del grupo que consiste en bimoclomol, arimoclomol, BRX-220, BRX-345 y BGP-15, y dicho derivado de hidroxilamina va a administrarse mediante administración enteral, tal como administración oral, administración intrarrectal y administración mediante un tubo de alimentación gástrico o duodenal.
- 25 7. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Farber, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, sialidosis, leucodistrofia metacromática y deficiencia de saposina.
- 30 8. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicha enfermedad de Niemann-Pick se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Niemann-Pick de tipo A, enfermedad de Niemann-Pick de tipo B, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C y enfermedad de Niemann-Pick de tipo D.
- 35 9. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico es un trastorno de almacenamiento de lípidos, tal como un trastorno de almacenamiento de lípidos seleccionado del grupo que consiste en esfingolipidosis, gangliosidosis y leucodistrofias.
- 40 10. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho trastorno de almacenamiento lisosómico se selecciona del grupo que consiste en mucopolisacaridosis, trastornos de almacenamiento de glucoproteínas y mucopolipidosis.
- 45 11. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente bioactivo se ha de administrar en combinación con al menos una otra modalidad de tratamiento para una enfermedad de almacenamiento lisosómico.
- 50 12. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicha al menos una otra modalidad de tratamiento para una enfermedad de almacenamiento lisosómico es un tratamiento de restitución de enzimas (ERT).
13. El agente bioactivo para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho tratamiento de restitución de enzimas se selecciona del grupo que consiste en imiglucerasa, Miglustat, agalsidasa beta y agalsidasa alfa.
14. El agente bioactivo para su uso según la reivindicación 11, en el que dicho al menos otra modalidad de tratamiento se selecciona del grupo que consiste en terapia de reducción de sustrato; trasplante tal como trasplante de médula ósea, trasplante de sangre del cordón umbilical y trasplante de células madre; corticosteroides; analgésicos; y terapia sintomática y de apoyo tal como fisioterapia.
15. Uso de un agente bioactivo capaz de incrementar la concentración intracelular de Hsp70 amplificando la expresión génica de Hsp70, en el que dicho agente bioactivo es un derivado de hidroxilamina, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico.



Figura 1

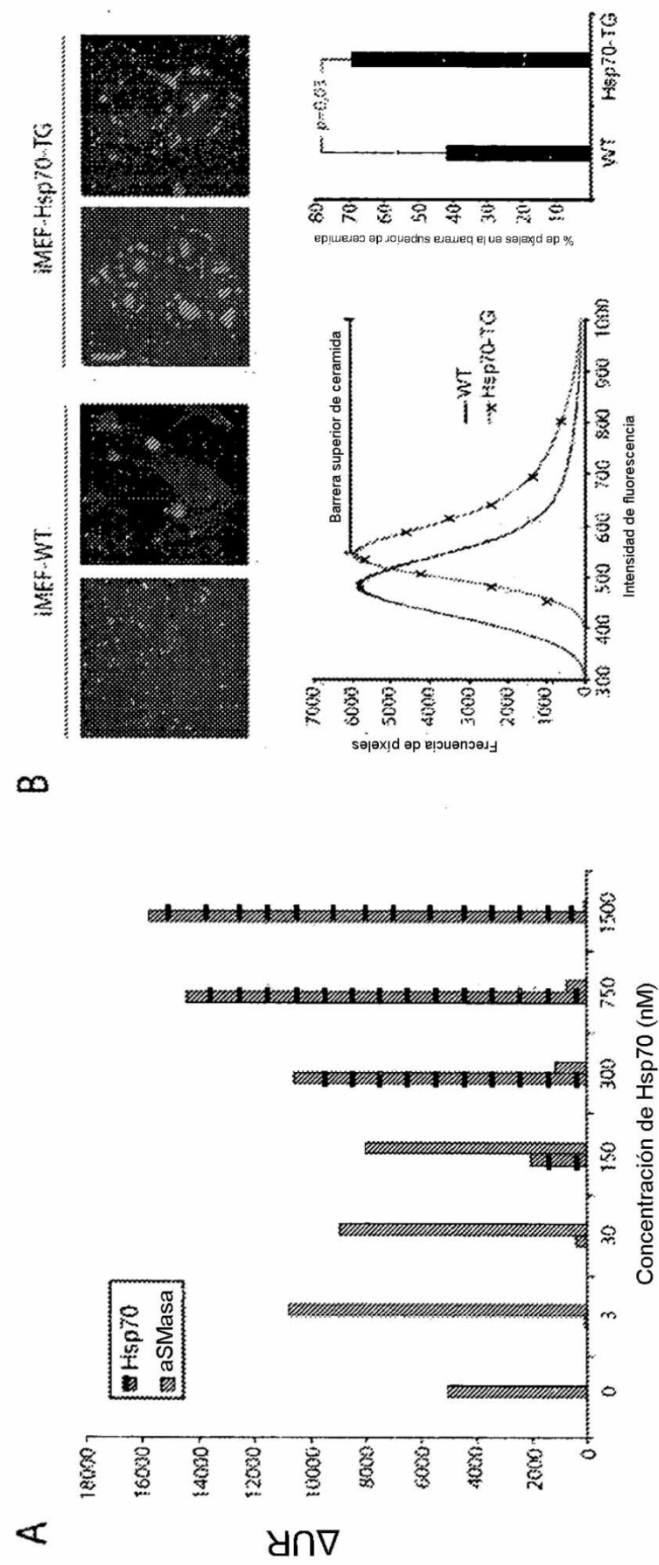


Figura 2

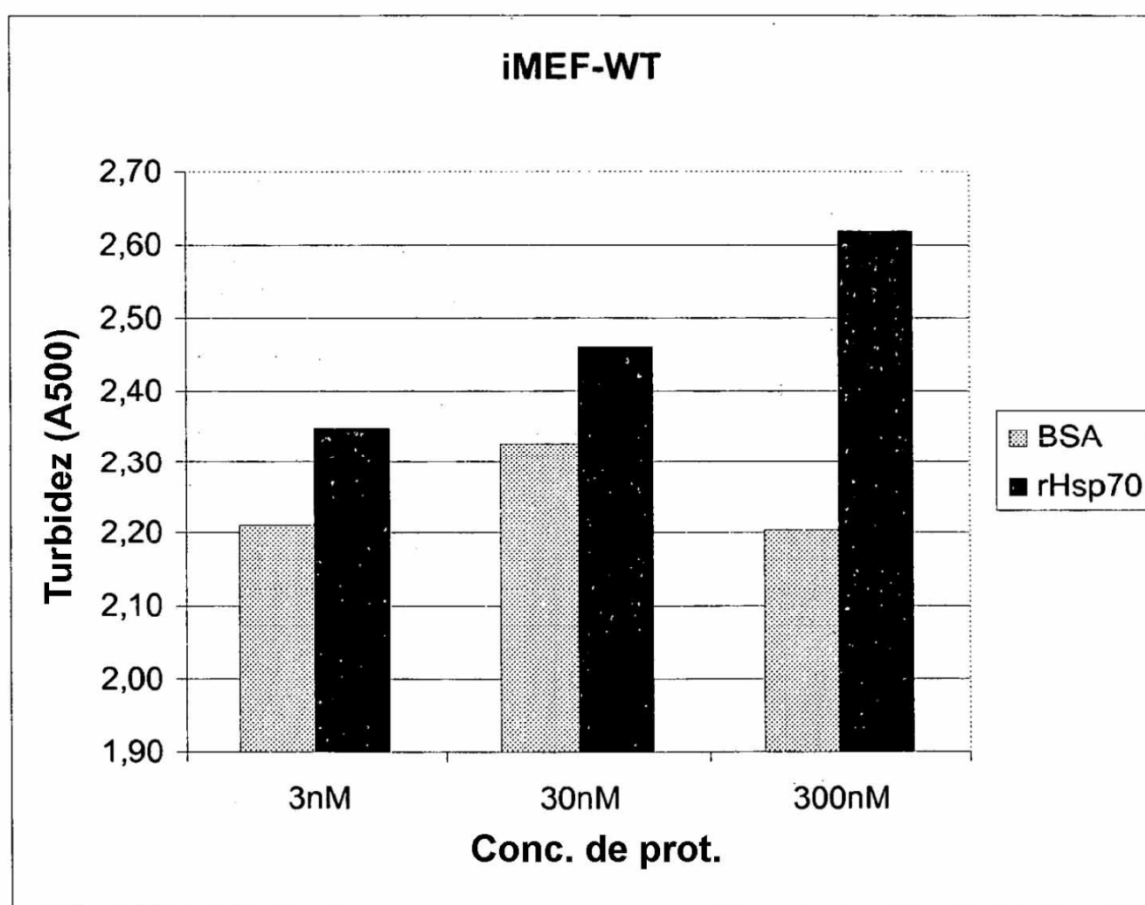
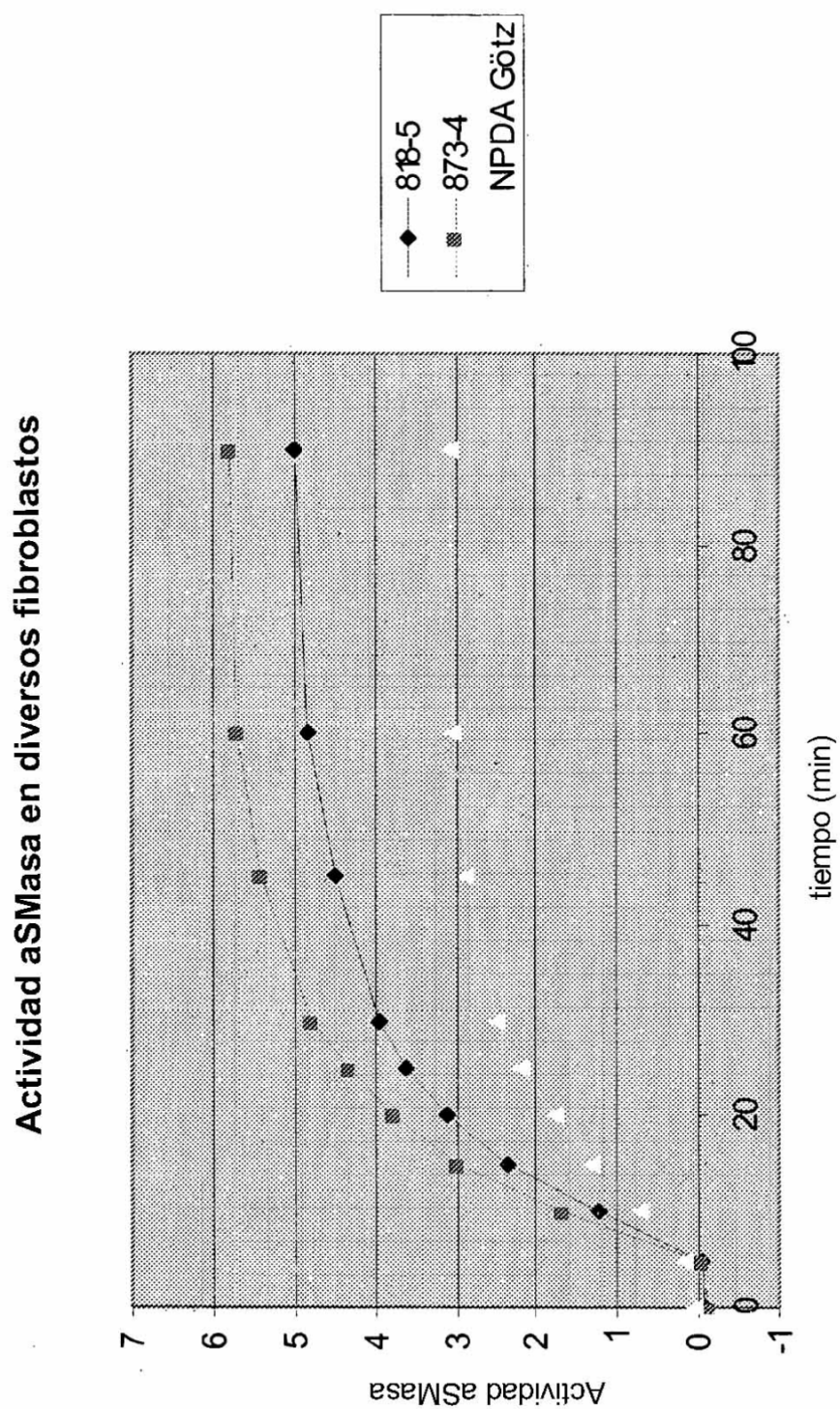


Figura 3



[illegible]

Figura 5

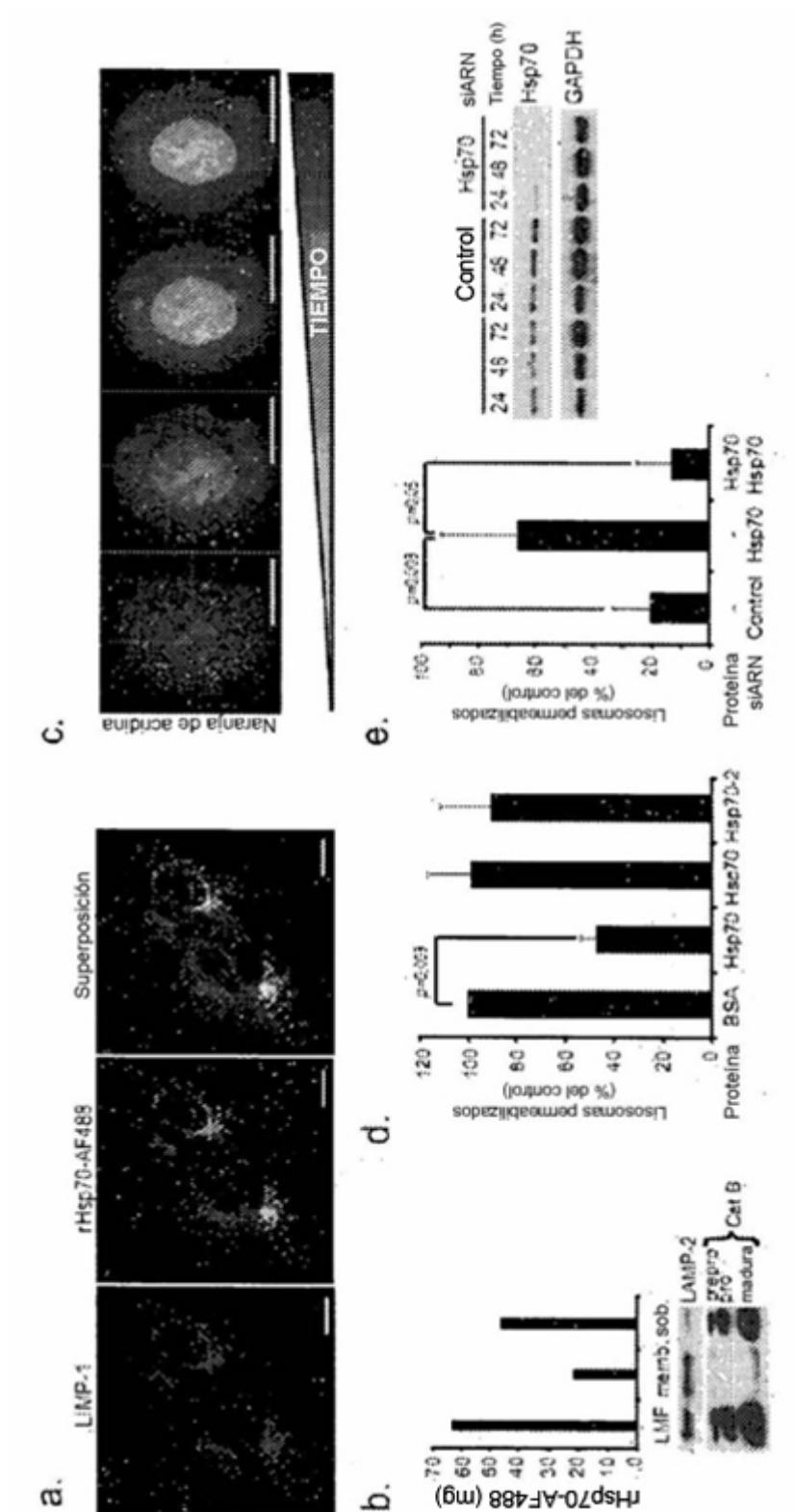


Figura 6

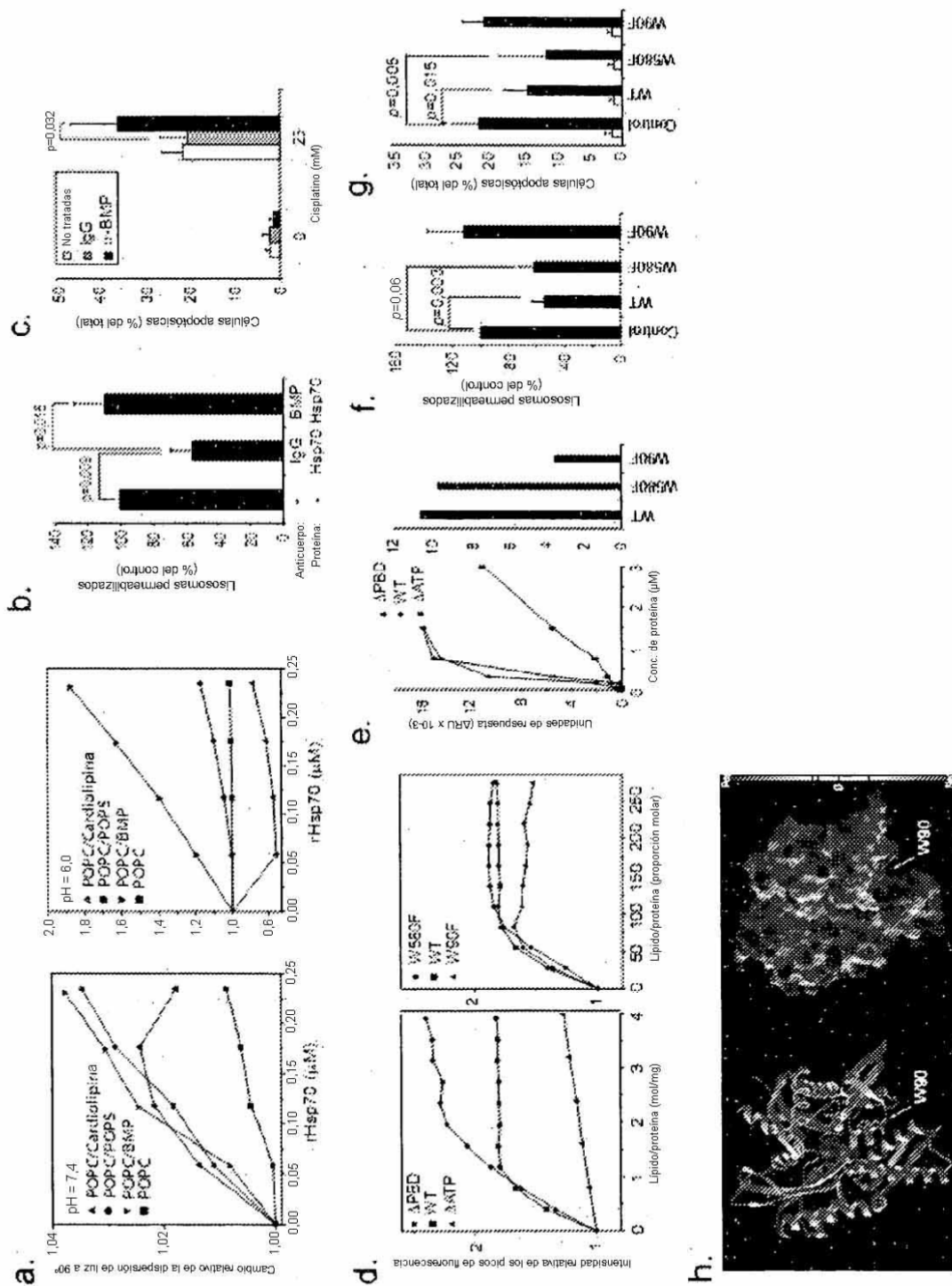


Figura 7

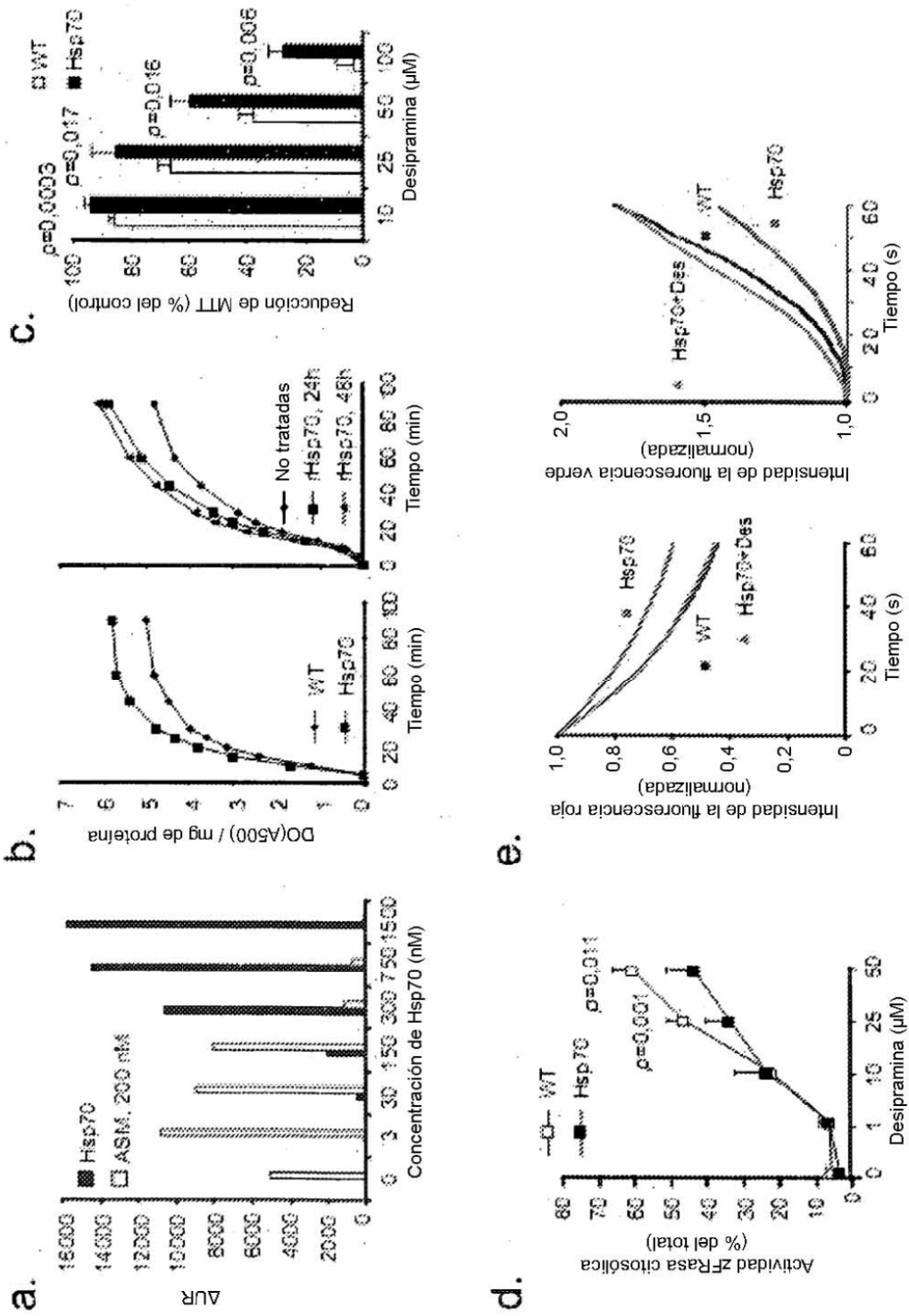


Figura 8

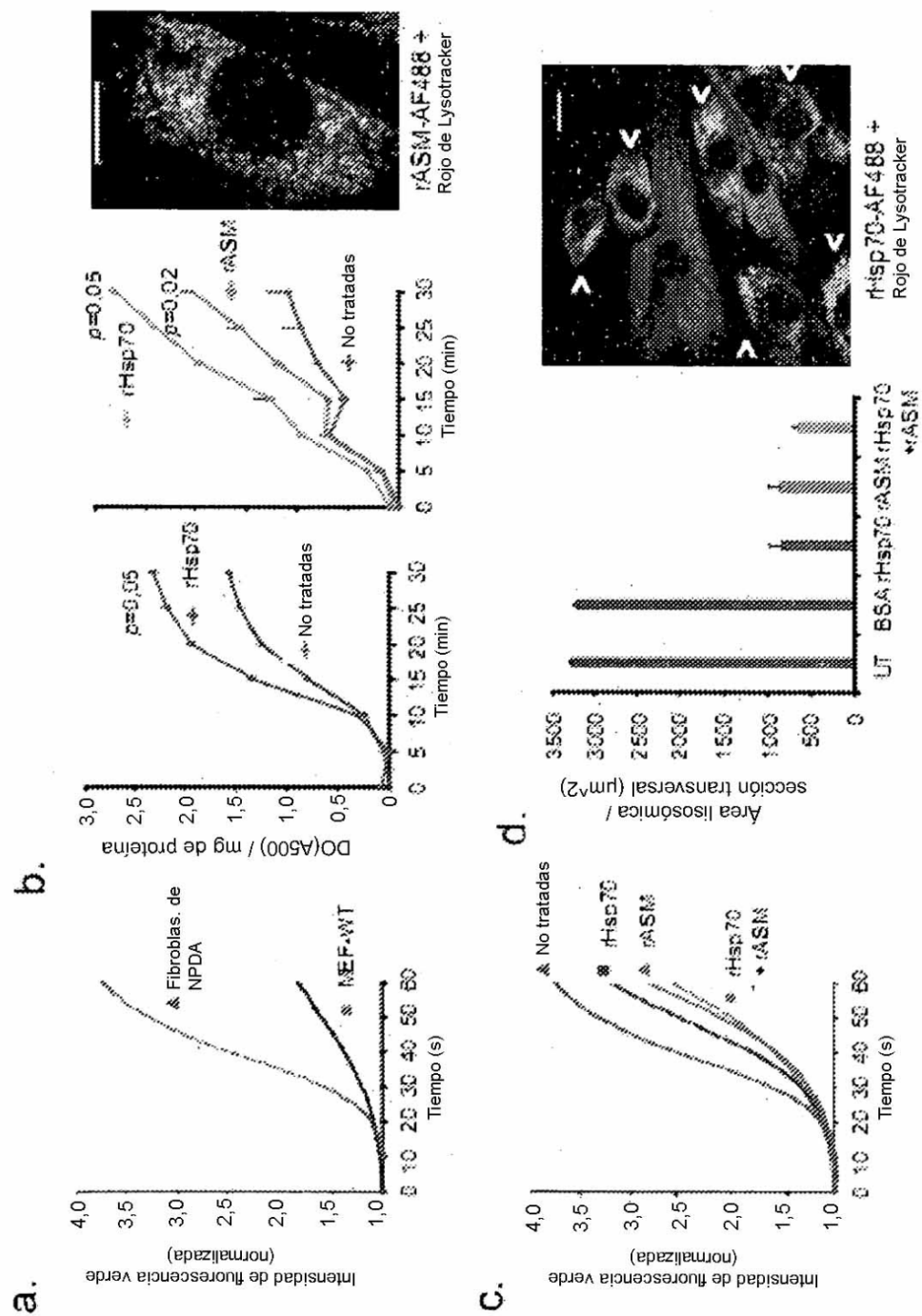




Figura 9

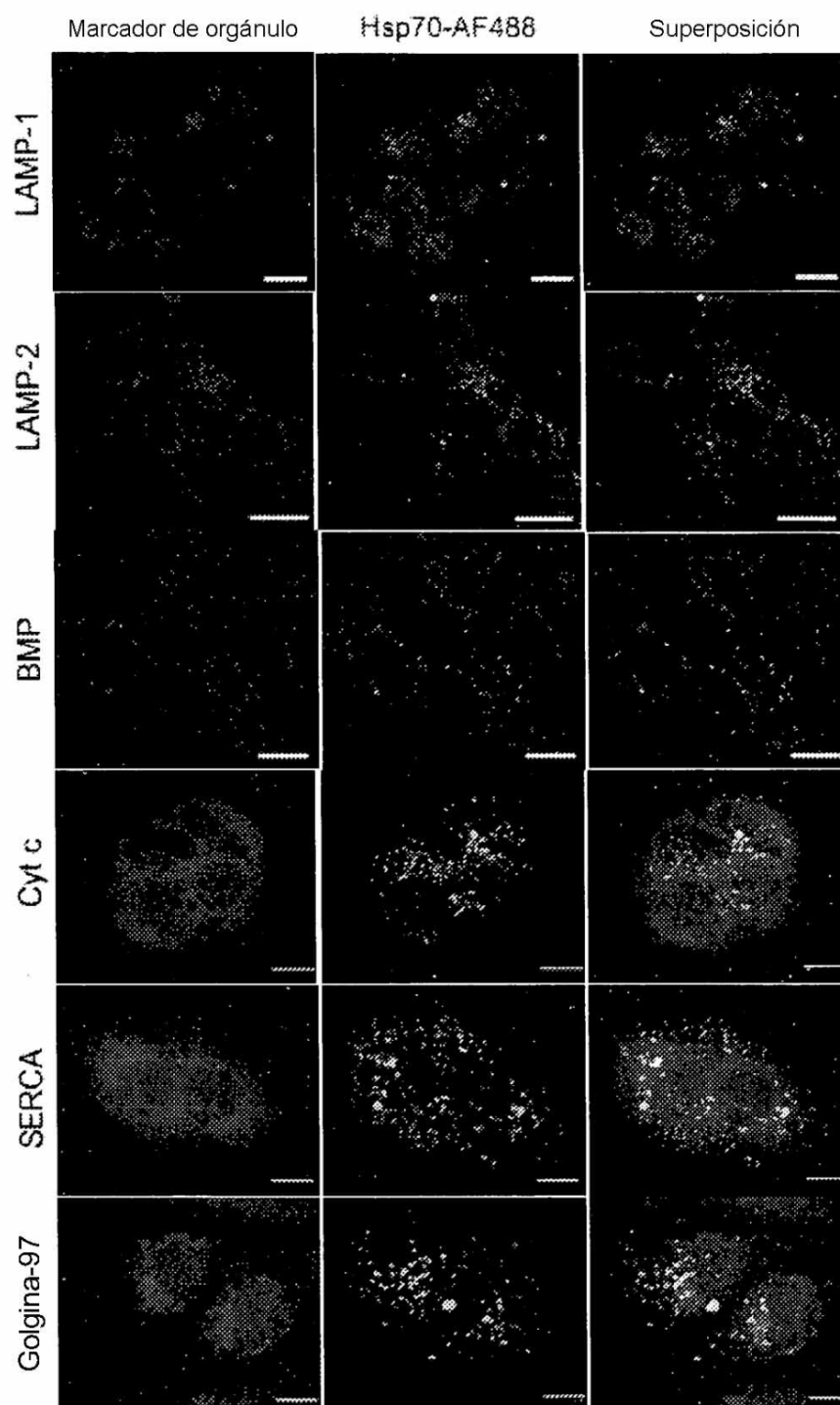


Figura 10

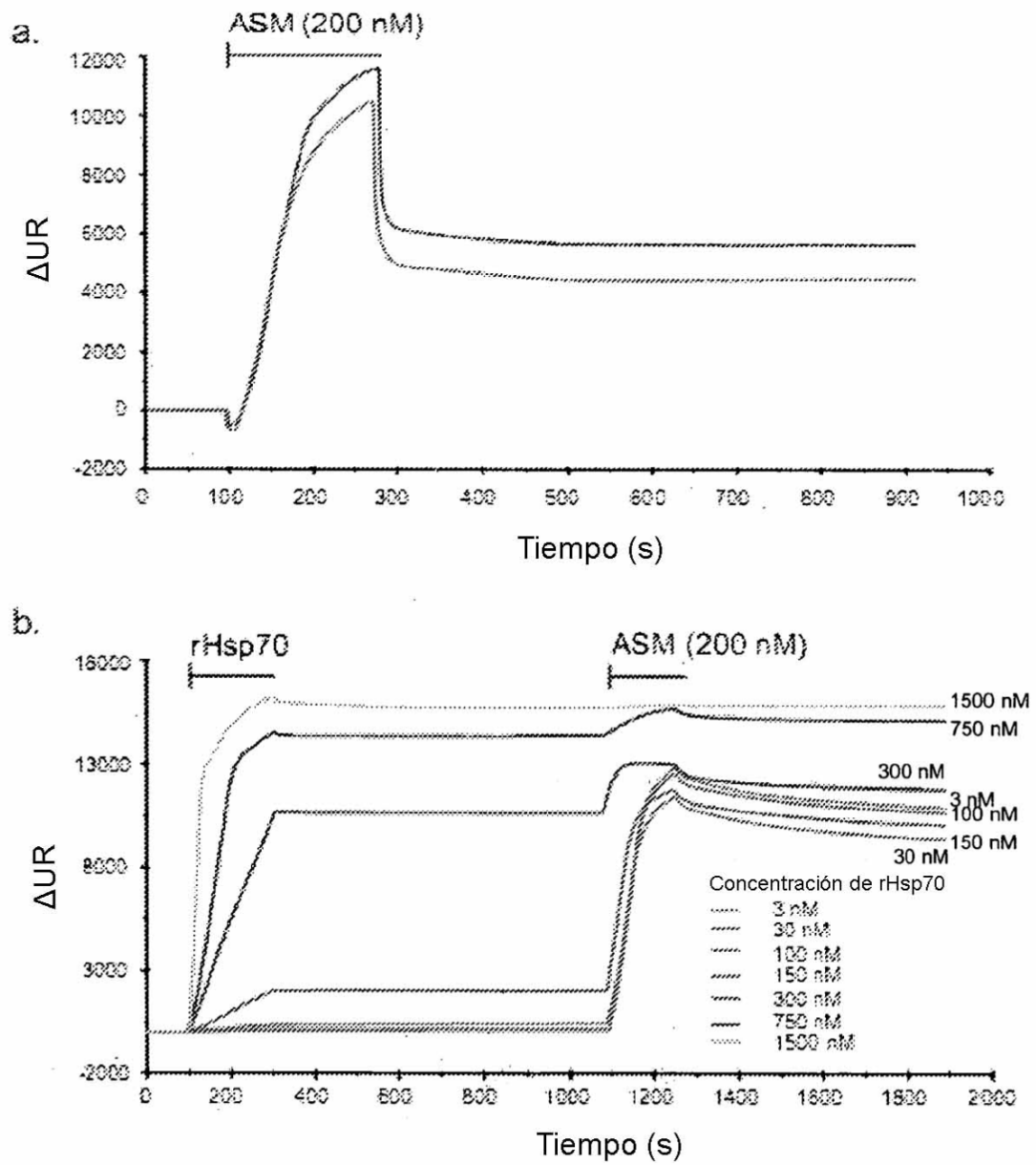


Figura 11

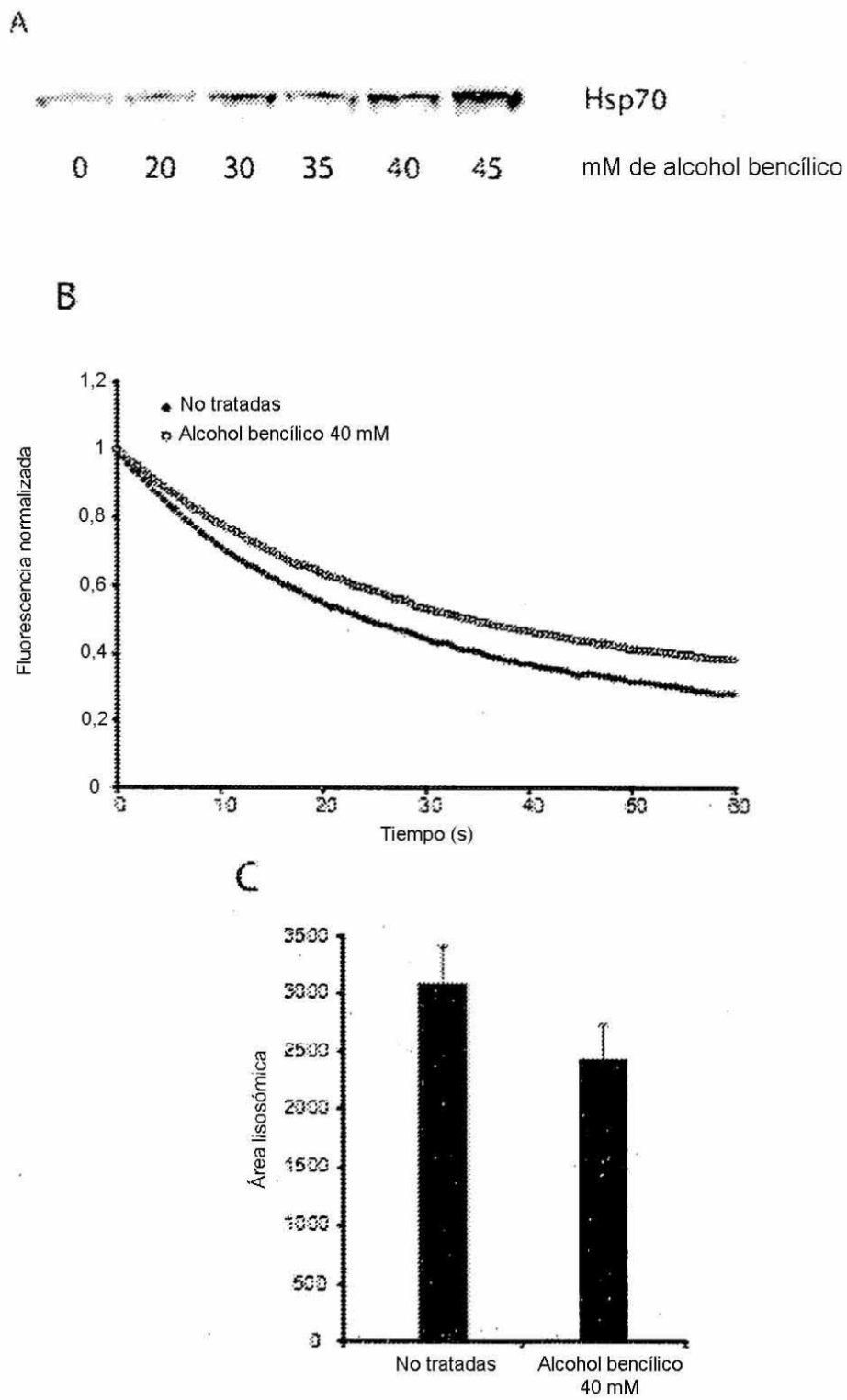


Figura 12

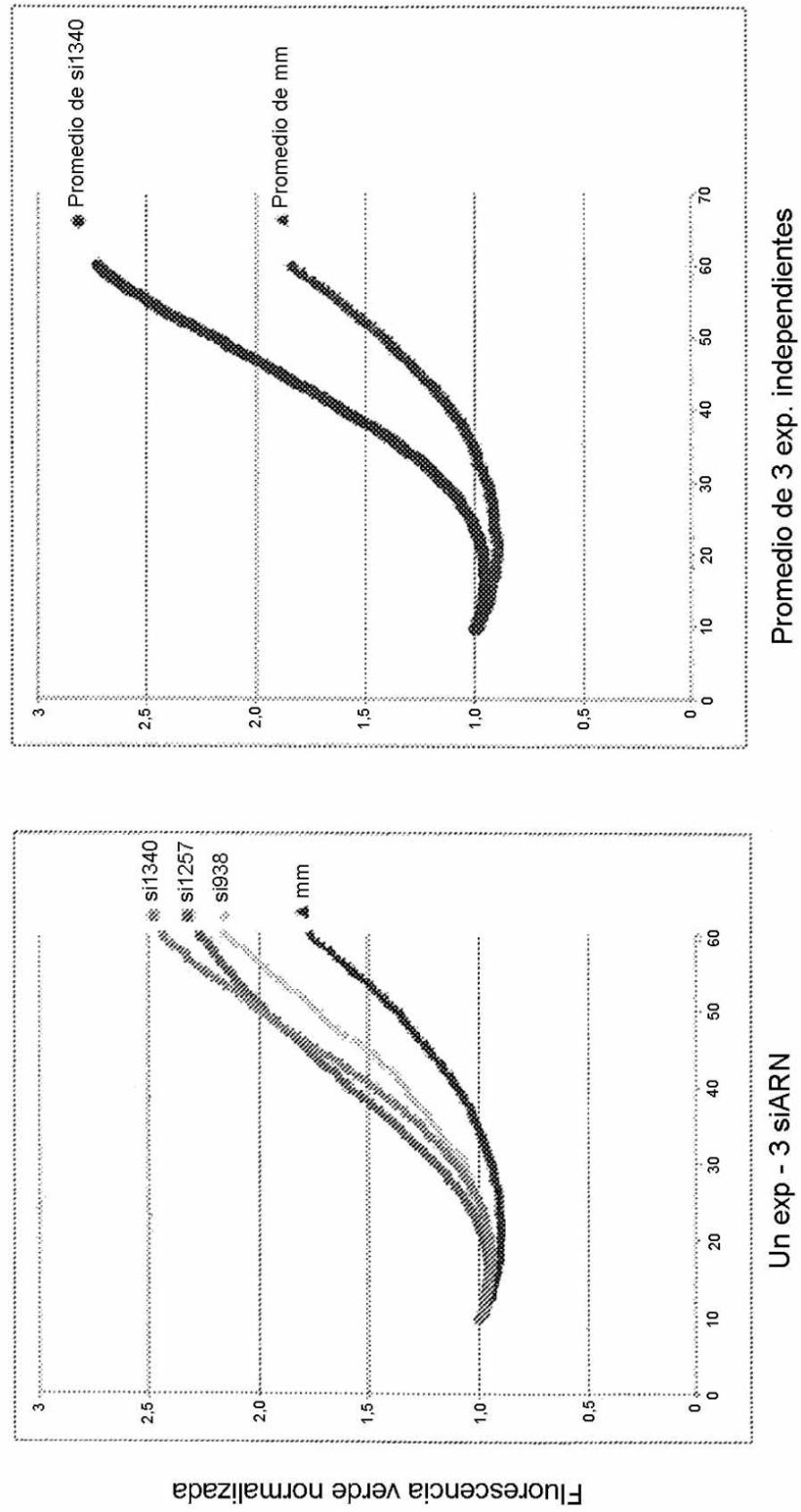


Figura 13

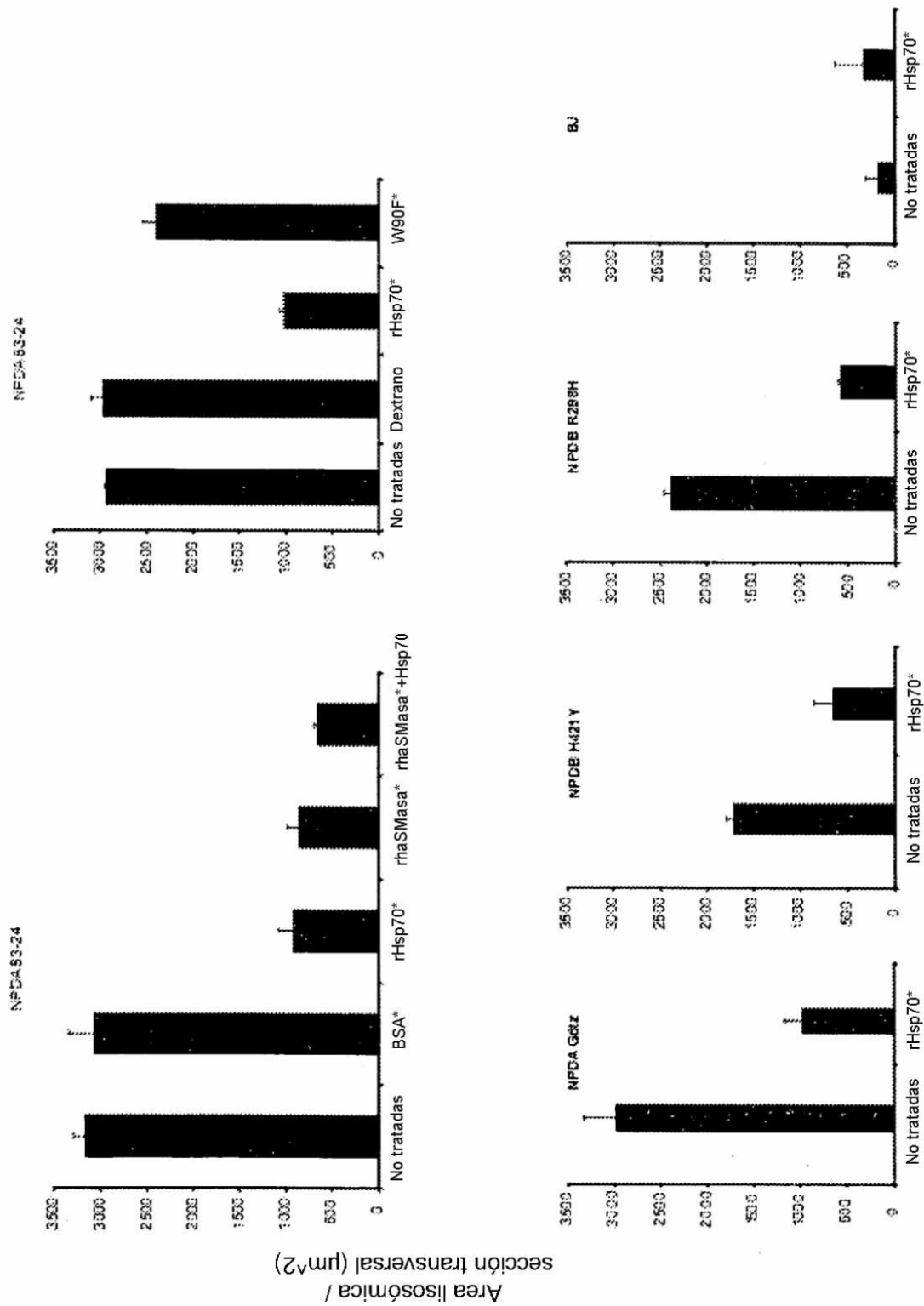


Figura 14

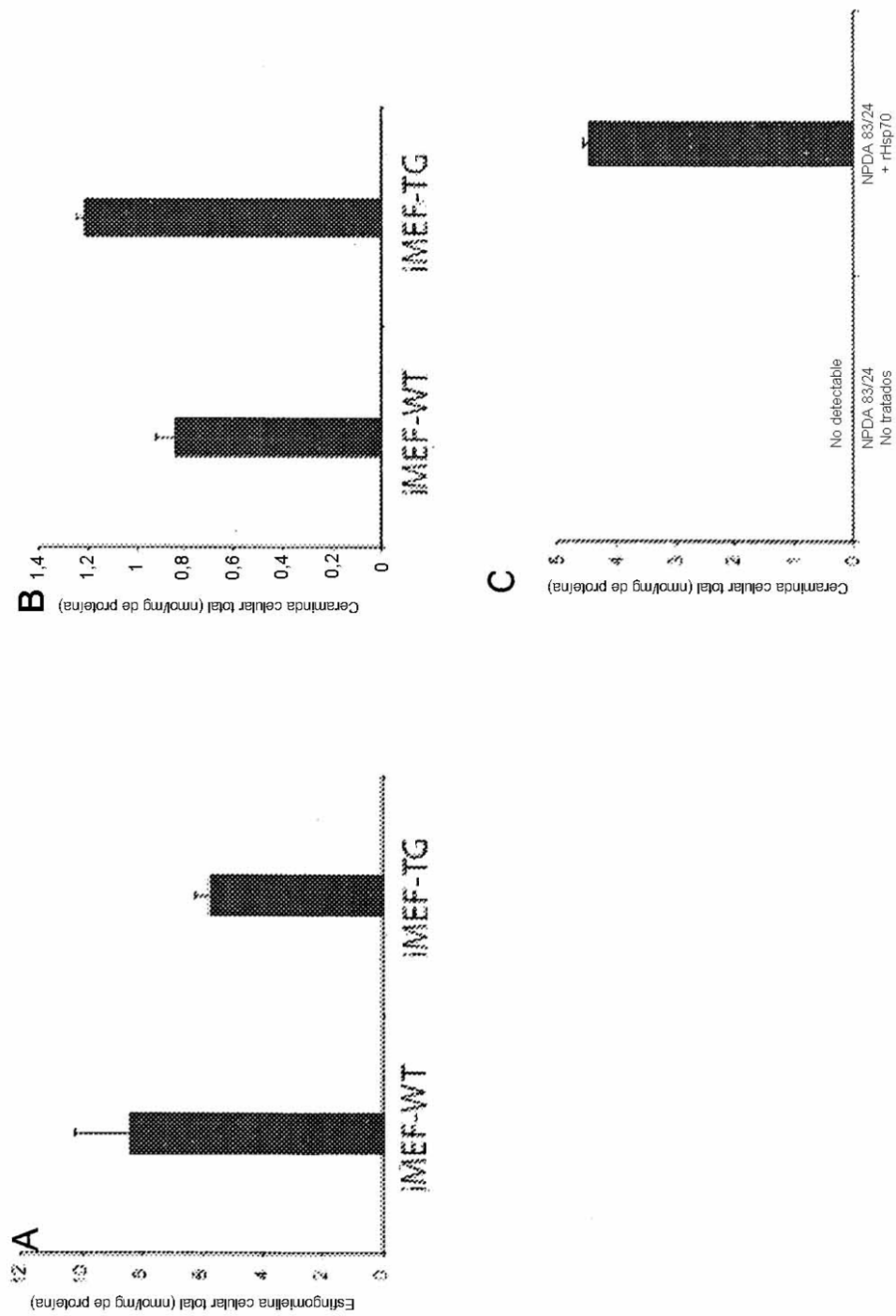


Figura 15

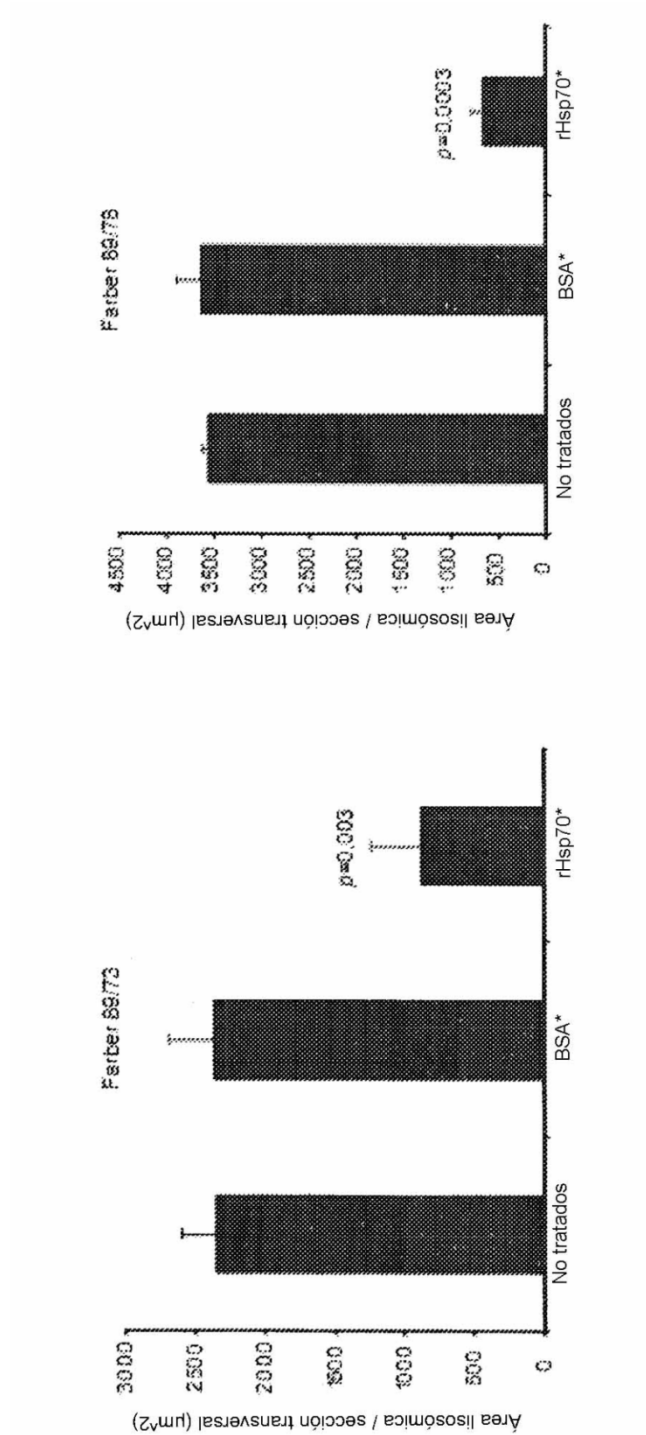


Figura 16

