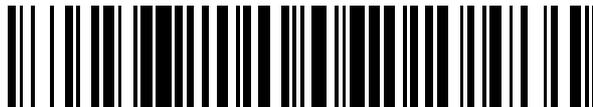


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 859**

51 Int. Cl.:

A01N 43/62 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2008 E 08755799 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2015 EP 2154969**

54 Título: **Tratamiento de sinucleinopatías**

30 Prioridad:

16.05.2007 US 930462 P

03.07.2007 US 929554 P

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

16.02.2016

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 FRANCIS STREET
BOSTON MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**SCHLOSSMACHER, MICHAEL;
CULLEN, VALERIE;
SHIHABUDDIN, LAMYA y
CHENG, SENG H.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 559 859 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de sinucleinopatías

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, al tratamiento de sinucleinopatías que no sean enfermedades relacionadas con el almacenamiento lisosomal en sujetos. Asimismo, se desvelan métodos de detección asociados.

10 **Antecedentes**

La evidencia genética, neuropatológica y bioquímica ha implicado un aumento de la abundancia del estado estacionario, así como el procesamiento aberrante de la α -sinucleína (α S) en el desarrollo de diversos trastornos neurodegenerativos, entre los que se incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy (DLB) y otros trastornos (Dawson *et al.*, (2003) *Science* 302, 819-22; Vila *et al.*, (2004) *Nat Med.*, 10 Supl: S58-62).

La evidencia genética demuestra que las mutaciones puntuales en el gen que codifica la α -sinucleína están relacionadas con una forma grave, principalmente hereditaria, de la EP de aparición temprana (Krueger *et al.*, (1997) *Nat. Genet.*, 18, 106-108; Zarranz *et al.*, (2004) *Ann. Neurol.*, 55(2):164-73; Polymeropoulos *et al.*, (1997) *Science*, 276:2045-7), que implica una patogénesis de "ganancia tóxica de función". Estas mutaciones provocan los siguientes cambios de aminoácidos: alanina 30 \rightarrow prolina (A30P), glutamina 46 \rightarrow lisina (E46K) y alanina 53 \rightarrow treonina (A53T). Por otra parte, la duplicación y la triplicación del gen que codifica la α -sinucleína (SNCA) (no componente A4 del precursor amiloide) se han relacionado con el parkinsonismo familiar de fenotipo de EP/DLB combinado, lo que demuestra que el aumento de las tasas de expresión de incluso el gen de tipo silvestre (WT) puede causar enfermedad (Chartier-Harlin *et al.*, (2004) *Lancet*, 364, 1167-9; Singleton *et al.*, (2003) *Science*, 302, 841). Curiosamente, ciertos polimorfismos de la región promotora del gen SNCA también se han relacionado con un mayor riesgo de EP de inicio tardío, esporádica (Pals *et al.*, (2004) *Ann. Neurol.*, 56, 591-5; Maraganore *et al.*, (2006) *JAMA*, 296, 661-70).

La evidencia neuropatológica indica que las inclusiones intraneuronales denominadas cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy, que representan una de las evidencias patológicas de la EP y la DLB observadas en autopsia, contienen altos niveles de proteína α -sinucleína agregada (Spillantini *et al.*, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 95, 6469-73; Baba *et al.*, (1998) *Am. J. Pathol.*, 152, 879-884). En general, dichos agregados se consideran el resultado de un mal tratamiento celular de la proteína α -sinucleína (posiblemente relacionado con acontecimientos posteriores a la traducción tales como la hiperfosforilación (Anderson *et al.*, (2006), *J. Biol. Chem.*, 281, 29739-29752) y la acumulación intracelular tanto de oligómeros tóxicos solubles como de fibrillas insolubles (Sharon *et al.*, (2001), *PNAS*, 98, 9110-9115).

Además, la evidencia bioquímica sugiere que la sobreexpresión de la α -sinucleína en sistemas celulares o animales puede causar estrés celular y/o, finalmente, la muerte a través de varios mecanismos, incluyendo, entre otros, un exceso de la concentración de dopamina y la generación de especies de oxígeno reactivo (Tabner *et al.*, (2002), *Free Radic. Biol. Med.*, 32(11):1076-83; Fahn *et al.*, (1992), *Ann. Neurol.*, 32, 804-12), así como la disfunción mitocondrial (Lee (2003), *Antioxid. Redox Signal*, 5:337-48; Hashimoto *et al.*, (2003), *Neuromolecular Med.*, 4(1-2):21-36). La solicitud de patente PCT publicada WO 07084737 desvela el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosomal que tienen repercusiones en el sistema nervioso central con enzimas lisosomales.

La técnica anterior incluye PNAS, vol. 101, 2004, 17510-17515 (Lo Bianco *et al.*). Dicha publicación desvela que la administración mediada por vector lentiviral de la proteína Parkin (una ligasa de ubiquitina E3) redujo la neuropatología asociada a una forma mutada de la α -sinucleína en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson.

Sumario

La invención se refiere a lo siguiente:

- 55 1. Uso de uno o ambos de:
- un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y
 un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA), en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con una sinucleinopatía, pero no una enfermedad relacionada con el almacenamiento lisosomal, diagnosticada clínicamente, en el que el polipéptido o el polinucleótido se administra en una cantidad eficaz para reducir un nivel de α -sinucleína en el sistema nervioso central o periférico, o en ambos, de un sujeto, o en el compartimiento lisosomal de un sujeto.
- 65 2. El uso del punto 1, en el que la sinucleinopatía es una sinucleinopatía primaria.

3. El uso del punto 2, en el que la sinucleinopatía comprende una o más de:

enfermedad de Parkinson (EP), demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB); insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de α -sinucleína; atrofia multisistémica (MSA); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro cerebral; y enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada.

4. El uso del punto 1, en el que la sinucleinopatía es una sinucleinopatía secundaria.

5. El uso del punto 4, en el que la sinucleinopatía comprende una o más de:

enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; parálisis supranuclear progresiva; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas; parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático.

6. El uso del punto 1 que comprende además la administración de uno o más agentes que potencian la autofagia de los complejos de α -sinucleína, o un polipéptido que potencia el procesamiento degradativo de los complejos de α -sinucleína en los lisosomas.

7. El uso del punto 6, en el que el agente comprende un inhibidor de mTOR.

8. El uso del punto 6, en el que el agente comprende rapamicina o un análogo de rapamicina.

9. El uso del punto 6, en el que el agente comprende uno o más de everolimus, ciclosporina, FK506, hsc70, *N*-octil-4-epi- β -valienamina y glicerol.

10. El uso del punto 6, en el que el agente comprende una molécula pequeña, una molécula grande, un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico o un fragmento biológicamente activo del mismo.

11. Uno o ambos de entre:

un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA), para su uso en un método de tratamiento de una sinucleinopatía que no es una enfermedad de almacenamiento lisosomal diagnosticada clínicamente.

12. Uso de uno o ambos de:

un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA), en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con uno o más de los siguientes: enfermedad de Parkinson (EP), demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB); insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de α -sinucleína; atrofia multisistémica (MSA); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro cerebral; enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada; enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas; parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático; en el que el polipéptido o el polinucleótido se administra en una cantidad eficaz para reducir el nivel de α -sinucleína en el sistema nervioso central o periférico, o en ambos, de un sujeto, o en el compartimiento lisosomal de un sujeto.

13. Uno o ambos de:

un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP), demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB); insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de α -sinucleína; atrofia multisistémica (MSA); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro cerebral; enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada; enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen

de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas; parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático.

La divulgación se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que determinados agentes, entre los que se incluyen los polipéptidos de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y miembros seleccionados de la familia de proteasas de las catepsinas (por ejemplo, la catepsina D), pueden reducir los niveles intracelulares de α -sinucleína (α S) de los elementos del sistema nervioso central y/o periférico. Como resultado de ello, la divulgación incluye, entre otros, nuevos métodos de tratamiento de las sinucleinopatías, por ejemplo, las sinucleinopatías primarias, en sujetos sin un trastorno de almacenamiento lisosomal clásico conocido, por ejemplo, mediante la administración de un polipéptido de enzima lisosomal de tipo no proteasa, por ejemplo, una enzima metabolizante de lípidos, tal como un polipéptido de GBA, o una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de GBA, o agentes que activen la actividad GBA, o una enzima lisosomal de tipo proteasa que tenga actividad reductora de la α -sinucleína (actividad "sinucleinasa").

En general, las enzimas lisosomales de tipo proteasa pertenecen a las categorías de las aspartil proteasas (tales como una catepsina D o catepsina E) y las cisteinil proteasas (por ejemplo, la catepsina F y la catepsina L). Por lo tanto, la invención también incluye, entre otros, nuevos métodos de tratamiento de sinucleinopatías con enzimas lisosomales de tipo proteasa, así como polipéptidos de procatepsina D, E, F y L, o moléculas de ácido nucleico que codifican la catepsina D, E, F o L, o las que codifican sus formas de polipéptido pro-proteico y pre-proteico.

Además, se pueden administrar enzimas no proteasas, por ejemplo, polipéptidos de GBA, o enzimas proteasas tales como polipéptidos de catepsina D, junto con agentes que mejoren o induzcan la autofagia, tales como rapamicina o análogos de rapamicina.

Por otra parte, dados los papeles fundamentales que la prosaposina (PS) y sus derivados, la saposina A (SA), la saposina B (SB), la saposina C (SC) y la saposina D (SD) desempeñan como cofactores en la actividad de GBA *in vivo*, otros métodos terapéuticos incluyen la administración de polipéptidos de GBA junto con polipéptidos activadores de GBA, tales como polipéptidos de PS y/o polipéptidos de SC; o la administración de polipéptidos de PS y/o polipéptidos de SC solos (para activar o potenciar el GBA endógeno) con el fin de facilitar una reducción de los niveles de proteína en estado estacionario de la α -sinucleína *in vivo*.

En general, la divulgación presenta métodos de tratamiento de sujetos, por ejemplo, seres humanos o animales tales como animales domesticados, por ejemplo, perros, gatos, caballos, cabras, vacas y cerdos, con una sinucleinopatía, por ejemplo, una sinucleinopatía primaria o secundaria, pero no una enfermedad de depósito lisosomal clínicamente diagnosticada o clínicamente diagnosticable. Dichos métodos incluyen administrar a un sujeto uno cualquiera o más de entre: un polipéptido de enzima lisosomal (por ejemplo, un polipéptido de tipo no proteasa tal como GBA o un polipéptido de enzima de tipo proteasa tal como la catepsina D), un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos de enzima lisosomal, un agente activador de enzima lisosomal y un polinucleótido que codifica un agente activador de enzima lisosomal, en una cantidad eficaz para reducir un nivel de α -sinucleína en el sistema nervioso central o periférico del sujeto, o en ambos, o en el compartimiento lisosomal del sujeto.

La sinucleinopatía puede ser una cualquiera o más de entre: la enfermedad de Parkinson (EP); demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB); insuficiencia autonómica pura (PAF) con la deposición de sinucleína; atrofia multisistémica (MSA); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro en el cerebro; enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada. En otros aspectos, la sinucleinopatía puede ser una cualquiera o más de entre: enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; parálisis supranuclear progresiva; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas; parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático.

En dichos métodos, la enzima lisosomal de tipo proteasa puede ser un polipéptido de aspartil proteasa tal como un polipéptido de catepsina D, un polipéptido de procatepsina D, un polipéptido de catepsina E y un polipéptido de procatepsina E, o polipéptido de cisteinil proteasa tal como polipéptido de catepsina F, polipéptido de procatepsina F, polipéptido de catepsina L y polipéptido de procatepsina L.

En ciertos aspectos, el agente de activación de enzima lisosomal es o incluye un agente de activación del polipéptido de GBA, tal como isofagomina (IFG), o polipéptido de activación tal como uno cualquiera o más de un polipéptido de prosaposina, un polipéptido de saposina A, un polipéptido de saposina B, un polipéptido de saposina C y un polipéptido de saposina D. Como es evidente, también se puede usar un polinucleótido que codifique uno

cualquiera o más de entre un polipéptido de prosaposina, un polipéptido de saposina A, un polipéptido de saposina B, un polipéptido de saposina C y un polipéptido de saposina D.

5 En otro aspecto, la divulgación presenta métodos de tratamiento de sinucleinopatías, como se describe en el presente documento, y mediante la administración adicional de uno o más agentes que mejoran la autofagia de la α -sinucleína. Por ejemplo, el agente puede ser o incluir un inhibidor de mTOR, la rapamicina, un análogo de rapamicina, everolimus, ciclosporina, FK506, HSC70, N-octil-4-epi- β -valienamina o glicerol.

10 En los métodos descritos en el presente documento, los agentes pueden ser una molécula pequeña, una molécula grande, un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico o un fragmento biológicamente activo del mismo.

15 En otro aspecto, la divulgación incluye el uso de uno cualquiera o más de entre un polipéptido de enzima lisosomal, un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos de enzima lisosomal, un agente de activación de enzima lisosomal y un polinucleótido que codifica un agente de activación de enzima lisosomal, como se describe en el presente documento, en métodos de preparación de medicamentos para el tratamiento de una sinucleinopatía, usando métodos bien de fabricación conocidos.

20 Por "polipéptido" se entiende cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o la modificación posterior a la traducción (por ejemplo, glucosilación o fosforilación) y, por lo tanto, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

25 Por "polipéptido sustancialmente puro" se entiende un polipéptido que se ha separado de los componentes que lo acompañan *in vivo*. Un polipéptido es sustancialmente puro cuando está al menos un 60 %, en peso, exento de las proteínas y moléculas orgánicas de origen natural con las que se asocia de manera natural. Preferentemente, la preparación es al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 90 % y lo más preferentemente al menos un 99 %, en peso, del polipéptido deseado.

30 Un "polipéptido de GBA" es cualquier proteína o polipéptido de GBA que tiene al menos un 50 por ciento de la actividad biológica del GBA de tipo silvestre correspondiente en la reducción de un nivel de α S en un modelo de células dopaminérgicas como se describe en el presente documento.

35 Un "polipéptido de catepsina", tal como un polipéptido de catepsina D, es cualquier proteína o polipéptido de catepsina que tiene al menos un 50 por ciento de la actividad biológica de la correspondiente catepsina de tipo silvestre en la reducción de un nivel de α S en un modelo de células dopaminérgicas como se describe en el presente documento.

40 Una proteína o un polipéptido " α -sinucleína" (α S o proteína α S), como se usa en el presente documento, incluye una sola proteína monomérica o un polipéptido, así como dichas proteínas y polipéptidos α S en forma de oligómeros, por ejemplo, en forma de dímeros o trímeros, o en forma de complejos asociados con lípidos, o formas exentas de lípidos, o en forma de agregados, pudiendo ser cualquiera de estas formas soluble o insoluble. Los términos también incluyen las proteínas α S encontradas en complejos con otras moléculas.

45 En otro aspecto, la divulgación presenta métodos de identificación de compuestos candidatos para tratar una sinucleinopatía, que incluyen (a) la obtención de un modelo de sistema, por ejemplo, un sistema celular tal como un modelo de células dopaminérgicas, por ejemplo, como el descrito en el presente documento, que facilite la cuantificación de los complejos de α -sinucleína; (b) la puesta en contacto del modelo de sistema con un compuesto de ensayo para la incubación; y (c) la comparación de un nivel de α -sinucleína en presencia y en ausencia del compuesto de ensayo; indicando una reducción del nivel de complejos de α -sinucleína en presencia del compuesto de ensayo que el compuesto de ensayo es un compuesto candidato para el tratamiento de una sinucleinopatía. En algunos aspectos, la cuantificación exacta de proteína α -sinucleína se logra mediante el empleo de un ELISA específico y sensible, de tipo sándwich, por ejemplo, como el descrito en el presente documento. El modelo de sistema de α -sinucleína puede ser, por ejemplo, una célula que exprese la proteína o un modelo de animal.

55 La divulgación también presenta métodos de tratamiento de sinucleinopatías, en los que el número o la concentración de glucosilceramida y glucoesfingolípidos que contienen glucosilceramida se reduce en las células neuronales y no neuronales mediante la dirección de glucosilceramida y glucoesfingolípidos que contienen glucosilceramida con proteínas, secuencias de péptidos, enzimas, anticuerpos, lípidos naturales, lípidos semi-sintéticos y lípidos sintéticos, así como derivados de los mismos. Por ejemplo, el número o la concentración de glucosilceramida y glucoesfingolípidos que contienen glucosilceramida se puede reducir en las células neuronales y no neuronales mediante hidrólisis enzimática o no enzimática de glucosilceramida y glucoesfingolípidos que contienen glucosilceramida. Dichos métodos pueden ser catalizados por GBA, bien en una forma de tipo silvestre o en una forma mutante que sea competente en la unión, pero catalíticamente inactiva. En estos métodos, también se pueden administrar prosaposina y/o sus derivados, tales como saposina C, como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, la proteína o el polipéptido deseado, tales como GBA, se obtiene mediante la expresión de un polinucleótido que codifique la enzima o un derivado del mismo.

En estos métodos, los agentes tales como prosaposina, saposina A, saposina B, saposina C, saposina D, péptidos derivados de las mismas, moléculas pequeñas o grandes, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o polinucleótidos pequeños o grandes que mejoren la función biológica natural de GBA, por ejemplo, agentes de activación de GBA, se administran en el sistema nervioso central y/o periférico en una cantidad eficaz para reducir el nivel de proteína α S.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que la presente invención pertenece. Aunque, en la práctica o el ensayo de la presente invención, se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo sus definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos, y no pretenden ser limitantes.

Las características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es una representación de una transferencia Western que demuestra la formación dependiente del tiempo de un complejo estable de 19-20 kDa (α S/G) entre gangliósidos cerebrales humanos y α -sinucleína *in vitro*.

La FIG. 2A es una representación de una transferencia Western de proteína α -sinucleína expresada en células MES23.5 transfectadas transitoriamente con niveles indicados de un plásmido de ADNc de α -sinucleína.

La FIG. 2B es una representación de una transferencia Western que indica los efectos de la transfección de ADNc de GBA, +/- la transfección de ADNc de prosaposina a niveles intracelulares de proteína α -sinucleína en las células MES23.5-sin. Los niveles de la última proteína se muestran en el panel inferior de la transferencia Western.

La FIG. 2C es un gráfico de barras de las mediciones de ELISA que indican los niveles intracelulares de proteína α -sinucleína detectados en células MES-sin en presencia o ausencia de prosaposina y dependientes de la cantidad de ADN de GBA cotransfectada.

La FIG. 3A es una gráfica del rendimiento de un ELISA de tipo sándwich que detecta específicamente cantidades crecientes de proteína α -sinucleína recombinante (eje x), según lo monitorizado mediante la lectura de absorbancia de DO (eje y).

La FIG. 3B es un gráfico de barras de las mediciones realizadas por ELISA, que indica los niveles intracelulares de proteína α -sinucleína detectados en las células MES23.5-sin en presencia de cantidades crecientes de ADNc de SNCA (sinucleína, α (componente no A4 del precursor de amiloide)) (eje x) que se transfectó en estas células, donde se diluyeron lisados de una manera en serie de 1 en 200 a 1 en 4.000.

La FIG. 3C es un análisis de regresión de la concentración de proteína α -sinucleína intracelular tras una cantidad dada de ADNc de SCNA transfectado, medida por ELISA de tipo sándwich e interpolada a partir de los datos obtenidos en la FIG. 3A y FIG. 3B.

FIG. 3D es un gráfico de barras que muestra los resultados de ensayos con lactato deshidrogenasa (LDH) y MTT que confirman la viabilidad celular completa de las células MES-sin que expresan la proteína α -sinucleína 24 horas después de la transfección.

La FIG. 4 es una representación de los resultados obtenidos mediante ELISA tipo sándwich de cinco experimentos separados que indican un aumento del 20 a > 270 % de los niveles intracelulares de proteína α -sinucleína en las células MES23.5 tras la expresión de polipéptidos de GBA mutantes que portan una de varias mutaciones de sentido erróneo que fueron recientemente vinculadas a la enfermedad de Parkinson y a la demencia con cuerpos de Lewy, o que portan mutaciones perjudiciales para el sitio activo de GBA. El nivel de proteína α -sinucleína se expresa en relación con la concentración de células MES-Sin transfectadas sin GBA ectópico, sino solo con vector de ADNc vacío.

La FIG. 5 es un gráfico de barras de las mediciones realizadas por ELISA de tipo sándwich de la actividad de reducción del nivel de proteína α -sinucleína en ratas de la catepsina D humana cuando se expresa conjuntamente en células MES23.5-sin (MES- α S).

La FIG. 6 es una representación de una transferencia Western que indica la actividad de reducción del nivel de proteína α -sinucleína dependiente de la dosis de la catepsina D humana cuando se expresa conjuntamente en células MES23.5-sin (MES- α S).

La FIG. 7 es un gráfico de barras de las mediciones obtenidas mediante ELISA de tipo sándwich de la actividad de reducción del nivel de proteína α -sinucleína humana de la catepsina D cuando se expresa conjuntamente en células MES23.5-sin (MES- α S). Cabe señalar que la proteína α -sinucleína tanto de tipo silvestre como varias isoformas de α -sinucleína mutantes que portan mutaciones de sentido erróneo pueden ser reducidas por la catepsina D, y se han vinculado previamente a formas familiares de la enfermedad y a la enfermedad de Parkinson confirmada mediante autopsia.

Descripción detallada

En general, la divulgación se refiere a métodos de reducción de los niveles de α S en células de sujetos humanos o animales que tienen una sinucleinopatía que no es un trastorno relacionado con el almacenamiento lisosomal, por ejemplo, sujetos que tienen sinucleinopatía primaria (o invariable). Estos métodos incluyen, por ejemplo, la administración de polipéptidos de enzima lisosomal de tipo no proteasa, tales como polipéptidos de GBA, o polipéptidos de enzima lisosomal de tipo proteasa tales como polipéptidos de catepsina D, o moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos, ya sea solos o en combinación con agentes que potencien o induzcan la autofagia, tales como rapamicina o un análogo de la rapamicina. Además, se pueden administrar otros agentes de activación de GBA, tales como polipéptidos de prosaposina y/o polipéptidos de saposina C, o se pueden administrar polipéptidos de prosaposina y/o polipéptidos de saposina C solos (para mejorar la activación de la actividad de GBA endógena) para facilitar una reducción de los niveles de proteína α S en estado estacionario *in vivo*.

Por lo tanto, la presente divulgación implica la modulación de la degradación fisiológica de la α -sinucleína (α S) mediante la mejora del procesamiento dentro de los lisosomas y/o del citoplasma, y, en algunos aspectos, mediante la mejora de la cantidad de α S absorbida por los lisosomas (autofagia). Aunque sin el deseo de quedar ligado a teoría operativa alguna, el procesamiento degradativo de los agregados de α S es un sistema que funciona a un nivel de estado estacionario. Mediante la aplicación de la ley de acción de masas en el procesamiento degradativo en estado estacionario de las proteínas α S, formas oligoméricas, agregados y/o complejos, se puede modular el proceso degradativo con respecto a sus productos finales mediante el aumento de la abundancia de sus productos de partida. Al modificar las reacciones de los componentes de la vía, se puede impulsar el procesamiento general hacia mayores niveles de producto. Por lo tanto, bien mediante el aumento de la entrada de α S en los lisosomas o el aumento de la propia eficiencia de degradación, es posible impulsar la hidrólisis y el procesamiento posterior de α S a un nivel de producto superior. El aumento tanto del componente autofágico como del componente lisosomal de la vía puede conducir a una mayor protección del daño de la proteína α S, y dichas combinaciones pueden lograr más que efectos aditivos.

Algunos aspectos descritos en el presente documento son métodos de tratamiento o retraso de la progresión o del desarrollo de una sinucleinopatía que no sea una enfermedad relacionada con el almacenamiento lisosomal, por ejemplo, mediante la administración de uno o varios agentes que aumenten la actividad o el nivel de GBA y/o de prosaposina/saposina C. En algunos aspectos, los agentes pueden ser polipéptidos de GBA y/o prosaposina/saposina C o fragmentos activos de los mismos, o ácidos nucleicos que codifiquen dichos polipéptidos o fragmentos activos. En algunos aspectos, el agente es una forma competente en la unión, pero catalíticamente inactiva de GBA, o una molécula de ácido nucleico que la codifica.

Otros aspectos descritos en el presente documento son métodos de tratamiento o retraso de la progresión o del desarrollo de una sinucleinopatía, por ejemplo, mediante la administración de uno o varios agentes que aumenten la actividad o el nivel de catepsina D o catepsina F y/o preprocatepsina D o preprocatepsina F. En algunos aspectos, los agentes pueden ser polipéptidos de GBA y/o prosaposina/saposina C/catepsina D/catepsina F o fragmentos activos de los mismos, o ácidos nucleicos que codifiquen dichos polipéptidos o fragmentos activos. En algunos aspectos, el agente es una forma competente en la unión, pero catalíticamente inactiva de GBA, catepsina D o catepsina F, o una molécula de ácido nucleico que la codifica.

Métodos de tratamiento de sinucleinopatías

El término "sinucleinopatía" se usa en el presente documento para nombrar a un grupo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por la presencia de mayores niveles, por ejemplo, niveles en estado estacionario, de uno cualquiera o más de entre variantes solubles no fibrilares, isoformas oligoméricas solubles, variantes insolubles no fibrilares, complejos y agregados fibrilares insolubles de proteína α -sinucleína (α S) dentro de los compartimentos celulares de poblaciones selectivas de neuronas y glía. Por lo tanto, se entiende que el nivel en estado estacionario de α S engloba todas las formas solubles, así como insolubles e intermedias (metaestables) del producto del gen SNCA.

Dichos trastornos incluyen uno cualquiera de los siguientes agrupados como sinucleinopatías "invariables" (o "primarias") (Schlossmacher M. G. " α -synuclein and synucleinopathies. The Dementias 2 Blue Books of Practical Neurology"; Editores: Growdon JH & Rossor MN. Butterworth Heinemann, Inc., Oxford. 2007; Capítulo 8: pág. 184-213): enfermedad de Parkinson (EP), por ejemplo, la enfermedad de Parkinson/parkinsonismo esporádicos y la enfermedad de Parkinson/parkinsonismo familiares; demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB) (también conocida como enfermedad difusa de cuerpos de Lewy); insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de sinucleína; atrofia multisistémica (MSA) (del cerebelo, parkinsoniana o de tipo mixto); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro en el cerebro (también conocida como enfermedad de Hallervorden Spatz o neurodegeneración ligada a la pantotenato quinasa 2); y enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada.

Además, se han identificado sinucleinopatías "variables" (o "secundarias") en las que se reconoce la desregulación

- del metabolismo de la α -sinucleína como un acontecimiento secundario (dada la abundancia de la proteína en el sistema nervioso), que, sin embargo, como es evidente, contribuye de manera significativa a la penetración, la edad de inicio, la gravedad y la expresividad de la enfermedad primaria. Los trastornos con sinucleinopatía variable (Schlossmacher M. G. "α-synuclein and synucleinopathies. The Dementias 2 Blue Books of Practical Neurology"; Editores: Growdon J. H. & Rossor M. N. Butterworth Heinemann, Inc., Oxford. 2007; Capítulo 8: pág. 184-213) incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; parálisis supranuclear progresiva; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia resultante de un gen mutante y loci en los que todavía no se ha identificado ninguna mutación del gen; enfermedad de Creutzfeldt Jakob y enfermedades priónicas relacionadas tales como encefalopatía espongiiforme bovina (enfermedad de las vacas locas); enfermedad de Parkinson/parkinsonismo secundarios resultantes de exposición a neurotoxinas/parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático; y otras afecciones asociadas a la acumulación central y/o periférica de α -sinucleína en los mamíferos que acompaña a un proceso patológico primario.
- Clínicamente, todos estos trastornos relacionados se caracterizan por una reducción crónica y progresiva de la función motora, cognitiva, conductual y/o autonómica, en función de la distribución de las anomalías de la α -sinucleína.
- Una sinucleinopatía puede o no estar asociada a los síntomas de una enfermedad. También puede ser el producto del envejecimiento normal. Por ejemplo, las personas mayores de 55, 60, 65, 70, 75 o 80 pueden acumular dichas proteínas α S, por ejemplo, en forma de agregados, sin la asociación evidente con una patología, un síntoma o un estado patológico. Dicha afección se denomina enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy (véase más arriba) y las personas con dicha afección se consideran en mayor riesgo de EP/parkinsonismo.
- En general, los sujetos con los tipos de sinucleinopatías contempladas en el presente documento no tienen un trastorno relacionado con el almacenamiento lisosomal (LSD) primario clínicamente diagnosticado (ni clínicamente diagnosticable), tal como la enfermedad de Gaucher o la enfermedad de Tay-Sachs; estos síndromes de LSD a menudo demuestran un patrón de herencia autosómico recesivo. Sin embargo, los sujetos con mutaciones alélicas individuales en un gen que, en cambio, se ha vinculado a un fenotipo LSD clásico también pueden desarrollar sinucleinopatía y padecer sus consecuencias (tales como EP/parkinsonismo o demencia con cuerpos de Lewy), pero sin evidencia de una LSD sistémica (Eblan *et al*, *N. Engl. J. Med.*, 2005).
- Las LSD son un grupo de trastornos metabólicos entre los que se incluyen más de cuarenta trastornos genéticos, muchos de los cuales implican defectos genéticos en diversas hidrolasas lisosomales, que comúnmente están causados por mutaciones en ambos alelos del gen que codifica la enzima lisosomal. La característica más distintiva de las LSD es la pérdida de un 90 por ciento (o más) de la actividad enzimática de la hidrolasa lisosomal en cuestión y la acumulación anómala resultante de metabolitos dentro de los lisosomas, lo que conduce a la formación de un gran número de lisosomas distendidos en el pericarión.
- Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para tratar a todas las personas con sinucleinopatías primarias o secundarias, incluyendo aquellas sin mutaciones en sus genes de enzimas lisosomales, tales como el gen GBA (es decir, los pacientes con enfermedad de Parkinson esporádica sin una sola anomalía genética conocida). Se trata de pacientes en los que el envejecimiento/la lesión tóxica/el traumatismo craneal/la influencia de genes modificadores u otras causas desconocidas pueden funcionar conjuntamente para causar o potenciar la enfermedad (Klein y Schlossmacher, "Neurology", 2007, 69 (22): 2093-104).
- Los nuevos métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para tratar una subpoblación de pacientes de sinucleinopatías con una mutación heterocigótica (es decir, un solo alelo en lugar de dos alelos) en uno o más de los genes de enzimas lisosomales, por ejemplo, en el gen GBA. Estos sujetos no padecen una LSD típica (porque no tienen 90 % ni más de deficiencia enzimática, debido a que todavía expresan suficiente GBA del alelo sano restante), pero suelen padecer una sinucleinopatía primaria. Los datos de los que se dispone actualmente sugieren que dicha mutación heterocigótica en GBA sirve como factor de riesgo para la enfermedad de Parkinson (y los trastornos relacionados) y como alelo de riesgo para el desarrollo de una sinucleinopatía primaria en el sistema nervioso (Clark *et al.*, "Neurology", 2007, 69 (12): 1270-7). Curiosamente, si se mutan ambas copias (alelos) del gen GBA (por ejemplo, en los portadores de las variantes N370S, L444P, K198T y R329C de GBA), un subgrupo de pacientes con las características de LSD clásicas de la enfermedad de Gaucher desarrollarán sinucleinopatía secundaria (Lwin *et al.*, *Mol. Genet. Metab.*, 2004, 81(1):70-3).
- En particular, los tratamientos se pueden aplicar profilácticamente a aquellas personas genotipadas para mutaciones de GBA conocidas (que, por ejemplo, ya han sido genotipadas debido a antecedentes familiares de la enfermedad de Gaucher) para prevenir el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, o terapéuticamente a aquellas personas con mutaciones de GBA conocidas que ya han desarrollado una sinucleinopatía. Por lo tanto, la etapa de genotipado del paciente o sujeto para una mutación en un gen de enzima lisosomal, por ejemplo, el gen GBA, puede ser una primera etapa en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento. Los pacientes que son heterocigotos

para la mutación son candidatos para el tratamiento mediante los nuevos métodos.

Administración o activación de polipéptidos de enzima lisosomal de tipo no proteasa

5 Los nuevos métodos incluyen administrar polipéptidos de enzima lisosomal de tipo no proteasa, por ejemplo, polipéptidos de GBA, bien directamente o mediante la administración de moléculas de ácido nucleico que codifiquen polipéptidos de GBA, a pacientes que los necesitan, por ejemplo, a sujetos que han sido diagnosticados de una sinucleinopatía que no es una enfermedad de depósito lisosomal.

10 La GBA también se conoce como glucosidasa β ácida; β -glucosidasa ácida; glucocerebrosidasa; glucosilceramidasa; y GBAP. Este gen normalmente codifica una proteína de membrana lisosomal que escinde el enlace β -glucosídico de glucosilceramida (también conocida como glucocerebrosidasa), un producto intermedio del metabolismo de glicolípidos. También puede escindir glucosilesfingosina como sustrato secundario para generar glucosa y esfingosina (Sidransky, *Mol Genet Met*, 2004, pág. 6-15). Las mutaciones en este gen pueden causar la enfermedad
 15 de Gaucher, una enfermedad relacionada con el almacenamiento lisosomal que se caracteriza por una acumulación de glucocerebrósidos y glucosilesfingosinas. El corte y empalme alternativo genera múltiples variantes de transcripción que codifican la misma proteína. Hay cinco variantes de ARNm (que varían en la UTR 5'), la más larga de los cuales se establece en la base de datos GenBank con los números de acceso NM_001005749.1 (ARNm) y NP_001005749.1 (aminoácido). La información relativa a GBA se puede encontrar en la base de datos Entrez Gene
 20 con el GenelD: 2629.

Los métodos también pueden incluir el aumento de la activación de los polipéptidos de GBA administrados o cualquier GBA endógena mediante la administración de polipéptidos de activación de GBA tales como prosaposina (PS) y/o sus derivados, saposina A (SA), saposina B (SB), saposina C (SC) y saposina D (SD).

25 El gen de la prosaposina codifica una glicoproteína altamente conservada que bien es secretada como una proteína de longitud completa con actividades neurotróficas o es procesada proteolíticamente en compartimientos endosomales/lisomales por la catepsina D y otras proteasas en las 4 saposinas A, B, C y D (Leonova *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1996, 271:17312-17320; Hiraiwa *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, 341:17-24). Las saposinas A-D se encuentran principalmente en el compartimiento lisosomal, en el que facilitan el catabolismo de los glicoesfingolípidos con grupos de oligosacáridos cortos. La saposina C funciona para anclar la proteína GBA en condiciones de pH bajo al lado interno de la membrana lisosomal, permitiendo así que la GBA se pliegue correctamente para la correcta interacción con el sustrato (Salvioli *et al.*, 2000, *FEBS. Lett.* 472:17-21). Además, la saposina C protege a la proteína GBA de la degradación proteolítica por parte de las proteasas lisomales (Sun *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278:31918-31923). La importancia biológica de esta proteína se pone de relieve por el hecho de que las mutaciones nulas en el gen de la prosaposina y/o las mutaciones puntuales en la región de la saposina C del gen pueden conducir a la enfermedad de Gaucher clínica, a pesar de la presencia de GBA de tipo silvestre (Pamplos *et al.*, *Acta. Neuropathol.*, 1999, 97:91-97; Tyłki-Szymanska, 2007, *Clin. Genet.*, 72:538-542; Rafi *et al.*, 1993, *Somat. Cell Mol. Genet.*, 19:1-7).

40 Por otro lado, la baja actividad *in vivo* de la mutación de la GBA más común, N370S, se puede explicar por su incapacidad para interactuar con la saposina C y los fosfolípidos aniónicos (Salvioli *et al.*, *Biochem. J.*, 2005, 390:95-103). El corte y empalme alternativo de la prosaposina genera múltiples variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas. La prosaposina (variante de la enfermedad de Gaucher y variante de la leucodistrofia metacromática) se describe en la base de datos de Entre Gene en el GenelD: 5660. Las secuencias de sus isoformas se encuentran disponibles en GenBank como sigue: preproteína de isoforma de prosaposina a: NM_002778.2 (ARNm) y NP_002769.1 (aminoácido); preproteína de isoforma de prosaposina b: NM_001042465.1 (ARNm) y NP_001035930.1 (aminoácido); y preproteína de isoforma de prosaposina c: NM_001042466.1 (aminoácido) y NP_001035931.1 042465.1 (ARNm).

50 Tanto los polipéptidos de GBA como las moléculas de ácido nucleico que codifican la GBA, así como los polipéptidos de activación de GBA y las correspondientes moléculas de ácido nucleico, se pueden administrar usando técnicas conocidas, entre las que se incluyen las técnicas descritas en el presente documento. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido de GBA se pueden administrar usando la terapia génica
 55 descrita en el presente documento.

Administración de polipéptidos de enzima lisosomal de tipo proteasa

60 En un método alternativo, un sujeto diagnosticado de una sinucleinopatía que no es una LSD se puede tratar con un polipéptido de proteasa lisosomal tal como un polipéptido de catepsina D. Dichas proteasas se pueden administrar directamente o mediante la administración de una molécula de ácido nucleico que codifique la proteasa deseada.

65 En general, las enzimas lisomales de tipo proteasa pertenecen a las categorías de las aspartil proteasas tales como una catepsina D (o catepsina E) y las cisteinil proteasas (por ejemplo, la catepsina F y la catepsina L). Por lo tanto, la invención incluye, entre otros, nuevos métodos de tratamiento de sinucleinopatías con enzimas lisomales de tipo proteasa relacionadas con el polipéptido de procatepsina D o procatepsina E, o, como alternativa, con

enzimas lisosomales de tipo proteasa relacionadas con el polipéptido de procatepsina F o procatepsina L, o moléculas de ácido nucleico que codifican la catepsina D, la catepsina E, la catepsina F o la catepsina L, o las que codifican sus formas de polipéptido pro-proteico y pre-proteico.

5 La familia de las proteasas catepsinas incluye aproximadamente una docena de miembros, que se distinguen por su estructura y por las proteínas que escinden. La mayoría de los miembros se activa al pH bajo encontrado en los lisosomas. Por lo tanto, la actividad de dicha familia se encuentra casi en su totalidad dentro de dichos orgánulos. El gen de la catepsina D (CTSD) codifica una aspartil proteasa lisosomal compuesta por un dímero de cadena pesada y cadena ligera ligadas a través de disulfuro, ambas producidas por un solo precursor proteico. Dicha proteinasa, que es un miembro de la familia de las peptidasas C1, tiene una especificidad similar, pero inferior a la de la pepsina A. La información de las secuencias del gen humano se encuentra disponible en el GenBank como catepsina D de *Homo sapiens* (CTSD), ARNm: NM_001909.

15 Dentro de la familia de las catepsinas, solo otro miembro conocido (además de la catepsina D) posee actividad aspartil proteasa, es decir, la catepsina E. Se transcribe en 2 variantes. La información de las secuencias de las variantes humanas se encuentra disponible en el GenBank como catepsina E de *Homo sapiens* (CTSE), ARNm: NM_001910.2 y NM_148964.1.

20 Dentro de la familia de las catepsinas, hay otros varios miembros que poseen actividad de la proteasa cisteína, por ejemplo, las catepsinas C, L, F y W. Entre tantas proteasas cisteína catepsinas, las enzimas F y W forman un subgrupo separado, basado en sus ubicaciones cromosómicas, homología de secuencias y patrón de corte y empalme (Wex *et al.*, 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 259:401-407). La catepsina F se expresa en el cerebro, así como en el corazón, el músculo esquelético y otros tejidos (Wang *et al.*, 1998, *J. Biol. Chem.*, 273:32000-32008). La anulación del gen de la catepsina F en ratones conduce a una enfermedad neurológica de aparición tardía con gliosis, pérdida neuronal y acumulación de gránulos autofluorescentes (Tang *et al.*, 2006, *Mol. Cell Biol.*, 26:2309-2316), que se considera un modelo de lipofuscinosis ceroide neuronal humana de aparición en la edad adulta. La información de las secuencias del gen humano se encuentra disponible en el GenBank como catepsina E de *Homo sapiens* (CTSE), ARNm: NM_003793.3.

30 Tanto los polipéptidos de catepsina D o F como las moléculas de ácido nucleico que codifican la catepsina D o F se pueden administrar usando técnicas conocidas, entre las que se incluyen las técnicas descritas en el presente documento. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican la catepsina D se pueden administrar usando la terapia génica descrita en el presente documento.

35 Administración de otros polipéptidos de enzima lisosomal

Los ejemplos de otros polipéptidos que se pueden administrar para mejorar el procesamiento degradativo de α S dentro de los lisosomas incluyen aspartilglucosaminidasa; α -galactosidasa A; palmitoil-proteína tioesterasa; tripeptidil peptidasa; proteína lisosomal transmembrana; transportador de cisteína; ceramidasa ácida; α -L-fucosidasa ácida; proteína protectora/catepsina A; β -galactosidasa ácida; Iduronato-2-sulfatasa; α -L-iduronidasa; galactocerebrosidasa; α -manosidasa ácida; β -manosidasa ácida; arilsulfatasa B; arilsulfatasa A; N-acetilgalactosamina-6-sulfato; β -galactosidasa ácida; N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa; esfingomielinasa ácida; NPC-1; α -glucosidasa; β -hexosaminidasa B; Heparán N-sulfatasa; α -N-acetilglucosaminidasa; Acetil-CoA: α -glucosaminida; N-acetilglucosamina-6-sulfato; α -N-acetilgalactosaminidasa; α -N-acetilgalactosaminidasa; α -neuramidasa; β -glucuronidasa; β -hexosaminidasa A; glucocerebrosidasa; hidrolasa-L1 de la ubiquitina C-terminal; y lipasa ácida.

Las proteínas y los polipéptidos pueden ser enzimas de degradación lisosomales o proteínas no lisosomales que potencien la degradación de la sinucleína o de los agregados de sinucleína. Dichas proteínas y sus secuencias de codificación son bien conocidas en la técnica. Por lo general, se usarán las formas humanas de las proteínas y sus secuencias de codificación, aunque para el trabajo en modelos animales, se pueden desear ortólogos de animales. Se pueden usar una o más de dichas enzimas.

55 Mejora e inducción de la autofagia de la α -sinucleína.

En otro aspecto de la divulgación, los agentes que mejoran y/o inducen la autofagia, tales como la rapamicina o los análogos de rapamicina, se administran junto con las enzimas lisosomales, por ejemplo, polipéptidos de GBA, o proteasas lisosomales de tipo no GBA, tales como los polipéptidos de catepsina D, para lograr un efecto terapéutico más que aditivo.

60 La autofagia es un proceso catabólico que implica la degradación de los componentes propios de una célula a través de la maquinaria lisosomal. Es un proceso estrechamente regulado que desempeña una parte normal del crecimiento, desarrollo y homeostasis de las células, ayudando a mantener un equilibrio entre la síntesis, la degradación y el posterior reciclaje de los productos celulares. Se trata de un mecanismo importante mediante el cual una célula en inanición reasigna los nutrientes de los procesos innecesarios a los procesos más esenciales.

Existe varios procesos autofágicos, teniendo todos en común la degradación de los componentes intracelulares a través del lisosoma. El mecanismo más conocido de autofagia implica la formación de una membrana alrededor de una región diana de la célula, separando el contenido del resto del citoplasma. La vesícula resultante se fusiona luego con un lisosoma y, posteriormente, degrada el contenido.

5 En líneas generales, la autofagia se puede dividir en tres tipos: macroautofagia, microautogagia y autofagia mediada por chaperonas: (i) la macroautofagia implica la formación de una membrana de sellado sobre sí misma, formada *de novo*, para engullir los componentes citosólicos (proteínas y/u orgánulos enteros), que se degradan tras su fusión con el lisosoma; (ii) la microautogagia es la invaginación directa de materiales en el lisosoma; y (iii) la autofagia
10 mediada por chaperonas (CMA) implica la degradación de proteínas citosólicas específicas marcadas con una secuencia peptídica específica. La CMA es muy selectiva en lo que se degrada, y solo degrada ciertas proteínas y no degrada orgánulos. La CMA es responsable de la degradación del aproximadamente 30 % de las proteínas citosólicas en tejidos tales como el hígado, el riñón y en muchos tipos de células cultivadas.

15 Las moléculas chaperonas se unen a, y transportan, proteínas marcadas al lisosoma a través de un complejo receptor. En la CMA, solo aquellas proteínas que tienen una secuencia peptídica de consenso son reconocidas por la unión de una chaperona. A continuación, este complejo de sustrato/chaperona de la CMA se traslada a los lisosomas, en los que una proteína de membrana asociada al lisosoma receptor de CMA reconoce el complejo; la proteína se despliega y se transloca través de la membrana lisosomal asistida por proteínas adicionales en el
20 interior. Se ha informado que la α -sinucleína de tipo silvestre soluble es degradada por este mecanismo (Cuervo *et al.* (2004), *Science*, 305:1292).

La autofagia forma parte del crecimiento y desarrollo celular normal diario en el que la diana de mamífero de la rapamicina (mTOR) desempeña un importante papel regulador. La inanición inhibe la actividad de mTOR, provocando diversas respuestas celulares, entre las que se incluyen la detención celular en la fase G1 temprana, la inhibición de la síntesis de proteínas, la renovación del transportador de nutrientes, cambios de transcripción y la autofagia. La rapamicina es un agente muy conocido para la inhibición de la actividad de mTOR. Se puede usar cualquier análogo de rapamicina o inhibidor de mTOR conocido en la técnica para los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar everolimus, ciclosporina y FK506, o ensayar para determinar su
30 capacidad de estimulación de la autofagia. Aunque no todos los dichos análogos e inhibidores pueden tener actividad de estimulación la autofagia de la rapamicina, dicha actividad se puede determinar fácilmente entre estos compuestos. Los agentes que potencian la autofagia incluyen proteínas chaperonas y compuestos que se unen a y escoltan los sustratos del lisosoma. Otros compuestos que pueden estimular la autofagia incluyen hsc70, *N*-octil-4-epi- β -valienamina y glicerol. Uno o más de dichos agentes se pueden usar en los métodos de potenciación de la
35 autofagia descritos en el presente documento.

Para la presente invención, se puede usar cualquier enzima lisosomal que ayude a degradar la sinucleína o a provocar la desagregación de los complejos de sinucleína, sola o en combinación con otra/s enzima/s o agente/s lisosomal/es.

40 **Métodos de administración**

En general, los métodos descritos en el presente documento incluyen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico como el descrito en el presente documento a un sujeto que lo
45 necesita o que se ha determinado que se encuentra en necesidad de dicho tratamiento.

Como se usa en el presente contexto, "tratar" significa mejorar al menos un síntoma del sinucleinopatía y/o provocar una reducción mensurable del nivel de proteína α S en el sujeto. Del mismo modo, la administración de una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de una composición descrita en el presente documento para el
50 tratamiento de una sinucleinopatía se traducirá en una reducción del nivel de proteína α S y/o mejorará uno o más síntomas del sinucleinopatía. Dicha cantidad puede ser igual a o diferente de una "cantidad profilácticamente eficaz", que es una cantidad necesaria para inhibir, por ejemplo, prevenir, la aparición de la enfermedad o de los síntomas de la enfermedad.

55 Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición depende de la composición seleccionada. Las composiciones se pueden administrar de una o más veces al día a una o más veces a la semana; incluyendo una vez cada dos días. El experto en la materia apreciará que ciertos factores influyen en la dosificación y el tiempo requerido para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o del trastorno,
60 tratamientos previos, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones descritas en el presente documento puede incluir un solo tratamiento o una serie de tratamientos.

La dosis, la toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos se pueden determinar, por ejemplo, mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para
65 determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 %

de la población). La proporción de la dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la proporción de DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Aunque se pueden usar compuestos que presenten efectos secundarios tóxicos, se debe tener cuidado al diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos a la zona de tejido afectada con el fin de reducir al mínimo el posible daño a las células no infectadas y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para su uso en seres humanos. La dosis de dichos compuestos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de dicho intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y de la vía de administración usada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en circulación en plasma que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según lo determinado en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

A continuación, se describe información más específica sobre las dosis.

20 Administración de polipéptidos y moléculas pequeñas

Si se desea, se pueden administrar agentes que atraviesan la barrera hematoencefálica sistémicamente. Como alternativa, los agentes tales como los polipéptidos y las moléculas pequeñas descritos en el presente documento se pueden administrar directamente en un sitio del organismo en el que las células muestren acumulación de αS . Dichos agentes que no atraviesan la barrera hematoencefálica se pueden administrar en el cerebro, por ejemplo, usando inyección directa facilitada por una guía estereotáctica. Dichos agentes también se pueden administrar por vías intraventricular o intraparenquimatosa.

En otros aspectos, se pueden administrar moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos deseados, por ejemplo, en forma de un vector viral que contenga un gen que codifique el polipéptido. La administración viral puede ser en condiciones que favorezcan la expresión del transgén en las células nerviosas centrales o periféricas específicas, tales como células endimarias u otras células gliales que recubren los ventrículos del cerebro. Las células endimarias se pueden transducir para expresar el transgén y secretar el producto proteico codificado en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

Los polipéptidos descritos en el presente documento se pueden incorporar a una composición farmacéutica útil para tratar, por ejemplo, inhibir, atenuar, prevenir o mejorar, una sinucleinopatía. La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto que padezca una sinucleinopatía o alguien que se encuentre en riesgo de desarrollar dicha deficiencia. Las composiciones deben contener una cantidad terapéutica o profiláctica del polipéptido, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para administrar los polipéptidos al paciente. Se pueden usar agua estéril, alcohol, grasas y ceras como vehículo. También se pueden incorporar adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes de tamponamiento, agentes dispersantes y similares a las composiciones farmacéuticas. El vehículo se puede combinar con el polipéptido en cualquier forma adecuada para su administración por inyección o infusión intraventricular (cuya forma también puede ser adecuada para la administración intravenosa o intratecal) o de otra manera.

Los vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL® (BASF, Parsippany, NJ) o tampón de fosfato salino (PBS), otras soluciones salinas, soluciones de dextrosa, soluciones de glicerol, emulsiones de agua y aceites tales como las preparadas con aceites de petróleo, y de origen animal, vegetal o sintético (aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo). En algunas realizaciones, se usa un LCR artificial como vehículo. En general, el vehículo será estéril y estará exento de pirógenos. La concentración del polipéptido en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, del al menos aproximadamente 0,01 % en peso al 0,1 % en peso, al aproximadamente el 1 % en peso, al tanto como el 20 % en peso o más de la composición total.

Para la administración intraventricular de los polipéptidos descritos en el presente documento, u otros agentes, la composición debe ser estéril y debe estar en estado líquido. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será útil incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio.

La velocidad de administración es tal que la administración de una sola dosis se puede administrar en forma de bolo. También se puede infundir una sola dosis durante aproximadamente 1-5 minutos, aproximadamente 5-10 minutos, aproximadamente 10-30 minutos, aproximadamente 30-60 minutos, aproximadamente 1-4 horas, o consumir más de

cuatro, cinco, seis, siete u ocho horas. Puede tardar más de 1 minuto, más de 2 minutos, más de 5 minutos, más de 10 minutos, más de 20 minutos, más de 30 minutos, más de 1 hora, más de 2 horas o más de 3 horas. Aunque las administraciones intraventriculares en bolo son eficaces, las infusiones lentas son particularmente eficaces. Sin quedar ligados a teoría operativa alguna, se cree que la infusión lenta es eficaz debido a la renovación del LCR.

5 Aunque las estimaciones y los cálculos de la bibliografía varían, se cree que el LCR se renueva en aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 horas en los seres humanos. En una realización, la duración de la infusión lenta se debe dosificar de modo que sea aproximadamente igual o superior al tiempo de renovación del LCR. El tiempo de renovación puede depender de la especie, del tamaño y de la edad del sujeto, pero se puede determinar usando
10 métodos conocidos en la técnica. La infusión también puede ser continua durante un período de uno o más días. El paciente se puede tratar una vez, dos veces, o tres o más veces al mes, por ejemplo, semanalmente, por ejemplo, cada dos semanas. Las infusiones se pueden repetir a lo largo de la vida de un sujeto según lo dictado por la reaccumulación de sustrato de la enfermedad en el cerebro o en los órganos viscerales. La reaccumulación se puede determinar mediante cualquiera de las técnicas que son bien conocidas en el campo de la identificación y la
15 cuantificación del sustrato pertinente, técnicas que se pueden realizar en una o más muestras tomadas del cerebro y/o de uno o más de los órganos viscerales. Dichas técnicas incluyen ensayos enzimáticos y/o inmunoensayos, por ejemplo, radioinmunoensayos o ELISA.

20 La infusión intraventricular lenta proporciona cantidades reducidas de sustrato para un polipéptido administrado (por ejemplo, una enzima) en al menos el cerebro y, potencialmente, en órganos viscerales. La reducción de un sustrato tal como proteína α S acumulada en el cerebro, los pulmones, el bazo, el riñón y/o el hígado puede ser espectacular. Se pueden lograr reducciones superiores al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %. La reducción conseguida no es necesariamente uniforme de un paciente a otro, ni siquiera de un órgano a otro dentro de un solo paciente. Las reducciones se pueden determinar mediante cualquiera de las técnicas que son bien conocidas en la
25 materia, por ejemplo, mediante ensayos enzimáticos y/o técnicas de inmunoensayo, como se describe en otra parte en el presente documento.

30 En un aspecto ilustrativo, la administración se realiza mediante la infusión del polipéptido en uno o ambos de los ventrículos laterales de un sujeto o paciente. Al infundirlo en los ventrículos laterales, el polipéptido se administra en el sitio del cerebro en el que se produce la mayor cantidad de LCR. El polipéptido también se puede infundir en más de un ventrículo del cerebro. El tratamiento puede consistir en una sola infusión por sitio diana o se puede repetir. Se pueden usar múltiples sitios de infusión/inyección. Por ejemplo, los ventrículos en los que se administra el polipéptido pueden incluir los ventrículos laterales y el cuarto ventrículo. En algunos aspectos, además del primer sitio de administración, una composición que contiene el polipéptido se administra en otro sitio que puede ser
35 contralateral o ipsilateral al primer sitio de administración. Las inyecciones/infusiones pueden ser únicas o múltiples, y unilaterales o bilaterales.

40 Para administrar la solución u otra composición que contenga el polipéptido específicamente a una determinada región del sistema nervioso central, tal como a un determinado ventrículo, por ejemplo, a los ventrículos laterales o al cuarto ventrículo del cerebro, se puede administrar por microinyección estereotáxica. Por ejemplo, el día de la cirugía, se fija en los pacientes una base de marco estereotáxico (se atornilla en el cráneo). Se forman imágenes del cerebro con la base de marco estereotáxico (MRI compatibles con las marcas fiduciaras) mediante MRI de alta resolución. A continuación, se transfieren las imágenes de MRI a un ordenador que ejecuta el programa informático estereotáxico. Se usa una serie de imágenes coronales, sagitales y axiales para determinar el sitio diana de la
45 inyección del vector, y la trayectoria. El programa informático traduce directamente la trayectoria a coordenadas tridimensionales apropiadas para el marco estereotáxico. Se perforan orificios de Burr encima del sitio de entrada y se sitúa el aparato estereotáxico con la aguja implantada a la profundidad dada. A continuación, se inyecta la solución de polipéptido en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se pueden usar vías adicionales de administración, por ejemplo, la aplicación cortical superficial bajo visualización directa u otra aplicación no
50 estereotáxica.

Una manera de administrar una infusión lenta es usar una bomba. Dichas bombas se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, en Alzet (Cupertino, CA) o Medtronic (Minneapolis, MN). La bomba puede ser implantable. Otra manera conveniente de administrar las enzimas es el uso de una cánula o un catéter. La cánula o el catéter se
55 pueden usar para múltiples administraciones separadas en el tiempo. Es posible implantar las cánulas y los catéteres estereotáxicamente. Se contempla el uso de múltiples administraciones para tratar al paciente típico con una sinucleinopatía. Los catéteres y las bombas se pueden usar por separado o combinados.

60 **Administración de moléculas de ácido nucleico y terapia génica**

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento, tales como las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de GBA o de catepsina D, se pueden administrar usando una serie de diferentes métodos. Por ejemplo, la transferencia de genes puede estar mediada por un vector viral de ADN, tal como un adenovirus (Ad) o virus adeno-asociado (AAV). Una construcción de vector se refiere a una molécula de polinucleótido que incluye el
65 genoma viral o parte del mismo y un transgén. Los adenovirus (Ad) son un grupo homogéneo de virus, relativamente bien caracterizado, que incluye más de 50 serotipos. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT Internacional n.º WO

95/27071. Los adenovirus son fáciles de cultivar y no requieren la integración en el genoma de la célula hospedadora. También se han construido vectores derivados de adenovirus recombinantes, particularmente aquellos que reducen el potencial para la recombinación y la generación de virus de tipo silvestre. Véase la solicitud PCT internacional n.º WO 95/00655 y el documento WO 95/11984. Los AAV de tipo silvestre tienen una alta infectividad y especificidad en la integración en el genoma de la célula hospedadora. Véase, Hermonat y Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 81:6466-6470 y Lebkowski *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.*, 8:3988-3996.

Los vectores virales neurotróficos adecuados para administrar las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, vectores virales adeno-asociados (AAV), vectores del virus del herpes simple (patente de EE.UU. n.º 5.672.344) y vectores lentivirales.

En los nuevos métodos, se pueden usar AAV de cualquier serotipo o pseudotipo. El serotipo del vector viral usado en ciertas realizaciones de la invención se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV8 (véase, por ejemplo, Gao *et al.* (2002) *PNAS*, 99:11854-11859; y "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols", ed. Machida, Humana Press, 2003). Se pueden usar otros serotipos además de los enumerados en el presente documento. Además, en los métodos descritos en el presente documento, también se pueden utilizar vectores de AAV pseudotipados. Los vectores de AAV pseudotipados son aquellos que contienen el genoma de un serotipo de AAV en la cápside de un segundo serotipo de AAV; por ejemplo, un vector de AAV que contiene la cápside de AAV2 y el genoma de AAV1 o un vector de AAV que contiene la cápside de AAV5 y el genoma de AAV2 (Auricchio *et al.*, (2001) *Hum. Mol. Genet.*, 10(26):3075-81).

Los vectores de AAV se derivan de parvovirus de ADN monocatenarios (mc) que no son patógenos para los mamíferos (revisado en Muzyscka (1992) *Curr. Top. Microb. Immunol.*, 158:97-129). En resumen, los vectores basados en AAV tienen genes virales rep y cap que representan el 96 % del genoma viral eliminado, dejando las dos repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pares de bases (pb) flanqueantes, que se usan para iniciar la replicación, el empaquetamiento y la integración del ADN viral. En ausencia de virus auxiliar, el AAV de tipo silvestre se integra en el genoma de la célula hospedadora humana con especificidad de sitio preferencial en el cromosoma 19q13.3 o se puede mantener episomalmente. Una sola partícula de AAV puede alojar hasta 5 kb de ADNmc, dejando, por tanto, aproximadamente 4,5 kb para un transgén y elementos reguladores, lo que suele ser suficiente. Sin embargo, los sistemas de trans-corte y empalme descritos, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.544.785 pueden casi duplicar este límite.

En un aspecto ilustrativo, el AAV es AAV2. Se han estudiado ampliamente virus adeno-asociados de muchos serotipos, especialmente AAV2, y se han caracterizado como vectores de terapia génica. Los expertos en la materia están familiarizados con la preparación de vectores de terapia génica basados en AAV funcionales. Numerosas referencias a diversos métodos de producción, purificación y preparación de AAV para la administración a sujetos humanos se pueden encontrar en el extenso conjunto de material publicado (véase, por ejemplo, "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols", ed. Machida, Humana Press, 2003). Además, la terapia génica basada en AAV dirigida a las células del SNC se ha descrito en la patente de EE.UU. n.º 6.180.613 y 6.503.888. Son vectores de AAV ilustrativos adicionales los vectores de serotipos AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7 y AAV2/8 recombinantes que codifican proteína humana.

En ciertos métodos descritos en el presente documento, el vector incluye un transgén ligado operativamente a un promotor. El transgén codifica una molécula biológicamente activa, tal como un polipéptido de GBA, cuya expresión en el SNC produce la corrección al menos parcial de una sinucleinopatía.

El nivel de expresión de los transgenes en las células eucariotas está determinado en gran medida por el promotor de la transcripción del casete de expresión del transgén. En algunas realizaciones, se usan promotores que muestran actividad a largo plazo y que son específicos de tejidos e incluso de células. Los ejemplos de promotores incluyen, pero sin limitación, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Kaplitt *et al.* (1994) *Nat. Genet.*, 8:148-154), el promotor de globina β de CMV/humana (Mandel *et al.* (1998) *J. Neurosci.*, 18:4271-4284), el promotor de GFAP (Xu *et al.* (2001) *Gene Ther.*, 8:1323-1332), el promotor de la enolasa específica de las neuronas de 1,8 kb (NSE) (Klein *et al.* (1998) *Exp. Neurol.*, 150:183-194), el promotor de la β -actina de pollo (CBA) (Miyazaki (1989) *Gene*, 79:269-277), el promotor de la β -glucuronidasa (GUSB) (Shipley *et al.* (1991) *Genetics*, 10:1009-1018) y los promotores de la ubiquitina, tales como los aislados de la ubiquitina A humana, la ubiquitina B humana y la ubiquitina C humana, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.667.174. Para prolongar la expresión, también se pueden ligar operativamente al transgén otros elementos reguladores tales como, por ejemplo, elemento postregulador del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) (Donello *et al.* (1998) *J. Virol.*, 72:5085-5092) o el sitio de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH).

Para algunas aplicaciones de terapia génica del SNC, puede ser necesario controlar la actividad de la transcripción. Con este fin, se puede obtener la regulación farmacológica de la expresión génica con vectores virales mediante la inclusión de diversos elementos reguladores y promotores que respondan a fármacos como se describe, por ejemplo, en Haberman *et al.* (1998) *Gene Ther.*, 5:1604-16011; y Ye *et al.* (1995) *Science*, 283:88-91.

Se pueden producir preparados de AAV de título elevado usando técnicas conocidas en la materia, por ejemplo,

como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.658.776 y "Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols", ed. Machida, Humana Press, 2003

Dosis

5 Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un polipéptido, por ejemplo, de un polipéptido de GBA o de catepsina u otro agente descrito en el presente documento, dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si el polipéptido o el agente se administran con fines profilácticos o terapéuticos, de la terapia previa, del historial y de la respuesta a la enzima o al agente, así como de la opinión del médico que esté tratando al paciente.

15 En un régimen de terapia de combinación, las composiciones descritas en el presente documento se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz o sinérgica. Una cantidad terapéuticamente sinérgica es la cantidad de uno o más polipéptidos u otros agentes en combinación con uno o más otros polipéptidos o agentes, necesaria para reducir significativamente o eliminar las afecciones o los síntomas asociados a una enfermedad en particular de una manera que sea más que aditiva cuando los dos polipéptidos/agentes se administran solos.

20 Aunque las dosis pueden variar dependiendo de la enfermedad y del paciente, en general, el polipéptido se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 miligramos por cada 50 kg de peso del paciente cada administración, y se puede repetir semanalmente, mensualmente o en otros intervalos de tiempo según sea necesario. En una realización, el polipéptido se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 miligramos por 50 kg de peso del paciente al mes. En otras realizaciones, el polipéptido se administra al paciente en cantidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 miligramos por 50 kg de peso del paciente al mes, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 miligramos por 50 kg de peso del paciente al mes.

30 Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, el polipéptido o el agente se pueden administrar de manera que la concentración local proporcionada sea de aproximadamente 106 pg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de 1 ng/ml a aproximadamente 95 µg/ml, de 10 ng/ml a aproximadamente 85 µg/ml, de 100 ng/ml a aproximadamente 75 µg/ml, de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 50 µg/ml, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 25 µg/ml, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 15 µg/ml, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml o de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 4 µg/ml.

35 Cuando el polipéptido o el agente se administra mediante terapia génica a través de viriones virales, la dosis puede ser de aproximadamente 2×10^6 a aproximadamente 2×10^{12} drp, de aproximadamente 2×10^7 a aproximadamente 2×10^{11} drp, o de aproximadamente 2×10^8 a 2×10^{10} drp (partículas resistentes a ADNasa) por unidad de dosis. En ciertos aspectos, la concentración o el título del vector en la composición es de al menos: (a) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{12}$ pg/ml); (b) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^9$ ut/ml); o (c) 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 50 ($\times 10^{10}$ ui/ml).

40 Las expresiones "partículas de genoma (pg)", o "equivalentes de genoma" como se usan en referencia a un título viral, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o la funcionalidad. El número de partículas de genoma de un preparado de un determinado vector se puede medir mediante procedimientos tales como los descritos en los ejemplos del presente documento, o por ejemplo, en Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10:1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6:272-278.

50 Las expresiones "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y competentes en la replicación medido mediante el ensayo del centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62:1963-1973.

55 La expresión "unidad de transducción (ut)", como se usa en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas infecciosas de vector de AAV recombinante que dan lugar a un producto transgénico funcional medido en ensayos funcionales tales como los descritos en los ejemplos del presente documento o, por ejemplo, en Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144:113-124; o en Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70:520-532 (ensayo de LFU).

60 Cuando el polipéptido o el agente se administra mediante terapia química o de proteínas, la dosis puede ser de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg o de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 2,5 mg por dosis unitaria.

65 Los polipéptidos y los agentes descritos en el presente documento se pueden administrar como una sola dosis o repetidamente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de la terapia de la invención se monitoriza mediante técnicas y ensayos convencionales.

Composiciones farmacéuticas

La expresión "composición farmacéutica" o el término "medicamento" pretenden englobar una combinación de un componente o agente activo, por ejemplo, un polipéptido enzimático y, opcionalmente, un vehículo u otro material, por ejemplo, un compuesto o una composición, que sea inerte (por ejemplo, un agente o marcador detectable) o activo, tal como un adyuvante, diluyente, aglutinante, estabilizante, tampón, sal, disolvente lipófilo, conservante, adyuvante o similares, o una mezcla de dos o más de dichas sustancias.

Los vehículos son preferentemente farmacéuticamente aceptables. Pueden incluir excipientes y aditivos farmacéuticos, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono (por ejemplo, azúcares, incluyendo monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, comprendiendo, solos o en combinación, del 1 al 99,99 % en peso o volumen. Los excipientes proteicos ilustrativos incluyen albúmina sérica tal como la albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Los componentes de aminoácido/anticuerpo representativos que también pueden funcionar en una capacidad de tamponamiento incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Los excipientes de hidratos de carbono también se pretenden incluir en el alcance de la presente invención, cuyos ejemplos incluyen, pero sin limitación, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos tales como rafflesa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y mioinositol.

El término "vehículo" también incluye un tampón o un agente de ajuste del pH o una composición que contenga el mismo. Por lo general, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido orgánico o de una base orgánica. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico, Tris, clorhidrato de trometamina o tampones de fosfato. Otros vehículos adicionales incluyen excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, Ficolls (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas tales como 2-hidroxi-propil-cuadratura-ciclodextrina), polietilenglicoles, agentes aromatizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20"® y "TWEEN 80"®), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" engloba cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como solución salina, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción, y similares, una solución salina tamponada con fosfato, agua y emulsiones tales como emulsión de aceite/agua o emulsión de agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes, compatibles con la administración farmacéutica. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios a las composiciones. Las composiciones y los medicamentos fabricados y/o usados de acuerdo con la presente divulgación y que incluyen determinados polipéptidos, moléculas de ácido nucleico u otros agentes pueden incluir estabilizadores y conservantes, y cualquiera de los vehículos descritos en el presente documento con la condición adicional de que sean aceptables para su uso *in vivo*. Para consultar ejemplos de vehículos adicionales, estabilizadores y adyuvantes, véase Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 15ª Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) y Williams & Williams, (1995), y en "PHYSICIAN'S DESK REFERENCE," 52ª ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998).

Los métodos descritos en el presente documento incluyen la fabricación y el uso de composiciones farmacéuticas, que pueden incluir compuestos identificados mediante los métodos de detección descritos en el presente documento como principios activos. También se incluyen las propias composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden incluir agentes que aumenten el nivel o la actividad de uno o ambos de entre GBA o PS/SC.

Normalmente, las composiciones farmacéuticas se formulan para que sean compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal.

Los métodos de formulación de composiciones farmacéuticas adecuadas son conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los libros de la serie "Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs" (Dekker, NY). Por ejemplo, las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede

encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis de vidrio o plástico.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la inyección pueden incluir soluciones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser líquida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y de almacenamiento, y debe conservarse
10 contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida a un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según lo necesario, seguido de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y el resto de ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

30 En general, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo líquido para su uso como un enjuague bucal. Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas, los trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel® o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes®; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

40 Para la administración por inhalación, los compuestos se pueden administrar en forma de una pulverización de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contenga un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Dichos métodos incluyen los descritos en la patente de EE.UU. n.º 6.468.798.

45 La administración sistémica de un compuesto terapéutico como el descrito en el presente documento también puede ser por vía transmucosa o transdérmica. Para la administración por vía transmucosa o transdérmica, en la formulación, se usan penetrantes apropiados para la barrera que se vaya a atravesar. Dichos penetrantes se conocen, en general, en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede realizar mediante el uso de pulverizados nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce en la técnica en general.

55 Las composiciones farmacéuticas también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

60 Los compuestos terapéuticos que son o incluyen ácidos nucleicos se pueden administrar mediante cualquier método adecuado para la administración de agentes de ácido nucleico, tal como una vacuna de ADN. Dichos métodos incluyen pistolas génicas, bioinyectores y parches cutáneos, así como métodos exentos de agujas tales como la tecnología de vacuna de ADN de micropartículas desvelada en la patente de EE.UU. n.º 6.194.389, y la vacunación sin aguja transdérmica de mamíferos con la vacuna en forma de polvo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 6.168.587. Además, es posible la administración intranasal, como se describe en, entre otros, Hamajima *et al.*, (1998) *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 88(2), 205-10. También se pueden usar los liposomas (por ejemplo, como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 6.472.375) y la microencapsulación. También se pueden usar sistemas de
65 administración de micropartículas dirigibles biodegradables (por ejemplo, como los descritos en la patente de

EE.UU. n.º 6.471.996).

En un aspecto, los compuestos terapéuticos se preparan con vehículos que protegerán los compuestos terapéuticos contra la eliminación rápida del organismo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Dichas formulaciones se pueden preparar usando técnicas convencionales. Los materiales también se pueden obtener en el mercado, en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden usar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.522.811.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con las instrucciones para la administración.

Kits

Los kits de acuerdo con la presente invención son montajes de componentes separados. Aunque pueden estar envasados en un solo recipiente, se pueden subenvasar por separado. Incluso un solo recipiente puede estar dividido en compartimientos. Normalmente, el kit irá acompañado de un conjunto de instrucciones sobre la administración de las enzimas, por ejemplo, la administración intraventricular de los polipéptidos de GBA. Las instrucciones pueden estar impresas, en formato electrónico, como un vídeo o DVD de instrucciones, en un disco compacto o en un disco floppy, en Internet, proporcionándose la dirección en el envase o una combinación de estos medios. Se pueden proporcionar otros componentes tales como diluyentes, tampones, disolventes, cinta adhesiva, tornillos y herramientas de mantenimiento, además de la enzima, una o más cánulas o catéteres y/o una bomba.

Métodos de detección

También se incluyen en el presente documento métodos de detección de los compuestos de ensayo, por ejemplo, polipéptidos, polinucleótidos, los compuestos de ensayo de moléculas grandes o pequeñas inorgánicas u orgánicas, para identificar los agentes útiles en el tratamiento de sinucleinopatías que no están asociadas a una enfermedad relacionada con el almacenamiento lisosomal, por ejemplo, una sinucleinopatía primaria. En particular, los nuevos ensayos de detección están diseñados para localizar nuevos compuestos que sirvan como agentes de activación de GBA para las formas de tipo silvestre o mutantes de GBA.

Como se usa en el presente documento, "moléculas pequeñas" se refiere a moléculas pequeñas inorgánicas u orgánicas de peso molecular inferior a aproximadamente 3.000 Dalton. En general, las moléculas pequeñas útiles para la invención tienen un peso molecular inferior a 3.000 Daltons (Da). Las moléculas pequeñas pueden ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 100 Da a aproximadamente 3000 Da (por ejemplo, de aproximadamente 100 a aproximadamente 3.000 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.500 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.750 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.500 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.250 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 750 Da, de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 Da, de aproximadamente 200 a aproximadamente 1.500, de aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000, de aproximadamente 300 a aproximadamente 1.000 Da o de aproximadamente 100 a aproximadamente 250 Da).

Los compuestos de ensayo pueden ser, por ejemplo, productos naturales o miembros de una biblioteca química combinatoria. Se debe usar un conjunto de diversas moléculas para cubrir varias funciones tales como la carga, aromaticidad, enlaces de hidrógeno, flexibilidad, tamaño, longitud de cadena lateral, hidrofobicidad y rigidez. Las técnicas combinatorias adecuadas para la síntesis de moléculas pequeñas son conocidas en el campo, por ejemplo, según lo ilustrado por Obrecht y Villalgordo, "Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries", Pergamon-Elsevier Science Limited (1998), e incluyen aquellas tales como las técnicas de síntesis de "división y combinación" o "en paralelo", las técnicas en fase sólida y fase de solución, y las técnicas de codificación (véase, por ejemplo, Czarnik, (1997) *Curr. Opin. Chem. Bio.*, 1:60-6). Además, hay una serie de bibliotecas de moléculas pequeñas disponibles en el mercado. En la patente de EE.UU. n.º 6.503.713, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad, se enumera una serie de compuestos de ensayo de molécula pequeña adecuados.

Las bibliotecas exploradas usando los métodos de la presente divulgación pueden comprender varios tipos de compuestos de ensayo. Una biblioteca dada puede comprender un conjunto de compuestos de ensayo estructuralmente relacionados o no relacionados. En algunas realizaciones, los compuestos de ensayo son moléculas de péptido o peptidomiméticas. En algunas realizaciones, los compuestos de ensayo son ácidos nucleicos.

En algunos aspectos, los compuestos de ensayo y las bibliotecas de los mismos se pueden obtener mediante la

modificación sistemática de la estructura de un primer compuesto de ensayo, por ejemplo, un primer compuesto de ensayo que sea estructuralmente similar a una pareja de unión natural conocida del polipéptido diana, o una primera molécula pequeña identificada como capaz de unirse al polipéptido diana, por ejemplo, usando métodos conocidos en la técnica o los métodos descritos en el presente documento, y correlacionar dicha estructura con una actividad biológica resultante, por ejemplo, un estudio de la relación entre estructura y actividad. Como un experto en la materia apreciará, hay varios métodos convencionales para la creación de dicha relación de estructura y actividad. Por lo tanto, en algunos casos, el trabajo puede ser en gran medida empírico, y en otros, se puede usar la estructura tridimensional de un polipéptido endógeno o parte del mismo como punto de partida para el diseño racional de un compuesto o compuestos de molécula pequeña. Por ejemplo, en una realización, se explora una biblioteca general de moléculas pequeñas, por ejemplo, usando los métodos descritos en el presente documento.

En algunos aspectos, se aplica un compuesto de ensayo a una muestra de ensayo, por ejemplo, se evalúa una célula o un tejido vivo o un órgano, y uno o más efectos del compuesto de ensayo. En una célula cultivada o primaria por ejemplo, se puede determinar la capacidad del compuesto de ensayo para aumentar los niveles y/o la actividad de GBA o PS/SC. Se pueden usar los modelos basados en células MES descritos en el presente documento para dichos ensayos de detección. Por ejemplo, mediante el uso de placas de cultivo de células MES (de 96 o 384 pocillos), se aplican bibliotecas químicas a base de moléculas pequeñas a una concentración de ensayo de 1 μ M durante un período de 36 a 48 horas. Las células se lisan y se analizan por ELISA de tipo sándwich, por ejemplo, como se indica en las Fig. 3A a 3D del presente documento para determinar el efecto neto de estos compuestos sobre la concentración de proteína α -sinucleína en cada pocillo.

En algunos aspectos, la muestra de ensayo es, o se deriva de (por ejemplo, una muestra tomada de) un modelo *in vivo* de una sinucleinopatía como se describe en el presente documento. Se puede usar, por ejemplo, un modelo animal, por ejemplo, un modelo de roedor tal como un modelo de ratón o de rata. En concreto, el modelo de sinucleinopatía de ratón de Masliah es adecuado (disponible en el mercado en JSW Research en Graz, Austria) (véase, Masliah *et al.*, *Science*, 18 de febrero de 2000; 287(5456):1265-9).

Los métodos de evaluación de cada uno de estos efectos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede evaluar la capacidad para modular la expresión de una proteína a nivel génico o de proteína, por ejemplo, usando métodos de PCR cuantitativa o de inmunoensayo. En algunos aspectos, se pueden usar métodos de alto rendimiento, por ejemplo, chips de proteínas o de genes como se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, capítulo 12, "Genomics", en Griffiths *et al.*, *Eds. Modern genetic Analysis*, 1999, W. H. Freeman y Company; Ekins y Chu, 1999 *Trends in Biotechnology*, 17:217-218; MacBeath y Schreiber, 2000 *Science*, 289(5485):1760-1763; Simpson, "Proteins and Proteomics: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002; Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts", DNA Press, 2003), para detectar un efecto sobre dos, tres, cuatro, cinco o más de los polipéptidos descritos en el presente documento.

Un compuesto de ensayo que ha sido detectado mediante un método descrito en el presente documento y del que se ha determinado que aumenta los niveles y/o la actividad de GBA o PS/SC, o reduce los niveles de agregados de α S, se puede considerar un compuesto candidato. Un compuesto candidato que se ha detectado, posteriormente, por ejemplo, en un modelo *in vivo* de un trastorno, por ejemplo, un modelo animal de una sinucleinopatía, y sobre el que se ha determinado que tiene un efecto deseable en el trastorno, por ejemplo, en uno o más síntomas del trastorno, se puede considerar un agente terapéutico candidato. Los agentes terapéuticos candidatos, una vez detectados en un entorno clínico, son agentes terapéuticos. Los compuestos candidatos, agentes terapéuticos candidatos y agentes terapéuticos, opcionalmente, se pueden optimizar y/o derivatizar, y formular con excipientes fisiológicamente aceptables para formar composiciones farmacéuticas.

Por lo tanto, los compuestos de ensayo identificados como "aciertos" (por ejemplo, los compuestos de ensayo que aumentan los niveles y/o la actividad de GBA o PS/SC) en una primera exploración se pueden seleccionar y modificar sistemáticamente, por ejemplo, usando un diseño racional para optimizar la afinidad de unión, la avidéz, la especificidad u otro parámetro. Dicha optimización también se puede explorar para el uso de los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación incluye la exploración de una primera biblioteca de compuestos usando un método conocido en la técnica y/o descrito en el presente documento, la identificación de uno o más aciertos en dicha biblioteca, la modificación estructural sistemática de dichos aciertos para crear una segunda biblioteca de compuestos estructuralmente relacionados con el acierto, y la exploración de la segunda biblioteca usando los métodos descritos en el presente documento.

Los compuestos de ensayo identificados como aciertos pueden considerarse compuestos terapéuticos candidatos, útiles en el tratamiento de sinucleinopatías descritas en el presente documento. Se puede usar varias técnicas útiles para determinar las estructuras de los "aciertos" en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, RMN, espectrometría de masas, cromatografía de gases dotada de detectores de captura de electrones, espectroscopia de fluorescencia y de absorción. Por lo tanto, la divulgación también incluye compuestos identificados como "aciertos" mediante los métodos descritos en el presente documento, y métodos para su administración y uso en el tratamiento, la prevención o el retraso del desarrollo o de la progresión de un trastorno descrito en el presente documento.

Los compuestos de ensayo identificados como compuestos terapéuticos candidatos se pueden detectar además mediante la administración a un modelo animal de una sinucleinopatía como se describe en el presente documento. El animal puede ser monitorizado para determinar un cambio en el trastorno, por ejemplo, para determinar una mejora en un parámetro del trastorno, por ejemplo, un parámetro relacionado con el resultado clínico.

5

Ejemplos

Se proporcionan los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

10 Ejemplo 1: Glicosfingolípidos asociados bioquímicamente con la α -sinucleína *in vitro*

El experimento realizado en el presente ejemplo demuestra la existencia de complejos estables entre la proteína α -sinucleína y los gangliósidos cerebrales humanos que, en última instancia, se convierten en sustratos de la enzima GBA.

15

Los gangliósidos son glicosfingolípidos complejos que contienen una unidad de glucocerebrosidasa como parte de su estructura química (véase, por ejemplo, Dreisewerd *et al.*, (2005) *Anal Chem.*, 77, 4098-107). Por consiguiente, las unidades de glucocerebrosidasa constituyen tanto un componente básico como un producto de degradación en el ciclo continuo de síntesis-degradación de los gangliósidos. La incubación conjunta de un grupo de gangliósidos, derivados del cerebro bien caracterizados (véase, Schlossmacher *et al.*, (2005) *N.E.J.M.*, 352, 728-731, y Dreisewerd *et al.* (2005)) con proteína α -sinucleína recombinante *in vitro* condujo a la formación de un complejo que era estable en condiciones de SDS/PAGE altamente desnaturalizantes, lo que provocó un cambio electroforético del complejo de α -sinucleína de 16 kDa al complejo de proteína α -sinucleína/glucocerebrosidasa de peso molecular superior, de 19-20 kDa, según lo indicado por transferencia Western (FIG. 1).

25

La FIG. 1 es una representación de una transferencia Western que demuestra la formación dependiente del tiempo de un complejo de 19-20 kDa estable (α S/G) entre los gangliósidos cerebrales humanos y la proteína α -sinucleína *in vitro*. Se incubaron conjuntamente los gangliósidos cerebrales humanos (G) con proteína α -sinucleína recombinante humana (α S; de tipo silvestre) a 4 °C durante diversos períodos de tiempo de hasta 72 horas, antes de someterlos a SDS/PAGE. Como control negativo (C), se incubó agua con proteína α -sinucleína recombinante humana durante 72 horas. Se observó la aparición dependiente del tiempo de una banda superior que migraba a 19-20 kDa en las muestras incubadas con gangliósidos, pero no con agua, y se interpretó como un complejo de proteína α -sinucleína-gangliósido (α S/G) estable. La presencia de proteína α -sinucleína no complejada se indica mediante una banda con el peso molecular de 16 kDa.

35

Estos y otros hallazgos relacionados demostraron que la proteína α -sinucleína puede interactuar con la glucocerebrosidasa que contiene lípidos complejos de una forma que es muy estable y relativamente resistente a la presencia de SDS.

40 Ejemplo 2: Glucocerebrósido asociado bioquímicamente con proteína α -sinucleína *in vitro*

Se incubó conjuntamente glucocerebrósido derivado de tejidos humanos o sintético (también conocido como glucosilceramida; GC) con proteína α -sinucleína recombinante humana (α S; de tipo silvestre) a 4 °C durante diversos períodos de tiempo hasta 72 horas, antes de someterlo a SDS/PAGE. Como control negativo (C), se incubó agua con proteína α -sinucleína recombinante humana durante 72 horas. Se observó la aparición dependiente del tiempo de una banda superior que migraba a 19-22 kDa en las muestras incubadas con glucocerebrósido. La presencia de proteína α -sinucleína no complejada se indica mediante una banda con el peso molecular de 16 kDa.

45

Estos y otros hallazgos relacionados demuestran que la proteína α -sinucleína puede interactuar con el glucocerebrósido de una forma que es muy estable y relativamente resistente a la presencia de SDS.

50

Ejemplo 3: Glucoesfingosina asociada bioquímicamente con proteína α -sinucleína *in vitro*

Se incubó conjuntamente glucoesfingosina derivada de tejidos humanos o sintética (también conocida como glucosilesfingosina; GS) con proteína α -sinucleína recombinante humana (α S; de tipo silvestre) a 4 °C durante diversos períodos de tiempo hasta 72 horas, antes de someterla a SDS/PAGE. Como control negativo (C), se incubó agua con proteína α -sinucleína recombinante humana durante 72 horas. Se observó la aparición dependiente del tiempo de una banda superior que migraba a 19-22 kDa en las muestras incubadas con glucoesfingosina. La presencia de proteína α -sinucleína no complejada se indica mediante una banda con el peso molecular de 16 kDa.

60

Estos y otros hallazgos relacionados demuestran que la proteína α -sinucleína puede interactuar con la glucoesfingosina de una forma que es muy estable y relativamente resistente a la presencia de SDS.

Ejemplo 4: Establecimiento de un sistema de cultivo de células neuronales que expresan dopamina para la

expresión de la proteína α -sinucleína

Se utilizó un sistema de cultivo de células mesencefálicas de roedor que expresaba dopamina (células MES23.5) para el establecimiento de un sistema de sobreexpresión de proteína α -sinucleína. Anteriormente, estas células
 5 habían sido usadas por Sharon *et al.* para crear líneas celulares estables de sobreexpresión de α S. Sin embargo, estos autores observaron que los clones de células MES23.5 transfectadas con α S estables iban perdiendo gradualmente la expresión de α S tras 2 meses o más (Sharon R., *et al.*, (2001) *PNAS* 98, 9110-9115). Para evitar este problema, en el presente trabajo, las células MES23.5 se transfectaron transitoriamente cada vez usando
 10 Lipofectamine® 2000 (Invitrogen Corp). Dado que las células MES23.5 no se adhieren fuertemente a las placas de plástico de cultivo de tejidos, las células se cultivaron en placas de plástico recubiertas de poli-D-lisina, una medida que no se había usado previamente en la literatura. Además, Invitrogen Corp recomienda la transfección con Lipofectamine 2000 cuando las células tienen una confluencia superior al 80 % y, en el presente estudio, se encontró empíricamente que la eficacia de transfección se mejoró mucho mediante la transfección cuando las
 15 células tenían una confluencia del 50 al 60 % (medida por la eficacia de transfección de un plásmido codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) en los pocillos hermanos, visualizado 24 horas después de la transfección con un microscopio fluorescente).

Como se muestra en la FIG. 2A, se transfectaron transitoriamente células MES23.5 con plásmido de ADNc de SNCA codificante de la α S de longitud completa bajo el control de un promotor de CMV. Las células se transfectaron con 0,
 20 0,25, 0,5, 1, 5 y 10 μ g (por placa de 10 cm) del plásmido. 24 horas después, las células se lavaron con solución salina tamponada con Tris y se lisaron en NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, Triton-X100 al 0,5 % y 1 x inhibidores de la proteasa. Se centrifugaron los lisados a 100.000 xg durante 30 min a 4 °C; se retiraron los 2/3 superiores de sobrenadantes y se congelaron en tubos siliconados a -80 °C. Se procesaron las muestras en
 25 SDS/PAGE, usando DTT 1 mM como agente reductor. La expresión de la proteína α S se confirmó 24 horas después de la transfección por transferencia Western, donde los lisados celulares se sondaron con un anticuerpo monoclonal contra la proteína α S (anticuerpo sin-1, BD Transduction Labs). La expresión demostró ser dependiente de la cantidad inicial de plásmido transfectado, hasta una cantidad de saturación de 5-10 μ g por placa de 10 cm.

Ejemplo 5: Estudios exploratorios usando células MES23.5 para la expresión concomitante de α -sinucleína y proteínas lisosomales seleccionadas

El experimento realizado en el presente ejemplo (como se muestra en la FIG. 2B) demuestra que el aumento de los niveles de proteína GBA celular puede reducir el nivel de proteína α -sinucleína neuronal.

Se transfectaron células MES23.5 con 0,5 μ g de ADNc de SNCA codificante de α S por placa de 10 cm más bien
 35 1,25, 2,5 o 5 μ g (bajo, medio o alto) de ADNc codificante de GBA en ausencia o en presencia de 5 μ g de ADNc codificante de prosaposina. Todos los grupos del experimento se equilibraron hasta un total de 10,5 μ g de ADNc por placa de 10 cm usando ADNc de vector vacío. Los plásmidos de ADNc que codifican GBA y prosaposina bajo un promotor de CMV, así como el vector vacío pCMV-XL5 se adquirieron en OriGene Technologies, Inc (los clones
 40 habían sido verificados secuencialmente por completo tras el aislamiento y Maxiprep). 24 horas después, se lisaron y se sondaron las células para determinar los niveles de GBA y de proteína α S. El panel superior de la FIG. 2B3 es una representación de una transferencia Western que indica la expresión de proteínas GBA en ausencia y en presencia de prosaposina transfectada conjuntamente. La GBA se sondó usando el anticuerpo monoclonal 8E4. La sobreexpresión de GBA se produjo de una manera ligeramente dependiente de la dosis de genes en ausencia de
 45 prosaposina. En presencia de sobreexpresión de prosaposina, se redujo la propia señal de GBA. Dicha observación se puede explicar por una modificación de GBA durante su activación, que condujo a la reducción de la capacidad de reconocimiento por el anticuerpo monoclonal empleado en las condiciones de SDS/PAGE/transferencia Western, por una velocidad de degradación intralisosomal más rápida de GBA después de su activación por PS/SC, o puede haber ocurrido como resultado de la reducción global de las velocidades de transcripción y traducción del ADNc
 50 dada la administración simultánea de tres plásmidos portadores de ADNc exógenos distintos.

El panel inferior de la FIG. 2B muestra que GBA, en ausencia de prosaposina transfectada conjuntamente, bajó los niveles de proteína α -sinucleína expresados conjuntamente en la mayor cantidad del ADNc de GBA transfectado conjuntamente. Dicho efecto reductor observado de la proteína α -sinucleína por parte de la GBA se potenció en gran
 55 medida por la expresión conjunta de la prosaposina, según lo indicado por la fuerte reducción de los niveles de proteína α -sinucleína incluso a las concentraciones más bajas (de bajas y medias) de ADNc codificante de GBA transfectado. El gráfico de barras de la FIG. 2C muestra un resumen semicuantitativo de los datos mostrados en la FIG. 2B.

En resumen, se concluyó que el aumento de la actividad de GBA en estas condiciones de cultivo celular *ex vivo* puede reducir los niveles de α -sinucleína en estado estacionario, especialmente en presencia de un alto nivel de PS/SC. Por lo tanto, dicha estrategia se puede usar para reducir los niveles de α -sinucleína en estado estacionario
 60 *in vivo*, incluso en el cerebro humano que está en riesgo de, o ya afectado por, los niveles críticamente elevados de contenido de α -sinucleína, por ejemplo, en un sujeto que tiene una sinucleinopatía. Por consiguiente, las estrategias

para aumentar la actividad de GBA y/o los niveles de PS/SC *in vivo* representan una nueva vía para el tratamiento neuroprotector de la enfermedad de Parkinson (EP) y las sinucleinopatías relacionadas.

Ejemplo 6: Establecimiento de un sistema de ELISA preciso, sensible e innovador para determinar cuantitativamente las concentraciones de α -sinucleína en células MES23.5 transfectadas

Para los experimentos y las investigaciones posteriores, se deseaba reducir la dependencia de los métodos de transferencia Western, que son de bajo rendimiento y tienen un intervalo dinámico limitado y, en su lugar, crear un sistema de ELISA cuantitativo de tipo sándwich (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) para la cuantificación de medio rendimiento de α S con una mayor sensibilidad, especificidad optimizada e intervalo dinámico.

Se generaron sueros de 6 conejos y se purificaron por afinidad en Open Biosystems, Inc. (<http://www.openbiosystems.com>) frente a α S humana de longitud completa, recombinante. La α S recombinante se había caracterizado por HPLC y MS, y sometido a los análisis de la composición de aminoácidos y de la concentración de proteínas. Para el ELISA, se recubrieron placas de 384 pocillos MaxiSorp (Nunc, Inc) con 50 μ l/pocillo de Ab policlonal de captura (hSA-2) diluido en tampón de recubrimiento (NaHCO_3 con NaN_3 al 0,2 %, pH 9,6). Tras lavar con PBS/Tween-20 al 0,05 % (PBS-T), se bloquearon las placas durante 2 horas a 37 °C en tampón de bloqueo (gelatina de piel de pescado al 1,125 %; PBS-T). Después de 4 lavados, se cargaron las muestras y se incubaron a 4 °C durante 12 horas. Se generó mAb Sin-1 biotinilado (como el Ab de ensayo) usando 200 μ g de sulfo-NHS-Biotina LC (Pierce), se diluyó en tampón de bloqueo y se añadió a la placa durante 2 horas a 37 °C. Tras 4 lavados, se aplicó fosfatasa ExtrAvidin (Sigma) diluida en tampón de bloqueo durante 1 h a 37 °C. El desarrollo del color se llevó a cabo mediante el uso de Fast-p-nitrofenil-fosfato (Sigma) y se monitorizó cinéticamente a DO de 405 nm cada 5 min durante un máximo de 60 min.

Se usaron diversas concentraciones de α S humana, recombinante, altamente purificada (r-h α S) como patrones para establecer la sensibilidad y el intervalo de ensayo de ELISA, como se muestra en la FIG. 3A ($r^2 > 0,98$).

Para optimizar una proporción de "ADN:Lipofectamine® 2000" con baja toxicidad celular, se transfectaron las células MES23.5 con bien 0,25, 0,5 o 1 μ g de ADNc de SNCA humano, de tipo silvestre, codificante de α S más ADNc de vector vacío hasta un total de 5,5 μ g de ADN por placa de 10 cm. 24 horas después de la transfección, se recogieron los lisados de células como se ha descrito anteriormente. Para diluciones en serie de los lisados celulares, se usó tampón de bloqueo que contenía lisado al 0,5 % de los pocillos transfectados con vector como diluyente, que también se usó para crear el blanco y la curva patrón correspondiente de α S humana recombinante. Se examinó la cinética de saturación para la identificación del/de los punto/s temporal/es en los que los patrones y las diluciones de muestras se encontraban en fase logarítmica.

Al analizar dichos lisados celulares mediante ELISA, se registraron concentraciones en las células MES- α S que mostraron el paralelismo esperado tras la dilución en serie, que eran dependientes de la dosis de ADNc de SCNA (ambos aspectos se demuestran en la gráfica de la Fig. 3B), y que permitieron, por primera vez, el cálculo exacto de la cantidad total de concentración de proteína α S expresada en las células vivas (como se muestra en la Fig. 3C).

También se confirmó que, en estas condiciones perfeccionadas de expresión celular, no se modificó la viabilidad de las células MES23.5 ni MES-sin, medida por LDH en medio acondicionado (lactato deshidrogenasa, una enzima normalmente citosólica), como marcador de la permeabilidad celular, y por la conversión celular de MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en formazán, como marcador del metabolismo celular intacto. Para estos ensayos de toxicidad convencionales, se realizó en paralelo un control positivo que conducía a una lisis celular del 100 % (tratamiento con Triton-X® 100 al 0,1 %). Los resultados se muestran en la FIG. 3D. Se determinó que, para el intervalo de concentraciones de ADNc seleccionadas en todos los experimentos, las células MES- α S y MES-vector fueron totalmente metabólicamente activas en el ensayo de MTT, y no mostraron ninguna liberación de LDH derivado del citosol en el medio acondicionado de las células transfectadas y no transfectadas. Por lo tanto, ambos ensayos demostraron integridad celular.

Ejemplo 7: Mutaciones relacionadas con las sinucleinopatías, así como dirigidas al sitio catalítico de la GBA potencian la acumulación de α -sinucleína en células MES dopaminérgicas

Se usó el sistema optimizado de expresión de células/lectura de ELISA descrito en el Ejemplo 6 para examinar los efectos de la sobreexpresión de proteínas GBA mutantes en los niveles de α S en células MES23.5.

Se transfectaron células MES con 0,5 μ g por placa de 10 cm de plásmido portador de ADNc de SNCA codificante de α S, más 5 μ g por placa de 10 cm de plásmido codificante de GBA humana de tipo silvestre o mutante. Las variantes de GBA usadas fueron de tipo silvestre, N370S, D409H, L444P, E235A y E340A. Estos 5 mutantes de GBA se crearon por mutagénesis dirigida, usando el kit Quickchange® (Stratagene), y se verificaron secuencialmente. Se sabe que N370S, D409H y L444P tienen lugar (en el estado homocigoto o heterocigoto del compuesto) en la enfermedad de Gaucher y, en el estado heterocigoto, en los pacientes con la enfermedad de Parkinson y/o los pacientes con demencia con cuerpos de Lewy. No se tiene conocimiento de la existencia de las proteínas GBA

mutantes con E235A y E340A en las personas. Se dirigen en el catalizador de ácido/base y nucleófilo, respectivamente, de la enzima GBA, y previamente han mostrado ser catalíticamente inactivas, a pesar de ser dirigidas adecuadamente al lisosoma (Fabrega *et al.*, 2000, "Glycobiology", vol 10, pág. 1217-1224).

5 24 horas después de la transfección, se lisaron las células MES como se describe anteriormente y todos los lisados se analizaron por ELISA. Como se demuestra en un gráfico de barras de material compuesto que resume varios experimentos de ELISA (mostrado en la FIG. 4), cuando se comparan los cambios en el estado estacionario de la α -sinucleína con cantidades conocidas de proteína α -sinucleína recombinante que se cargó en paralelo, se registró que la expresión conjunta (5 μ g/placa de 10 cm) de GBA de tipo silvestre (pero no prosaposina) con α S en estas
10 condiciones no cambió significativamente los niveles de α S ($109,7 \pm 9,88$ % de los niveles de control de ADNc de vector). Esto está en contraste con el resultado observado en el Ejemplo 5 anterior. La discrepancia observada puede reflejar las diferencias en el ADN total transfectado en los dos paradigmas (FIG. 2B; FIG. 2C frente a la FIG. 4), lo que conduce a cambios en la proporción de ADN:Lipofectamine® 2000 y en el papel de la prosaposina (saposina C) expresada conjuntamente. Por tanto, es concebible que la GBA de tipo silvestre puede tener efectos
15 variables en los niveles de α S en estas células MES23.5, dependiendo de la velocidad de importación de α S en los lisosomas y la composición, así como el estado de activación de más de un enzima lisosomal.

Por el contrario, la transfección conjunta con α S de los mutantes portadores de N370S, D409H o L444P de GBA relacionados con la enfermedad (5 μ g por placa de 10 cm) condujo sistemáticamente a la acumulación intracelular
20 de α -sinucleína, que fue $121,1 \pm 4,98$ %, $269,4 \pm 56,6$ % y $172,7 \pm 23,02$ % de los niveles de control (media \pm error estándar de la media, n = 4 (a -6), a partir de 5 experimentos independientes), como se demuestra en el gráfico de barras de la FIG. 4. Estos resultados ayudan a explicar, por primera vez, por qué las personas con las mutaciones N370S, D409H o L444P son más susceptibles a la enfermedad de Parkinson esporádica. Es interesante que la mutación que generalmente produce la forma más leve de la enfermedad de Gaucher (GD), en concreto, N370S,
25 potenció solamente una acumulación leve de α S, mientras que las asociadas a un fenotipo de GD más grave potenciaron una acumulación más destacada de α S intracelular (véase, por ejemplo, mutante D409H de GBA en la FIG. 4).

Para investigar si los efectos proacumuladores de las mutaciones de GBA sobre las concentraciones de α S se debían a un defecto de tráfico causante de un estrés celular más generalizado o a una pérdida de la función
30 enzimática dentro del lisosoma, a continuación, se emplearon dos mutantes adecuadamente dirigidos hacia el lisosoma, pero que presentaban la pérdida total de la función enzimática. La transfección conjunta con α S de las variantes portadoras de las mutaciones de sentido erróneo E235A y E340A de GBA (5 μ g por placa de 10 cm) condujeron a niveles de α -sinucleína intracelular que eran $231,0 \pm 37,14$ % y $156,4 \pm 19,65$ % de los niveles de ADN de vector de control, respectivamente (media \pm ETM, n = 4 (-6), a partir de 5 experimentos independientes), como se
35 demuestra en el gráfico de barras mostrado en la FIG. 4.

Basándose en los resultados de estos experimentos, parece que la pérdida de actividad de esta enzima lisosomal de tipo no proteasa contribuye, al menos en parte, al efecto acumulador de α S que fue inducido por los mutantes de
40 GBA humanos relacionados con la enfermedad.

Ejemplo 8: La expresión de la catepsina D reduce sistemática y significativamente los niveles de proteína α -sinucleína de una manera dependiente de la dosis

45 Se usó el sistema descrito en el Ejemplo 6 para examinar los efectos de una enzima lisosomal de tipo proteasa, en concreto, la catepsina D, sobre los niveles de α S transfectados conjuntamente.

Se transfectaron células MES23.5 con 0,5 μ g por placa de 10 cm de un plásmido portador de ADNc de SNCA humano, de tipo silvestre, codificante de α S (denominado células MES-hSNCA WT en la transferencia Western
50 mostrada en la FIG. 6), más bien 1,25, 2,5 o 5 μ g por placa de 10 cm de un plásmido humano de ADNc de CTSD codificante de la Catepsina D, que fue adquirido en OriGene Technologies, Inc., y que estaba bajo el control de un promotor de CMV. El clon de catepsina D se verificó secuencialmente por completo después del aislamiento y Maxiprep. Se equilibró cada grupo de transfección con vector de ADN vacío hasta un total de 5,5 μ g de ADN por
55 placa de 10 cm. 24 horas después de la transfección, se lisaron las células, y se analizaron los lisados resultantes mediante el ELISA de tipo sándwich descrito en el presente documento.

Como se demuestra en la FIG. 5, la expresión conjunta de la catepsina D humana redujo los niveles de proteína α -sinucleína intracelular. Esto ocurrió de una manera dependiente de la dosis de ADNc de CTSD, en tanto en cuanto
60 las cantidades crecientes de catepsina D transfectada conjuntamente generaron una reducción progresiva de los niveles de α -sinucleína intracelular. Al comparar los cambios en el estado estacionario de la α -sinucleína con los niveles conocidos de proteína α -sinucleína recombinante que se cargaron en paralelo, se calculó que la mayor concentración de sobreexpresión de catepsina D (5 μ g/placa de 10 cm) condujo a un nivel de α -sinucleína intracelular total que era $25,3 \pm 7,0$ % de los niveles de control (n = 11, a partir de 3 experimentos independientes). Los niveles más bajos de sobreexpresión de la catepsina D (1,25 μ g/placa de 10 cm y 2,5 μ g/placa de 10 cm)

condujeron a niveles de α -sinucleína intracelular que eran $68 \pm 17,7\%$ y $+53 \pm 16,8\%$ de los niveles de control, respectivamente ($n = 2$, a partir de 2 experimentos independientes). Del mismo modo, la catepsina D humana fue capaz de reducir los niveles de α S de rata transfectada conjuntamente, usando el mismo paradigma.

5 Para demostrar que el efecto reductor de α S de la catepsina D fue, de hecho, tan alto como del 75 por ciento de la cantidad total de concentración de α S intracelular detectable (y demostrar que este último efecto no se debía al sistema ELISA seleccionado), se confirmaron los resultados mediante transferencia Western. Como se muestra en la FIG. 6, se sondaron de forma independiente los lisados celulares con 2 anticuerpos anti-sinucleína diferentes: el sin-1 monoclonal descrito anteriormente, y un 7071AP policlonal de conejo (Periquet *et al.*, (2007) *J. Neurosci.*, 27:3338-46).

Es importante destacar que la expresión conjunta de la catepsina D con α S durante 24 horas no dio lugar a la generación de ninguna especie visible de peso molecular inferior o superior, según lo visualizado por sin-1 y 7071AP. Se obtuvo el mismo resultado al usar un tercer anticuerpo, hSA-2 policlonal de conejo, purificado por afinidad (datos no mostrados), y cuando las transferencias se sobredesarrollaron durante una exposición más prolongada.

Para confirmar que los efectos de la catepsina D tuvieron lugar *in vivo*, y no durante el procedimiento de lisis celular, se examinaron los efectos de un potente inhibidor de catepsina D, la pepstatina A, por su presencia en el tampón de lisis celular. Según lo mostrado en el gráfico de barras de la FIG. 5 (dos primeras barras a la izquierda), la inclusión de pepstatina A en el tampón de lisis no cambió la cantidad de α S detectada en el lisado, demostrando con ello que los resultados descritos en las FIG. 5 y 6 anteriores no eran una aberración del procedimiento de lisis celular.

Para confirmar que el efecto de la catepsina D en la reducción de α S en las células MES23.5 era específico y no se debía a una reducción general del metabolismo ni de la integridad celular, se realizaron ensayos de MTT y LDH en células MES-sin que habían sido transfectadas conjuntamente con la cantidad más alta de ADNc codificante de catepsina D ($5 \mu\text{g/placa}$ de 10 cm). La lisis de células con Triton-X[®] 100 al 0,1 % sirvió como control positivo, lo que representa la muerte celular máxima. Las células MES-Sin transfectadas conjuntamente con ADNc de CTSD mostraron una señal de MTT normal que no fue diferente de las células transfectadas con vector de control ($101,3 \pm 3,91\%$ y $100 \pm 4,05\%$, respectivamente; $n = 6$, a partir de 2 experimentos independientes). Del mismo modo, las células MES-sin transfectadas conjuntamente con catepsina D mostraron una señal de LDH que era idéntica a la de las células transfectadas en vector de control.

Para examinar si la catepsina D también podría reducir los niveles de proteínas α S portadoras de mutaciones de sentido erróneo, se transfectaron las células MES23.5 con cantidades bajas ($0,5 \mu\text{g/placa}$ de 10 cm) de ADNc de SNCA codificante bien de las variantes A30P, E46K o A53T de α -sinucleína que están vinculadas a la enfermedad de Parkinson familiar en seres humanos, así como un mutante S129D y S129A. Se sabe que la fosforilación de α S en el resto 129 de serina es una evidencia patológica de los agregados de α S *in vivo* (Anderson J. *et al.*, 2006, *J Biol Chem*, vol 281, pág. 29739-29752). En la técnica, se conoce la mutación de un resto de Ser en Asp para imitar la fosforilación sostenida, a base de serina. Para la comparación, también se incluyó un mutante S129A, un mutante incompetente en la fosforilación de α S.

Como se muestra en el gráfico de barras de la FIG. 7, la expresión conjunta del ADNc de CTSD que codifica la catepsina D ($5 \mu\text{g/placa}$ de 10 cm), ya sea con α S A30P, E46K, A53T, S129D o S129A causó una reducción de grado similar en los niveles de α S para todas las proteínas α S examinadas, en comparación con su expresión conjunta con el ADN del vector vacío. Al comparar los cambios en el estado estacionario de la α -sinucleína con los niveles bien caracterizados de proteína α -sinucleína recombinante que se cargaron en paralelo, se estimó que la sobreexpresión de catepsina D (a una concentración de ADNc de $5 \mu\text{g/placa}$ de 10 cm) condujo a niveles de α -sinucleína intracelular que eran $23,98 \pm 3,57\%$, $33,08 \pm 18,51\%$, $39,21 \pm 14,63\%$, $34,84 \pm 11,36\%$ y $34,31 \pm 13,39\%$ de los niveles de control afines, para los polipéptidos α S A30P, E46K, A53T, S129D o S129A, respectivamente ($n = 2$ (-3) a partir de 2-3 experimentos independientes).

Estos resultados sugieren (a) que la catepsina D es capaz de degradar también las formas mutantes de α S que se producen en la EP familiar; y (b) que la fosforilación o desfosforilación en el resto de Ser129 de α S no altera la actividad proteolítica ("sinucleinasa") presentada por la catepsina D hacia α S.

Cabe señalar que los restos D98 y Q99 de α S representan el motivo por el cual la α S es reconocida por el receptor Lamp2a durante la autofagia mediada por chaperonas (CMA); Cuervo *et al.*, 2004, *Science*, vol 305, pág. 1292-1295). Para investigar la importancia de este motivo en la acción de reducción de α S inducida por la catepsina D, las células MES 23.5 también se transfectaron con un ADNc ($0,5 \mu\text{g/placa}$ de 10 cm) codificante de una variante de α S mutante, en la que ambos restos D98 y Q99 se habían cambiado a alanina (A) por mutagénesis dirigida (es decir, variante DQ/AA de α S). Al comparar los cambios en el estado estacionario de α S DQ/AA a niveles bien caracterizados de proteína α -sinucleína recombinante que fueron cargados en paralelo, se estimó que la sobreexpresión de la catepsina D ($5 \mu\text{g/placa}$ de 10 cm) condujo a niveles de α S DQ/AA intracelular que eran $22,14$

$\pm 5,32\%$ de los niveles de control de vector, ($n = 3$, a partir de 3 experimentos independientes; no mostrado). Basándose en estos resultados, parece bien que la α -sinucleína también entra en el lisosoma mediante un método distinto de la CMA mediada por Lamp2a o que la catepsina D presenta y/o induce la actividad de la sinucleinasa extralisosomal.

5

Ejemplo 9. La expresión de la catepsina F reduce los niveles de proteína α -sinucleína

Se usó el sistema descrito en el Ejemplo 6 para examinar los efectos de otra enzima catepsina lisosomal, en concreto, la catepsina F, sobre los niveles de α S transfectados conjuntamente.

10

Se transfectaron células MES23.5 con 0,5 μ g por placa de 10 cm de plásmido portador de ADNc de SNCA codificante de α S más 5 μ g por placa de 10 cm de un plásmido humano de CTSF codificante de la Catepsina F, que fue adquirido en OriGene Technologies, Inc., y que estaba bajo el control de un promotor de CMV. El clon de catepsina F se verificó secuencialmente por completo después del aislamiento y Maxiprep. 24 horas después de la transfección, se lisaron las células, y se analizaron los lisados mediante ELISA de tipo sándwich.

15

Veinticuatro horas después de la transfección, la proteína catepsina F humana expresada conjuntamente redujo la concentración intracelular de proteína α -sinucleína, medida mediante ELISA de tipo sándwich. Al comparar los cambios en los niveles en estado estacionario de la α -sinucleína con los niveles bien caracterizados de proteína α -sinucleína recombinante que se cargaron en paralelo, se calculó que la sobreexpresión de catepsina F (5 μ g/placa de 10 cm) condujo a niveles de α -sinucleína intracelular que eran $51,7 \pm 14,1\%$ de los niveles de control ($n = 3$, a partir de 2 experimentos independientes).

20

Para confirmar que el efecto de la catepsina F en la reducción de α S era específico y no se debía a una reducción general de la integridad celular, se realizó el ensayo de LDH en células MES-sin que habían sido transfectadas conjuntamente con ADNc de CTSF codificante de catepsina FR (5 μ g/placa de 10 cm). La lisis de células con Triton-X[®] 100 al 0,1 % sirvió como control positivo de la toxicidad celular, potenciando la muerte celular máxima. Las células MES-Sin transfectadas conjuntamente con Catepsina F mostraron una señal de LDH que fue inferior o igual a la de las células transfectadas con vector de control (los datos son de 2 experimentos independientes; no mostrados).

25

30

Ejemplo 10: El aumento de la actividad de GBA previene la acumulación de α -sinucleína en un modelo de ratón

Se puede usar un modelo de ratón en el que la proteína α -sinucleína humana, de tipo silvestre, se produce en un exceso moderado en el cerebro como modelo para la acumulación de proteína α -sinucleína en los cuerpos celulares del cerebro. Se aumenta el nivel de actividad de GBA en el sistema nervioso central, ya sea mediante el tratamiento de los ratones con isofagomina (IFG), un azúcar imino que ha demostrado aumentar la actividad de GBA en ratones y seres humanos (Lieberman R *et al.*, (2007) *Nat Chem Biol.* Feb; 3(2):101-7), o una sustancia de tipo isofagomina, o mediante la administración o sobreexpresión de la proteína GBA en los ratones. El aumento de la actividad de GBA impide la acumulación dependiente de la edad de la proteína α -sinucleína en las células neuronales del sistema nervioso central y/o periférico.

35

40

Ejemplo 11: El aumento de la actividad de GBA proporciona un efecto terapéutico en el modelo de ratón de Parkinson

Se confirma el efecto terapéutico de aumento de la actividad de GBA en las neuronas en un nuevo modelo de enfermedad de Parkinson familiar, C3H-Tg (SNCA)83Vle, mostrando la reducción de la acumulación de los agregados de α -sinucleína en el cerebro de los animales de ensayo. Este modelo de ratón expresa la α -sinucleína humana A53T mutante bajo el control del promotor de proteína priónica de ratón (PRNP). El promotor de PRNP ha demostrado lograr altos niveles de expresión génica en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central. A los 8 meses de vida, los ratones B6;C3H-Tg(SNCA) 83Vle homocigotos comienzan a desarrollar el fenotipo progresivo y las inclusiones neuronales intracitoplasmáticas dependientes de la edad, de forma similar a lo observado en pacientes afectados con sinucleinopatías. El aumento de la actividad de GBA impide la acumulación dependiente de la edad de la α -sinucleína en los cuerpos celulares del cerebro y reduce el fenotipo de la enfermedad.

50

55

Ejemplo 12: El aumento de la actividad de la catepsina D previene la acumulación de α -sinucleína en un modelo de ratón

Se puede usar un modelo de ratón en el que la proteína α -sinucleína humana de tipo silvestre o mutante se produce en exceso moderado en el cerebro como modelo para la acumulación de proteína α -sinucleína en los cuerpos celulares del cerebro humano. Se aumenta la actividad de la catepsina D bien mediante el tratamiento de los ratones por vía sistémica o por infusión del cerebro o estereotácticamente con un activador o estabilizador de bajo peso

60

5 molecular de la actividad de la catepsina D, o mediante la administración o la sobreexpresión de la proteína catepsina D o su pre-pro-proteína *in vivo*. El aumento de la actividad de la catepsina D previene la acumulación dependiente de la edad de proteína α -sinucleína en los cuerpos celulares del cerebro. Por supuesto, se pueden realizar los mismos ensayos usando otros polipéptidos de catepsina, prepolipéptidos y con polinucleótidos que codifican los mismos.

Ejemplo 13: El aumento de la actividad de la catepsina D proporciona un efecto terapéutico en el modelo de ratón de Parkinson

10 Se confirma el efecto terapéutico del aumento de la actividad de la catepsina D en las neuronas en un nuevo modelo de enfermedad de Parkinson familiar, C3H-Tg(SNCA)^{83Vle}, mostrando la reducción de la acumulación de agregados de α -sinucleína en el cerebro de los animales de ensayo. Dicho modelo de ratón expresa la α -sinucleína humana A53T mutante bajo el control del promotor de proteína priónica (PRNP) de ratón. El promotor PRNP ha demostrado lograr altos niveles de expresión génica en la mayoría de las neuronas del sistema nervioso central. A
15 los 8 meses de vida, ratones B6;C3H-Tg(SNCA)^{83Vle} homocigotos comienzan a desarrollar el fenotipo progresivo e inclusiones neuronales intracitoplasmáticas dependientes de la edad, de forma similar a las observadas en pacientes afectados con α -sinucleinopatías. El aumento de la actividad de la catepsina D impide la acumulación dependiente de la edad de la α -sinucleína en los cuerpos celulares del cerebro y reduce el fenotipo de la enfermedad. Por supuesto, este modelo se puede usar para ensayar otras catepsinas de una manera similar.

20 **Otras realizaciones**

Se ha descrito una serie de realizaciones de la invención. Sin embargo, se entenderá que se pueden realizar diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Por consiguiente, existen otras realizaciones en el
25 alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Uso de uno o ambos de entre:

un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y

un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA), en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con una sinucleinopatía, pero no una enfermedad relacionada con el almacenamiento lisosomal diagnosticada clínicamente, en donde el polipéptido o el polinucleótido se administran en una cantidad eficaz para reducir un nivel de α -sinucleína en el sistema nervioso central o periférico, o en ambos, de un sujeto, o en el compartimiento lisosomal de un sujeto.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que la sinucleinopatía es una sinucleinopatía primaria.

3. El uso de la reivindicación 2, en el que la sinucleinopatía comprende una o más de:

enfermedad de Parkinson (EP), demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB); insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de α -sinucleína; atrofia multisistémica (MSA); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro cerebral; y enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada.

4. El uso de la reivindicación 1, en el que la sinucleinopatía es una sinucleinopatía secundaria.

5. El uso de la reivindicación 4, en el que la sinucleinopatía comprende una o más de:

enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; parálisis supranuclear progresiva; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas; parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático.

6. El uso de la reivindicación 1 que comprende además la administración de uno o más agentes que potencian la autofagia de los complejos de α -sinucleína, o un polipéptido que potencia el procesamiento degradativo de los complejos de α -sinucleína en los lisosomas.

7. El uso de la reivindicación 6, en el que el agente comprende un inhibidor de mTOR.

8. El uso de la reivindicación 6, en el que el agente comprende rapamicina o un análogo de rapamicina.

9. El uso de la reivindicación 6, en el que el agente comprende uno o más de everolimus, ciclosporina, FK506, hsc70, *N*-octil-4-epi- β -valienamina y glicerol.

10. El uso de la reivindicación 6, en el que el agente comprende una molécula pequeña, una molécula grande, un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico o un fragmento biológicamente activo del mismo.

11. Uno o ambos de:

un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y

un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA),

para su uso en un método de tratamiento de una sinucleinopatía que no es una enfermedad de almacenamiento lisosomal diagnosticada clínicamente.

12. Uso de uno o ambos de:

un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y

un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA), en la preparación de un medicamento para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con uno o más de: enfermedad de Parkinson (EP), demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB); insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de α -sinucleína; atrofia multisistémica (MSA); neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro cerebral; enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a edad avanzada; enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; temblor esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas; parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinocerebelosa esporádica o hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); y trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo ocular idiopático; en donde el polipéptido

o el polinucleótido se administran en una cantidad eficaz para reducir el nivel de α -sinucleína en el sistema nervioso central o periférico, o en ambos, de un sujeto, o en el compartimiento lisosomal de un sujeto.

13. Uno o ambos de:

- 5 un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) y
un polinucleótido que codifica un polipéptido de β -glucocerebrosidasa ácida (GBA) para su uso en un método de
tratamiento de la enfermedad de Parkinson (EP), demencia esporádica o hereditaria con cuerpos de Lewy (DLB);
10 insuficiencia autonómica pura (PAF) con deposición de α -sinucleína; atrofia multisistémica (MSA);
neurodegeneración hereditaria con acumulación de hierro cerebral; enfermedad fortuita de cuerpos de Lewy a
edad avanzada; enfermedad de Alzheimer de la variante de cuerpos de Lewy; síndrome de Down; temblor
esencial con cuerpos de Lewy; parkinsonismo familiar con o sin demencia; demencia ligada al gen tau y al gen
de la progranulina con o sin parkinsonismo; enfermedad de Creutzfeldt Jakob; encefalopatía espongiiforme
15 bovina; enfermedad de Parkinson secundaria; parkinsonismo resultante de la exposición a neurotoxinas;
parkinsonismo inducido por fármacos con deposición de α -sinucleína; ataxia espinoocerebelosa esporádica o
hereditaria; esclerosis lateral amiotrófica (ELA); o trastorno conductual del sueño de movimiento rápido del globo
ocular idiopático.

Figura 1:

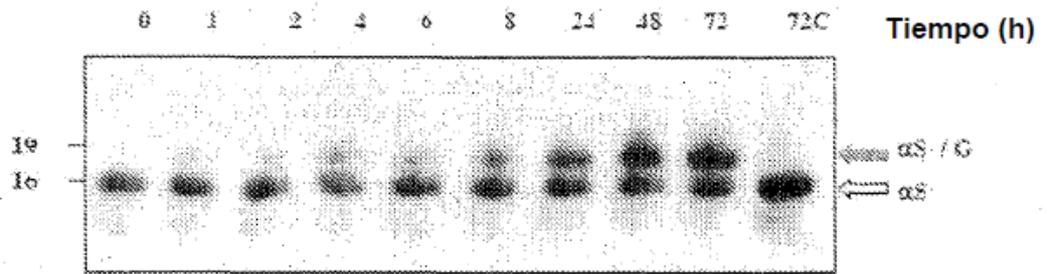


Figura 2A:

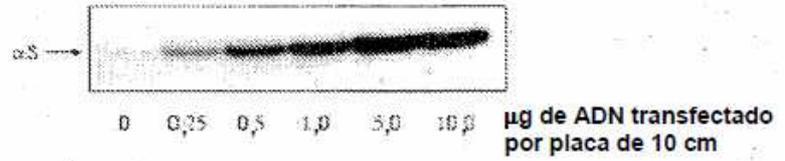


Figura 2B:

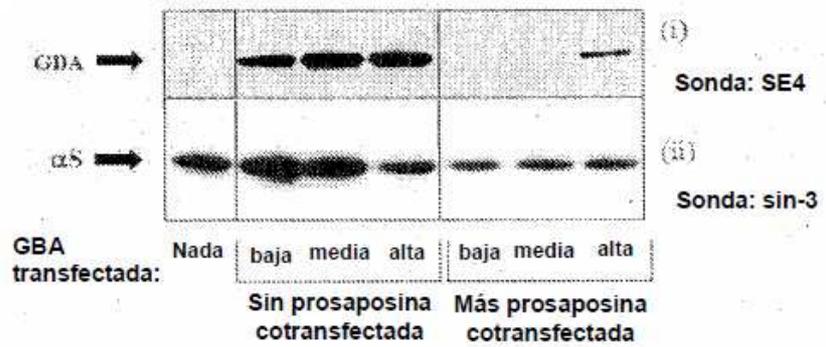


Figura 2C:

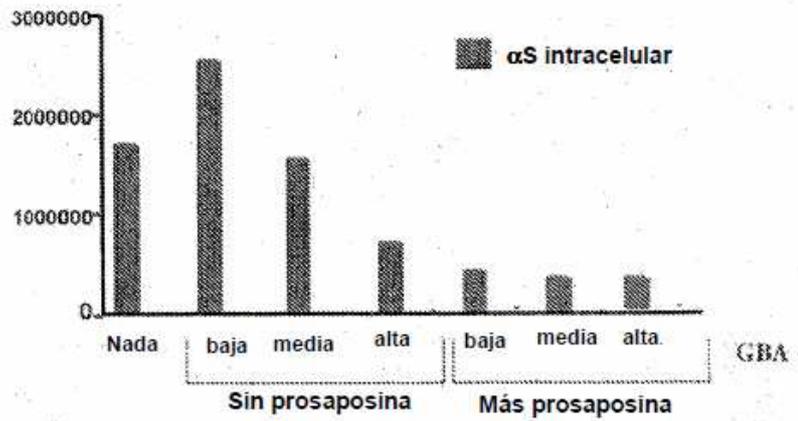


Figura 3A:

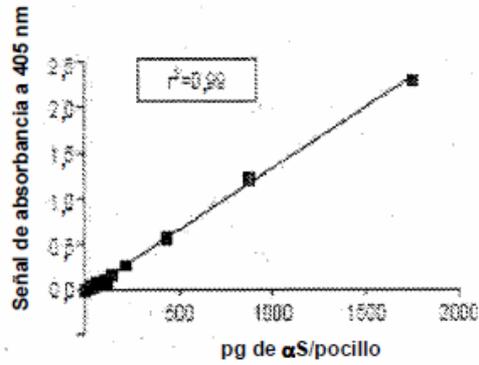


Figura 3B:

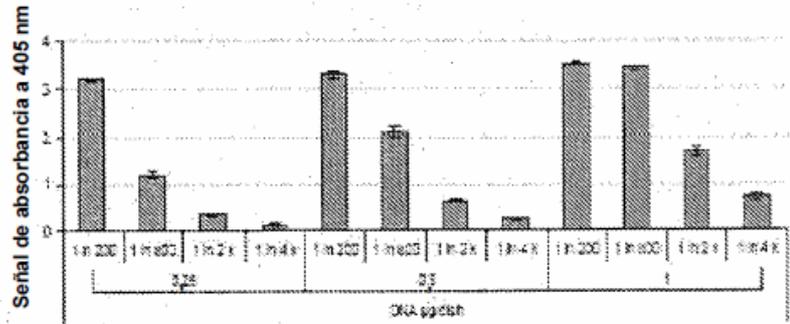


Figura 3C:

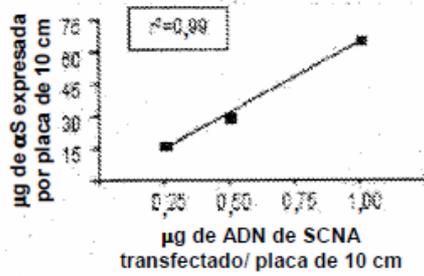


Figura 3D:

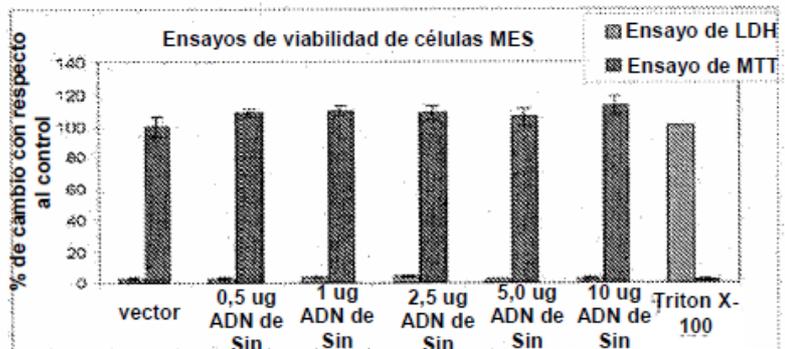


Figura 4:

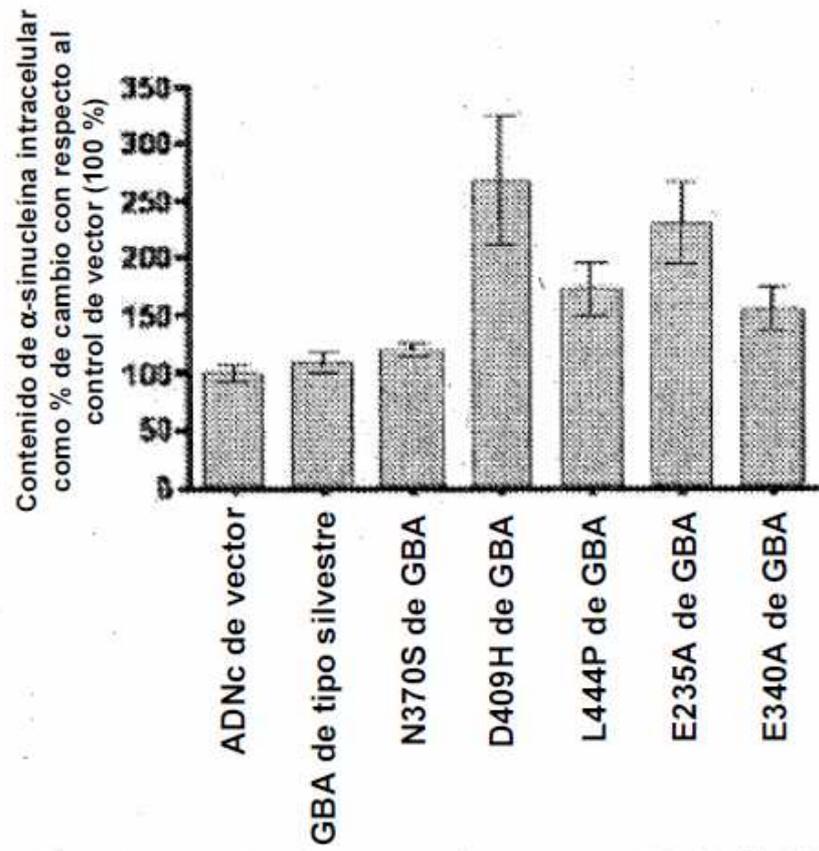
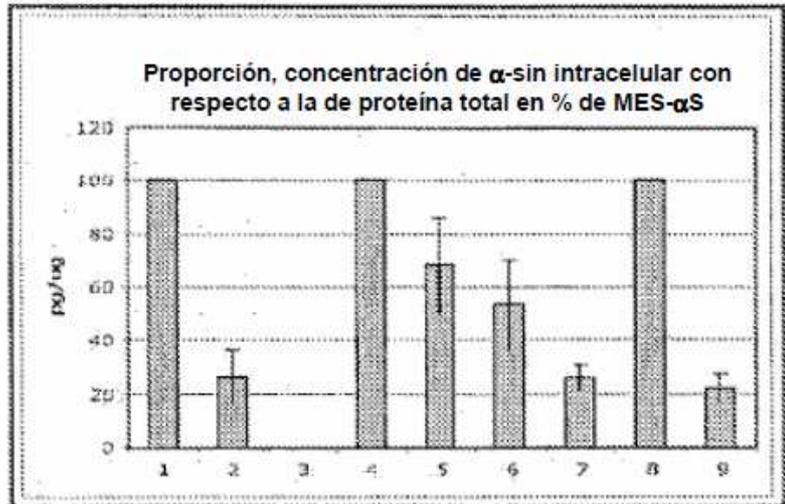


Figura 5:



Células MES:	hSCNA	vec	SNCA humana WT	SNCA de rata
CTSD (ug):	0,0 5,0	5,0	0,0 1,25 2,5 5,0	0,0 5,0
Pepstat. A:	-- --	+	+ + + +	+ +

Figura 6:

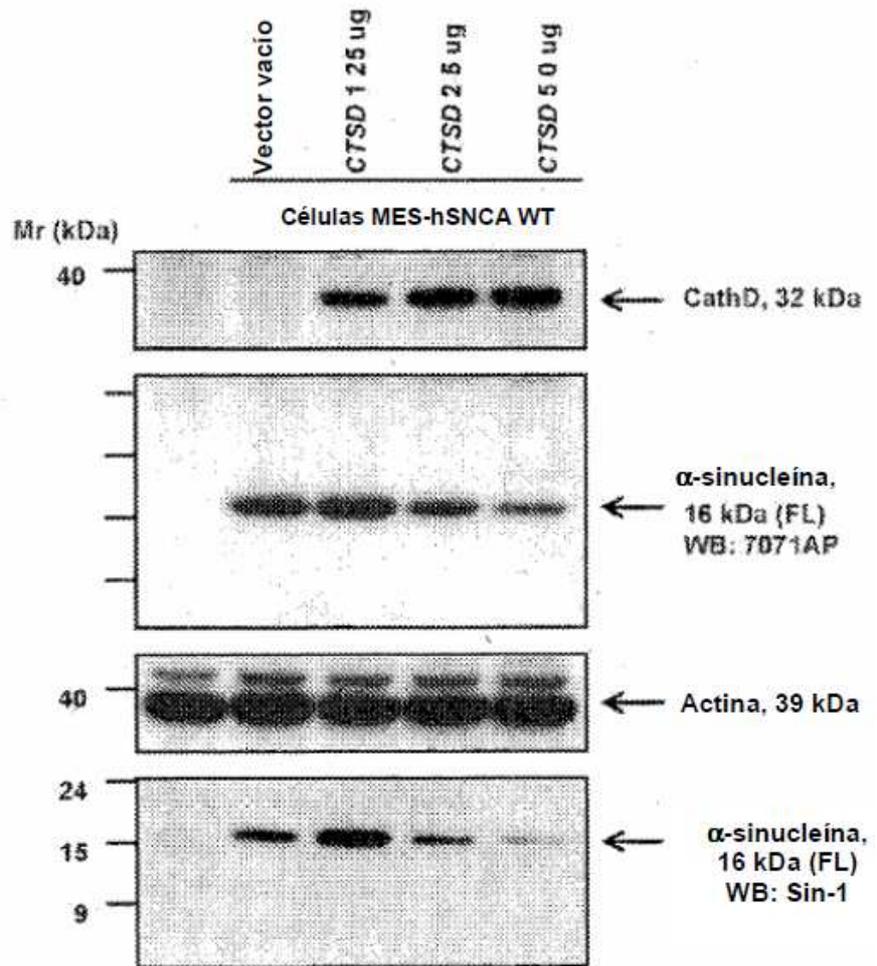


Figura 7:

