

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 840**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2010 PCT/CA2010/001360**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11022843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010 E 10811085 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2470192**

54 Título: **Uso de una holotoxina para reducir la degradación asociada al retículo endoplásmico de proteínas mal plegadas**

30 Prioridad:

28.08.2009 US 237910 P

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

07.07.2017

73 Titular/es:

**THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN (100.0%)
555 University Avenue
Toronto, Ontario M5G 1X8, CA**

72 Inventor/es:

LINGWOOD, CLIFFORD

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 622 840 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de una holotoxina para reducir la degradación asociada al retículo endoplásmico de proteínas mal plegadas

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un procedimiento de bloqueo de la degradación asociada al RE de proteínas mal plegadas. La invención se refiere además al uso de una holotoxina para bloquear la degradación mediada por ERAD de proteínas mal plegadas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El retículo endoplásmico desempeña un papel clave en el control de calidad de la traducción de proteína y la modificación postraduccional. Están presentes muchos sistemas en el RE para la detección de proteínas mal plegadas. La selección para formación de complejos y eliminación por degradación proteolítica después de retrotranslocación desde el RE al citosol es el principio central de este proceso (ERAD - Degradación asociada con el retículo endoplásmico). A su vez, así se regula la respuesta de las proteínas no plegadas y otras vías de señalización relacionadas con la tensión del RE.

20 En muchas enfermedades genéticas, tal vez todas, existen mutaciones que no afectan a la función primaria de la proteína dada pero provocan algunos cambios pequeños en el plegamiento de la proteína dentro del RE, de manera que se reconoce como una proteína mal plegada para iniciar este mecanismo de control de calidad, de manera que la proteína se degrada y no se le permite madurar mediante el transporte anterógrado a través del Golgi/TGN/vesículas secretoras en la superficie celular o secreción.

25

Se han descrito numerosos procedimientos ingeniosos que intentan rescatar dichas proteínas mutantes funcionales aunque mal plegadas y degradadas, para permitir el escape, la maduración y el tráfico de ERAD hasta el lugar correcto para la inversión funcional del fenotipo patógeno. Entre ellos se incluye el uso de chaperonas químicas, inhibidores de chaperonas, sustratos o inhibidores enzimáticos. Entre las enfermedades en las que se estudian de forma intensiva estos enfoques están la artritis, la fibrosis quística, enfermedades de almacenamiento lisosómico, aspectos de la dislipidemia, la hipertensión, la biosíntesis del colesterol y la enfermedad de la α 1-antitripsina.

30

RESUMEN DE LA INVENCION

35 En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con ERAD, tales como artritis, fibrosis quística, enfermedad del almacenamiento lisosómico de glucoesfingolípidos, dislipidemia, hipertensión, biosíntesis del colesterol, enfermedad de la alfa 1-antitripsina, enfermedad de Gaucher, enfermedad por infección por VIH, síndrome de Robinow, síndrome de Walker-Warburg, amaurosis congénita de Leber, tipo 1, deficiencia de la acetilcolinesterasa de la placa terminal, neuropatía de Charcot-Marie-Tooth 1B, defecto del transporte de la glucosa, proteinosis alveolar pulmonar, telangiectasia hemorrágica hereditaria, hipertensión pulmonar primaria familiar, eritroqueratodermia variable, enfermedad de Tangier y deficiencia de HDL, síndrome de Smith-Lemli-Opitz, desmosterolosis y estenosis aórtica supra valvular, donde dicha composición comprende una holotoxina modificada que es capaz de experimentar transporte retrógrado al retículo endoplásmico y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, donde la holotoxina modificada comprende una subunidad A inactivada.

45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A continuación se describirá la presente invención en más detalle con referencia a las siguientes figuras:

50

la Figura 1 ilustra un plásmido que muestra una subunidad A inactivada que contiene VT1 de acuerdo con una realización de la presente invención;

la Figura 2 es un western blot que muestra VT y VT1 inactivada que protege Δ F508CFTR de ERAD;

la Figura 3 es un western blot que muestra VT y VT inactivada que protegen MDR1 mal plegada de ERAD; y

55

la Figura 4 es un western blot que muestra la toxina del cólera que protege Δ F508CFTR de ERAD en células HeLa y BHK.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención proporciona el uso de una holotoxina en el que la subunidad A ha sido inactivada opcionalmente para el transporte retrógrado desde la superficie celular al RE y para bloquear parcialmente el translocón Sec61 situado en el RE, para permitir que las proteínas mutantes parcialmente mal plegadas pero funcionalmente competentes escapen a la degradación asociada al RE (ERAD) y rescaten el fenotipo celular defectuoso.

Cualquier holotoxina que experimente transporte retrógrado al RE donde la subunidad A activada proteolíticamente se separa de las subunidades B y es translocada en el citosol por medio del translocón Sec61 puede emplearse para su uso con el fin de rescatar proteínas mutantes parcialmente mal plegadas pero funcionalmente competentes con el fin de escapar a la degradación asociada al RE (ERAD). Los ejemplos de holotoxinas adecuadas para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen la ricina, las toxinas Shiga o similares a Shiga (tales como verotoxina - VT1), la toxina del cólera, abrina modicina, exotoxina A de *Pseudomonas* y toxina codificada por plásmidos (Pet) de *Escherichia coli* de enteroagregación. La toxina del cólera, la verotoxina y la ricina unidas a la superficie celular experimentan transporte retrógrado al RE donde la subunidad A activada proteolíticamente se separa de las subunidades B y es translocada en el citosol por medio del translocón Sec61. Este es el mismo translocón usado en la vía de degradación asociada al RE para eliminar las proteínas no plegadas para su ubiquitinación y su digestión citosólica por el proteosoma.

La subunidad A de la holotoxina seleccionada puede inactivarse para su uso de acuerdo con la presente invención. Los procedimientos de inactivación de la subunidad A de una holotoxina están bien establecidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, residuos mutantes dentro de la subunidad A que son necesarios para la actividad de la subunidad A. En una realización de la presente invención, una verotoxina 1 no tóxica, mutada en residuos cruciales en el sitio activo de la subunidad A, por ejemplo mutaciones tales como Y77S y E167Q, es adecuada para su uso. También pueden obtenerse variaciones las mutaciones referidas anteriormente, y en particular en los aminoácidos usados en las mutaciones referidas anteriormente, y las mostradas en la Figura 1, siempre que las mutaciones inactiven la subunidad A.

La subunidad A es translocada en el citosol pero no puede inhibir la síntesis de proteínas. Así, la subunidad A, opcionalmente inactivada, actúa como un inhibidor competitivo de la ocupación de translocos con el fin de realizar el rescate de una proteína mutante parcialmente mal plegada pero funcionalmente competente de ERAD. Por ejemplo, la subunidad A de verotoxina 1, opcionalmente inactivada, es efectiva para el rescate de $\Delta F508CFTR$ mutante.

La subunidad A puede ser modificada adicionalmente, por medios conocidos en la técnica, para proporcionar un inhibidor más eficiente del translocón y un bloqueo mejorado de ERAD. Las modificaciones adecuadas incluyen la adición de una entidad, tal como una secuencia de péptidos, a la subunidad A que fomenta adicionalmente la función de la subunidad A de inhibición del translocón. Por ejemplo, podría añadirse una secuencia de hexahistidina, mostrada para bloquear el canal de la toxina diftérica o una secuencia de 18-25 péptidos apolares (una secuencia de final de transferencia) de las proteínas secretoras/de membrana translocadas (por ejemplo, de la glucoforina o del receptor LDL) para intentar bloquear el paso del translocón. Otro enfoque incluye el acoplamiento de un inhibidor Sec61, tal como CAM741, a la subunidad A, o el acoplamiento de un inhibidor que bloquea la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (RE) tal como el inhibidor químico, Eeyarestatina I (Eerl).

Tal como se indicó anteriormente, en una realización, la presente invención proporciona el uso de verotoxina, también referida como toxina Shiga y similar a Shiga, y en particular una subunidad A de verotoxina mutada no tóxica, como un mecanismo para dirigirse al RE con el fin de rescatar funcionalmente proteínas genéticamente mal plegadas pero funcionales mediante el bloqueo del translocón. Podría usarse el término "cirugía intracelular" para describir el proceso expuesto en la presente memoria descriptiva.

En una realización alternativa, se usa una toxina del cólera que incluye una subunidad A mutada no tóxica, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En una realización alternativa, se usa una toxina de ricina que incluye una subunidad A mutada no tóxica, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. A partir de lo anterior se entenderá, que aunque la realización de la presente invención que usa una subunidad A de verotoxina mutada puede comprender sólo la subunidad A mutada, las toxinas del cólera y de ricina incluirán las subunidades B y las subunidades A mutadas.

En otra realización, los fragmentos de anticuerpos Fab o sus fagos análogos pueden dirigirse al RE para el suministro selectivo de proteínas de unión dentro del compartimento subcelular.

La presente invención incluye además el uso de modificaciones de la subunidad A para aumentar la retención dentro del translocón con el fin de incrementar la eficacia del enfoque descrito en la presente memoria descriptiva. La presente invención incluye también el uso de dichas quimeras de subunidad A transferidas en una toxina de ricina inactivada para proporcionar una terapia de base más amplia para reducir la ERAD de proteínas parcialmente mal plegadas en cualquier tejido. Además, la presente invención proporciona una subunidad A, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, que puede ser modificada adicionalmente para transportar varias moléculas que podrían ser beneficiosas para mejorar defectos en el tráfico, la función, la ordenación, la glucosilación y otras modificaciones postraduccionales de las proteínas, lo que incluye chaperonas que ayudan al plegamiento de las proteínas mutantes dentro de la luz del retículo endoplásmico, por ejemplo, ambroxol que estabiliza la glucocerebrosidasa mutante en la enfermedad de Gaucher.

Se proporciona también un procedimiento para tratar una enfermedad resultante de o que se deriva por otros medios de ERAD, por ejemplo una enfermedad relacionada con la ERAD. El procedimiento comprende la administración a un sujeto, tal como un mamífero o un no mamífero, de una holotoxina en la que la subunidad A está opcionalmente inactivada. El término "mamífero" se usa en la presente memoria descriptiva para referirse a mamíferos humanos y no humanos, por ejemplo gatos, perros y caballos.

Las enfermedades relacionadas con ERAD son enfermedades en las que la ERAD en sí es esencialmente el instigador de la enfermedad, por las que se eliminan proteínas mutantes funcionales pero parcialmente mal plegadas, lo que conduce a los síntomas de la enfermedad. En algunas enfermedades la degradación ERAD elimina una proteína ligeramente mal plegada pero, por lo demás, funcional, para provocar un estado patológico. Todas estas enfermedades son candidatas para terapia basada en el enfoque del bloqueo del translocón descrita en la presente memoria descriptiva. Así, la enfermedad relacionada con ERAD incluye, pero no se limita a, artritis, fibrosis quística, enfermedades de almacenamiento lisosómico de glucoesfingolípidos, aspectos de dislipidemia, hipertensión, biosíntesis del colesterol, enfermedad de la α 1-antitripsina, enfermedad de Gaucher y enfermedad por infección por VIH. En la Tabla 1 mostrada a continuación se recogen otras enfermedades relacionadas con ERAD que son candidatas para terapia basada en el enfoque divulgado en la presente memoria descriptiva, mostrada anteriormente en Human Molecular Genetics 2005 14(17):2559-2569. Los genes enumerados en la Tabla 1 son los identificados como fuertes candidatos a la retención del RE. Incluyen enfermedades donde la localización de la mutación o los datos experimentales sugieren un defecto en el plegamiento o el tráfico. Se entenderá que las enfermedades enumeradas en la presente memoria descriptiva incluyen algunas de las enfermedades conocidas que se asocian actualmente con la degradación ERAD. Se entenderá que todas y cualquiera de las enfermedades que se asocian según lo que se sabe con la degradación ERAD se contemplan también dentro del alcance de la presente invención.

Tabla 1

Gen	Enfermedad	Sistema afectado	Efecto potencial de la mutación o mutaciones patógenas
<i>ROR2</i>	Síndrome de Robinow	Esquelético, corazón	Disrupción en plegamiento de proteínas
<i>POMT1</i>	Síndrome de Walker-Warburg	Musculoesquelético	Disrupción en TMD
<i>GUCY2D</i>	Amaurosis congénita de Leber, tipo I	Ocular	Referida posible retención en el RE ^a
<i>COLQ</i>	Deficiencia de la acetilcolinesterasa de la placa terminal	Muscular	Disrupción en plegamiento de proteínas
<i>MPZ</i>	Neuropatía de Charcot-Marie-Tooth 1B	Neurológico	Referida posible retención en el RE ^b
<i>SLC2A1</i>	Defecto del transporte de la glucosa	Barrera hematoencefálica	Disrupción en TMD
<i>CSF2RB</i>	Proteinosis alveolar pulmonar	Pulmón	Disrupción en estructura terciaria
<i>ACVRL1</i>	Telangiectasia hemorrágica hereditaria	Vascular/pulmonar	Referida posible retención en el RE ^c
<i>BMPR2</i>	Hipertensión pulmonar primaria familiar	Vascular/pulmonar	Disrupción en plegamiento de proteínas
<i>GJB3</i>	Eritroqueratodermia variable	Piel	Referida posible retención en el RE ^d
<i>GJB4</i>	Eritroqueratodermia variable	Piel	Disrupción en TMD
<i>ABCA1</i>	Enfermedad de Tangier y	Cardiovascular	Disrupción en plegamiento de

	deficiencia de HDL		proteínas
<i>DHCR7</i>	Síndrome de Smith-Lemli-Opitz	Cardiovascular	Disrupción en plegamiento de proteínas
<i>DHCR24</i>	Desmosterolosis	Cardiovascular	Disrupción en plegamiento de proteínas
<i>ELN</i>	Estenosis aórtica supravalvular	Cardiovascular	Disrupción en plegamiento de proteínas

La holotoxina puede administrarse en solitario o en combinación con al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aceptable para su uso en las técnicas farmacéutica y veterinaria, es decir, que no es inaceptablemente tóxico o inadecuado por otro motivo. Los ejemplos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, excipientes y similares. Puede hacerse referencia a "Remington's: The Science and Practice of Pharmacy", 21^a ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005, como orientación sobre formulaciones farmacológicas en general. La selección del adyuvante depende del modo de administración pretendido de la composición. En una realización de la invención, los compuestos se formulan para su administración por infusión, o por inyección ya sea por vía subcutánea o intravenosa, y se usan en consecuencia como soluciones acuosas en forma estéril o libre de pirógenos y opcionalmente con tampón o convertida en isotónica. Así, los compuestos pueden administrarse en agua destilada o, más de forma más conveniente, en suero salino con tampón de fosfato o solución de dextrosa al 5%. Las composiciones para administración oral mediante comprimido, cápsula o suspensión se preparan usando adyuvantes que incluyen azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y derivados de la misma, que incluyen carboximetilcelulosa, etilcelulosa y acetato de celulosa sódicos; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tales como aceites de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de maíz; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; agar; ácidos alginicos; agua; suero salino isotónico y soluciones con tampón de fosfato. También pueden estar presentes agentes de humectación, lubricantes tales como laurilsulfato de sodio, estabilizadores, agentes de formación de comprimidos, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes y agentes saborizantes. Pueden prepararse cremas, lociones y pomadas para aplicación tópica usando una base apropiada tal como una base de triglicéridos. Dichas cremas, lociones y pomadas también pueden contener un agente activo de superficie. También pueden prepararse formulaciones de aerosol, por ejemplo, para administración nasal, en las que se usan adyuvantes propulsores adecuados. También pueden añadirse otros adyuvantes a la composición con independencia de cómo se administre, por ejemplo, pueden añadirse agentes antimicrobianos a la composición para prevenir el crecimiento microbiano durante periodos de almacenamiento prolongados.

Además, la presente invención proporciona el control de la dosificación de la subunidad A mutante o no mutante que contiene la holotoxina que se usa. La dosificación de la holotoxina puede ajustarse de manera que la inhibición competitiva sea parcial. En algunas aplicaciones un escape de ERAD de hasta aproximadamente el 10% podría ser suficiente para corregir el fenotipo defectuoso y un experto en la materia puede determinar fácilmente las dosificaciones apropiadas para conseguir esta corrección. Como entenderá un experto en la materia, la dosificación puede variar con la holotoxina que se use, la enfermedad o dolencia que se trate y el sujeto que se trate. En una realización, pueden usarse dosificaciones de holotoxina en el intervalo de aproximadamente 1 a 100 ng/kg, por ejemplo 10 ng/kg.

Una aplicación de la presente invención proporciona un nuevo enfoque viable para el rescate de la mutación $\Delta F508$ CFTR con el fin de incrementar el transporte de cloruro en células CF. La presente invención proporciona un nuevo enfoque terapéutico para la mutación más común en la fibrosis quística.

La subunidad A que contiene holotoxina tal como se describe en la presente memoria descriptiva también puede usarse como antídotos para las toxinas parentales dado que se prevendrá la translocación RE de la subunidad A natural debido al bloqueo parcial, por la subunidad A inactivada catalíticamente que contiene holotoxina, del translocón. En una realización de la presente invención la subunidad A inactivada que contiene holotoxina incluye una secuencia de final de transferencia. Los ejemplos del tipo de secuencia de final de transferencia incluyen, pero no se limitan a, VFIVSVGSFITSVLFIVI o secuencias de final de transferencia que tienen 9-18 residuos de leucina. También pueden realizarse variaciones en la longitud de la secuencia anterior y las extensiones pueden añadirse en dos etapas.

La presente invención también proporciona una subunidad A de holotoxina VT1 con la adición de una secuencia de final de transferencia de polileucina. La secuencia de final de transferencia puede añadirse al extremo N de la

subunidad A inactivada de VT1. Las secuencias de final de transferencia comprenden en general aproximadamente 9-18 residuos de aminoácidos hidrófobos. Esta secuencia puede añadirse en el extremo N de la subunidad A de VT1 para incrementar la eficiencia de bloqueo del translocón. Además, la adición de dos aminoácidos básicos al extremo C de la secuencia de final de transferencia aumenta la eficiencia de final de translocación. Por tanto, también pueden 5 añadirse dos lisinas en el extremo C de la adición de final de transferencia de polileucina. En cambio, se ha demostrado que la adición de residuos de aminoácidos negativos en el extremo C reduce la eficiencia del final de translocación. Por tanto, la adición de una secuencia de final de transferencia a la subunidad A de VT1 puede reducir la síntesis bacteriana de la holotoxina modificada. La colocación de cargas negativas en el extremo C y de cargas positivas en el extremo N del inserto de polileucina puede favorecer la función de final de transferencia durante el 10 tránsito retrógrado, y no anterógrado, a través del translocón Sec61, es decir, la secuencia de final de transferencia debería tener un efecto mínimo durante la síntesis bacteriana de toxinas pero un efecto máximo cuando se dirige al RE y se somete a retrotranslocación a través del translocón hasta el citosol, aunque no se conoce la orientación de la subunidad A de VT1 cuando entra en el translocón (es decir, primero en el extremo N o C). La presente invención incluye construcciones en las que el motivo de dilisina básico se incluye en el extremo C y se incorpora un dímero 15 ácido de ácido aspártico en el extremo N del inserto de polileucina y a la inversa. Las construcciones de holotoxina pueden expresarse en un vector, tal como puc19, y la holotoxina preparada puede purificarse mediante cromatografía de afinidad Gb₃ mediada por la subunidad B, tal como se describe en Noakes KL y col., 1999 y Boulanger J, Huesca M, Arab S, Lingwood CA. Universal method for the facile production of glycoplipid/lipid matrices for the affinity purification of binding ligands. Anal Biochem. 1994; 217:1-6.

20 La eficacia del final de transferencia se corresponde aproximadamente con la hidrofobia de la secuencia de aminoácidos aunque existen variaciones y excepciones, tal como se describe en Saaf A., Wallin E, von Heijne G. Eur J Biochem 1998, 251:821-829. La secuencia de final de transferencia CFIVSVGSFITSVLFI, puede fusionarse con la subunidad A de VT1, de nuevo en las dos orientaciones. Puede usarse la tecnología de extensión de cebadores 25 por PCR para añadir la secuencia en el extremo 5' del gen de la subunidad A de VT1. La secuencia completa puede prepararse en dos etapas, añadiendo 9 aminoácidos en cada una. La holotoxina puede purificarse mediante cromatografía de afinidad tal como se describe anteriormente.

A continuación se describirá la presente invención en los ejemplos siguientes que no deben entenderse como 30 limitativos.

Ejemplo 1 - Uso de VT1 para el rescate de Δ F508CFTR de la degradación

El tratamiento de Δ F508CFTR que expresa células HeLa con VT1 natural o VT1 inactiva, tal como se describe 35 anteriormente (residuos catalíticos en la subunidad A necesarios para la despurinación mutada) mostró pronto un claro rescate de Δ F508CFTR en relación con la degradación, en un plazo de 2 a 4 horas desde el tratamiento con la toxina.

Tal como se muestra en la Figura 2, las células HeLa transfectadas para expresar CFTR natural o Δ F508CFTR 40 fueron tratadas con verotoxina 1 o VT1 que contenía una subunidad A inactivada. La preparación de la toxina inactivada fue menos pura que la VT1 natural y se usó por tanto a una concentración superior. El grado de expresión de CFTR se determinó mediante Western blot del extracto celular. En células que expresan CFTR natural, se detectan las especies de CFTR glucosiladas de lactosamina superiores inmaduras (núcleo glucosilado) y maduras. Para Δ F508CFTR sólo se detectan las especies glucosiladas en núcleo inferiores. El CFTR natural se somete a 45 ERAD y el tratamiento con VT1 produce un ligero incremento del CFTR natural debido a bloqueo ERAD. Para Δ F508CFTR tanto la VT1 inactivada como la natural indujeron un aumento de hasta 10 veces en el grado de expresión comparado con células de control no tratadas lo que indicaba un escape significativo de ERAD.

Ejemplo 2 - Uso de VT1 para el rescate de mutante de MDRI

50 Para confirmar adicionalmente la inhibición de ERAD se observó el efecto de VT1 y de VT1 mutante inactiva en las células HeLa transfectadas para expresar un mutante mal plegado (G268V) de MDR1, la bomba de eflujo del fármaco (descrita en Loo TW, Clarke DM, FASEB J 1999; 13: 1724-1732). De nuevo, tanto la VT1 como la VT1 mutante indujeron la acumulación de MDR1 que además fue degradado por ERAD, tal como se muestra en la Figura 55 3. Se observó un incremento de 5-20 veces en el grado del mutante G268V MDR1 expresado en células HeLa después de 2 h de tratamiento con la holotoxina VT1 inactivada o natural.

Ejemplo 3 - Uso de toxina del cólera para el rescate de Δ F508CFTR

Se determinó el efecto de la toxina del cólera en la expresión de $\Delta F508CFTR$ en las células BHK, no sensibles a VT1 pero, como la mayoría de las células, sensibles a la toxina del cólera. Se demostró que la toxina inducía el escape de ERAD de $\Delta F508CFTR$ en estas células, tal como se muestra en la Figura 4. Las células HeLa transfectadas con $\Delta F508CFTR$ en las células BHK transfectadas con $\Delta F508CFTR$ o natural fueron tratadas con toxina del cólera durante 2 horas y el grado de $\Delta F508CFTR$ o natural objeto de seguimiento mediante western blot. Una cantidad de 10 ng/ml de toxina del cólera indujo un aumento de hasta 5 veces $\Delta F508CFTR$. El incremento se observó tanto en células BHK como en células HeLa dado que la toxina del cólera se une a gangliósido GMI, expresado en estas dos líneas celulares.

10 **Ejemplo 4 - Uso de VT1 para el rescate de GCC células en la enfermedad de Gaucher**

La VT1 reduce ERAD de la enzima GCC (glucocerebrosidasa) en las células de la enfermedad de Gaucher, lo que permite que madure más cantidad de enzimas y que se reduzca potencialmente la acumulación de glucosilceramida responsable de la enfermedad.

15

Ejemplo 5 - Construcción de secuencia de final de transferencia que contiene verotoxina inactivada

Se prepararon dos construcciones diferentes para generar aminoácido de final de transferencia que contenía proteína verotoxina A inactivada. Una tenía 9 aminoácidos de final de transferencia de leucina y la otra construcción tenía una secuencia de 18 aminoácidos aleatorios. Se usaron los dos conjuntos de cebadores de PCR (Tabla 2) para generar cada aminoácido de final de transferencia que contenía la proteína A de verotoxina inactivada. La primera amplificación por PCR introdujo 9 leucinas o 18 aminoácidos aleatorios en la secuencia de proteína A de verotoxina inactivada usando plásmido pSW09 (Vaccine 2006, 24:1142). La segunda PCR usó dos cebadores externos y amplificó una proteína A de verotoxina inactivada completa que contenía un aminoácido de final de transferencia. El plásmido pSW09 tiene dos mutaciones en la secuencia de VTA: Y77S y E167Q. Los fragmentos de ADN fueron digeridos con BamHI y EcoRI y se ligaron en pSK+ (Stratagene). Los plásmidos resultantes eran secuencia de final de transferencia que contenía verotoxina A mutante.

Construcción de aminoácidos de final de transferencia que contienen proteína VTA inactivada

Se preparan dos construcciones diferentes para generar aminoácidos de final de transferencia que contienen proteína A de verotoxina inactivada. Una tiene aminoácidos de final de transferencia de 9 leucinas (JBC, 1991, 266:9251) y la otra construcción tiene una secuencia de 18 aminoácidos aleatorios (EJB, 1998, 251:821). Los dos conjuntos de cebadores de PCR (Tabla 1) se usan para generar cada aminoácido de final de transferencia que contiene la proteína A de verotoxina inactivada. La primera amplificación por PCR introduce 9 leucinas o 18 aminoácidos aleatorios en la secuencia de proteína A de verotoxina inactivada usando el plásmido pSW09 (Vaccine 2006, 24:1142). La segunda PCR usa dos cebadores externos y amplifica la proteína A de verotoxina inactivada completa que contiene el aminoácido de final de transferencia. El plásmido pSW09 tiene dos mutaciones en la secuencia VTA: Y77S y E167Q. Los fragmentos de ADN son digeridos con BamHI y EcoRI y se ligan en pSK+ (Stratagene). Los plásmidos resultantes son secuencias de final de transferencia que contienen verotoxina A mutante.

Tabla. Conjunto de oligonucleótidos para introducir secuencias de final de transferencia

Cebadores	Secuencia
9 leucinas-directos externos	5'-GTGGATCCTCAAGGAGTATTG-3'
9 leucinas-inversos internos	5'-CGAGAAGTCTAAGGTAATTCCTT CAG GAG CAA CAG TAG AG GAG CAA CGCCACCACATTAAGTGA-3'
9 leucinas-directos internos	5'-TCAGTTAATGTGGTGGCG TTG(L) CTC(L) CTT(L) CTA(L) CTG(L) TTG(L) CTC(L) CTG(L) AAGGAATTTACCTTAGACTTCTCG-3'
9 leucinas-inversos externos	5'-GTGAATTCACAACACTGACTG-3'
18 aminoácidos aleatorios-directos externos	5'-GTGGATCCTCAAGGAGTATTG-3'
18 aminoácidos aleatorios-inversos internos	5'-CGAGAAGTCTAAGGTAATTCCTT GAT GAC GAT GAA AAG GAC ACT AGT CAT GAA ACT ACC CAC GCT GAC GAT GAA GAC CGCCACCACATTAAGTGA-3'
18 aminoácidos aleatorios-directos	5'-TCAGTTAATGTGGTGGCG GTC(V) TTC(F) ATC(I) GTC(V)

internos	AGC(S) GTG(V) GGT(G) AGT(S) TTC(F) ATG(I) ACT(T) AGT(S) GTC(V) CTT(L) TTC(F) ATC(I) GTC(V) ATC(I) AAGGAATTTACCTTAGACTTCTCG-3'
18 aminoácidos aleatorios-inversos externos	5'-GTGGAATTCAACAACACTGACTG-3'

() denota letra de codón de aminoácido.

Si bien la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones y ejemplos ilustrativos, la descripción no debe entenderse en un sentido limitativo. Así, para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones de las realizaciones ilustrativas, así como otras realizaciones de la invención, a partir de la referencia a la presente descripción. Por tanto se contempla que las reivindicaciones adjuntas cubrirán todas estas modificaciones o realizaciones. Además, todas las reivindicaciones se incorporan en el presente documento con referencia a la descripción de las realizaciones preferidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> The Hospital for Sick Children
- 5 <120> Uso de una holotoxina para reducir la degradación asociada al retículo endoplásmico de proteínas mal plegadas
- <130> HSC-C-P1398EP
- 10 <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
- 20 <400> 1
- Val Phe Ile Val Ser Val Gly Ser Phe Ile Thr Ser Val Leu Phe Ile**
1 5 10 15
- Val Ile**
- <210> 2
- 25 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
- <400> 2
- 30 **Cys Phe Ile Val Ser Val Gly Ser Phe Ile Thr Ser Val Leu Phe Ile**
1 5 10 15
- Val Ile**
- <210> 3
 <211> 21
- 35 <212> ADN
 <213> Artificial
- <220>
 <223> Cebador sintético
- 40 <400> 3
- gtggatcctc aaggagtatt g** **21**
- <210> 4
- 45 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 622 840 T3

	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 4		
5	cgagaagtct aaggtaaatt ccttcaggag caacagtaga ggagcaacgc caccacatta		60
	actga		65
	<210> 5		
	<211> 66		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador sintético		
15	<400> 5		
	tcagttaatg tggtggcgtt gctccttcta ctgttgctcc tgaaggaatt taccttagac		60
	ttctcg		66
	<210> 6		
20	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Cebador sintético		
	<400> 6		
	gtgaattcaa caactgactg		20
30	<210> 7		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 7		
	gtggatcctc aaggagtatt g		21
40	<210> 8		
	<211> 96		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Cebador sintético		
	<400> 8		
	cgagaagtct aaggtaaatt ccttgatgac gatgaaaagg aactagtca tgaaactacc		60
50	cacgotgacg atgaagaccg ccaccacatt aactga		96

ES 2 622 840 T3

<210> 9
<211> 96
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

10 <400> 9

tcagttaatg tggtagcggt attcatcgtc agcgtgggta gtttcatgac tagtgcctt 60

ttcatcgtca tcaaggaatt taccttagac ttctcg 96

<210> 10
<211> 21
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador sintético

20 <400> 10

gtggaattca acaactgact g 21

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con ERAD, tal como artritis, fibrosis quística, enfermedad del almacenamiento lisosómico de glucoesfingolípidos, dislipidemia, hipertensión, biosíntesis del colesterol, enfermedad de la alfa 1-antitripsina, enfermedad de Gaucher, enfermedad por infección por VIH, síndrome de Robinow, síndrome de Walker-Warburg, amaurosis congénita de Leber, tipo 1, deficiencia de la acetilcolinesterasa de la placa terminal, neuropatía de Charcot-Marie-Tooth 1B, defecto del transporte de la glucosa, proteinosis alveolar pulmonar, telangiectasia hemorrágica hereditaria, hipertensión pulmonar primaria familiar, eritroqueratodermia variable, enfermedad de Tangier y deficiencia de HDL, síndrome de Smith-Lemli-Opitz, desmosterolosis y estenosis aórtica supraauricular, donde dicha composición comprende una holotoxina modificada que es capaz de experimentar transporte retrógrado al retículo endoplásmico y un adyuvante farmacéuticamente aceptable, donde la holotoxina modificada comprende una subunidad A inactivada.
2. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 1, donde la holotoxina se selecciona de entre el grupo que consiste en ricina, abrina, toxina Shiga tal como verotoxina 1, toxina del cólera y exotoxina A.
3. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 2, donde la subunidad A de la holotoxina incluye una secuencia de final de transferencia.
4. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 3, y el final de transferencia se selecciona de entre 18-25 péptidos apolares, 9-18 residuos de leucina o VFIVSVGSFITSVLFIVI.
5. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 2, donde la holotoxina es verotoxina e incluye una secuencia de final de transferencia en su extremo N que comprende 9-18 residuos de aminoácidos hidrófobos.
6. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 5, donde la secuencia de final de transferencia comprende dos aminoácidos básicos en su extremo C.
7. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 1, donde la holotoxina es verotoxina y comprende un residuo mutado en al menos una de las posiciones 77 y 167, tal como Y77S o E167Q, o una toxina del cólera.
8. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 5, donde la secuencia de final de transferencia comprende 9-18 residuos de leucina, VFIVSVGSFITSVLFIVI o CFIVSVGSFITSVLFIVI.
9. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 2, donde la holotoxina es verotoxina y rescata uno de entre un mutante de MDR1, un mutante de CFTR o glucocerebrosidasa.
10. La composición para su uso tal como se define en la reivindicación 2, donde la holotoxina es la toxina del cólera y rescata un mutante de CFTR.

FIGURA 1

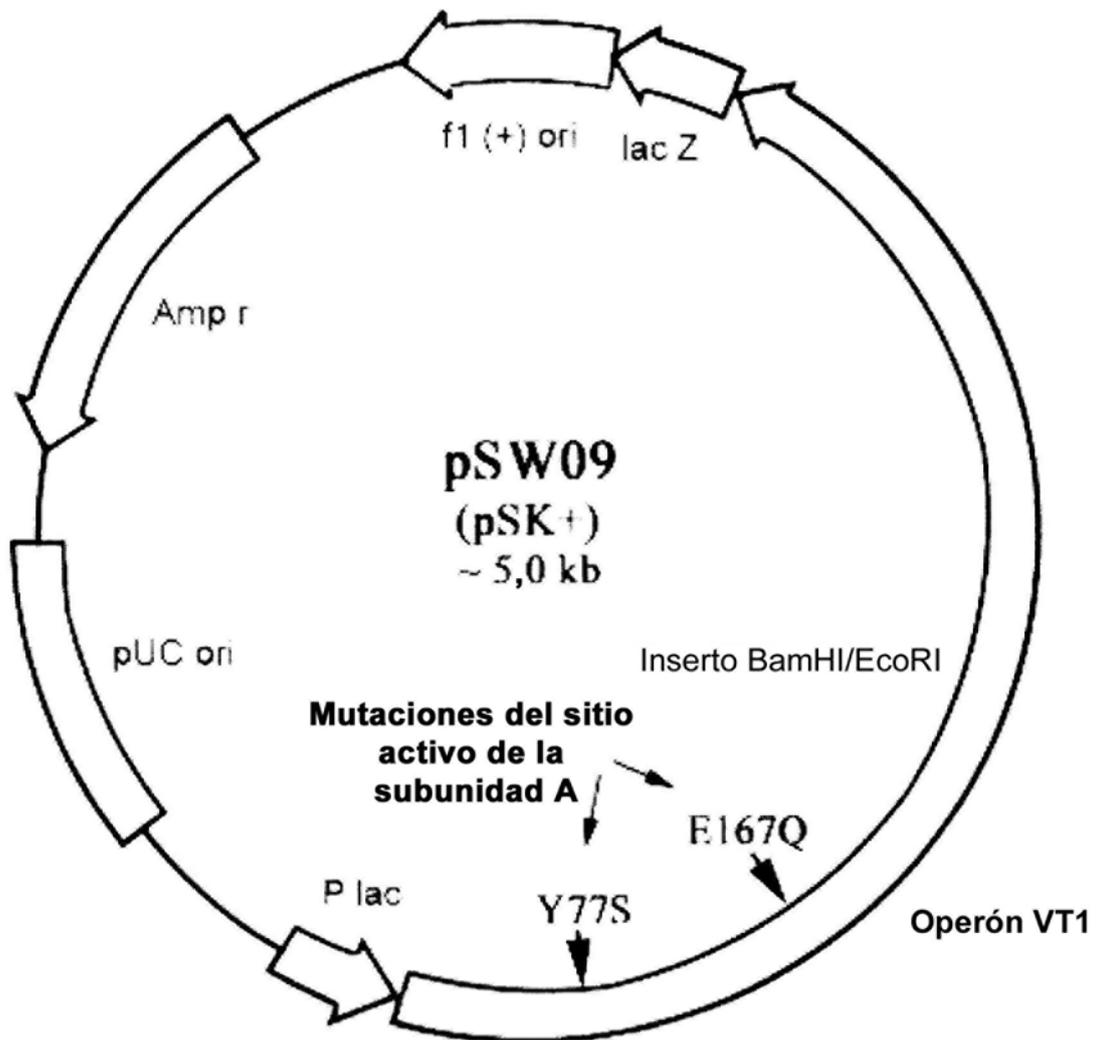


FIGURA 2

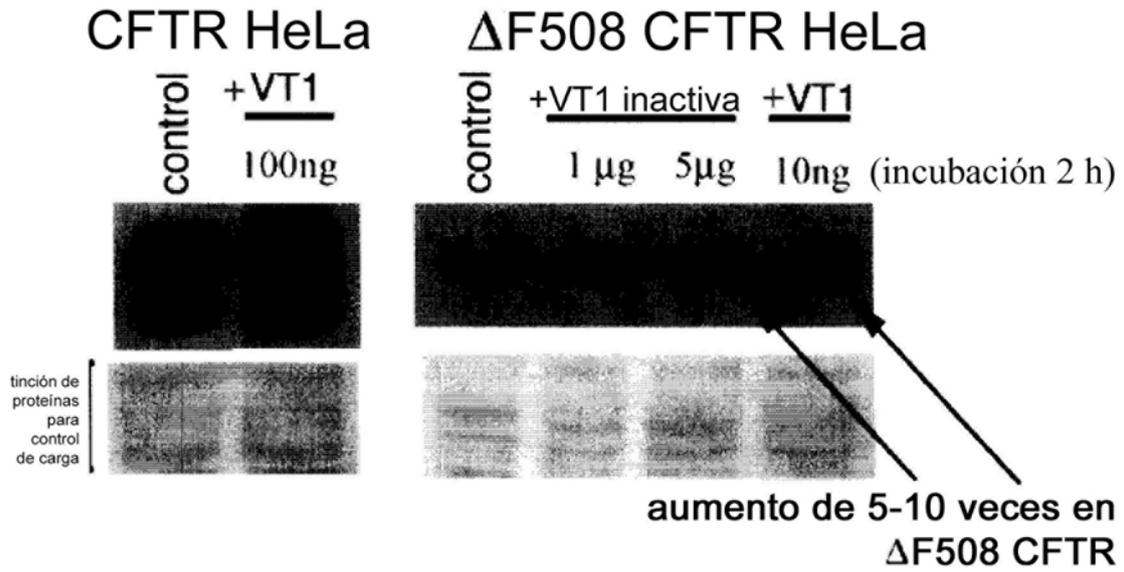


FIGURA 3

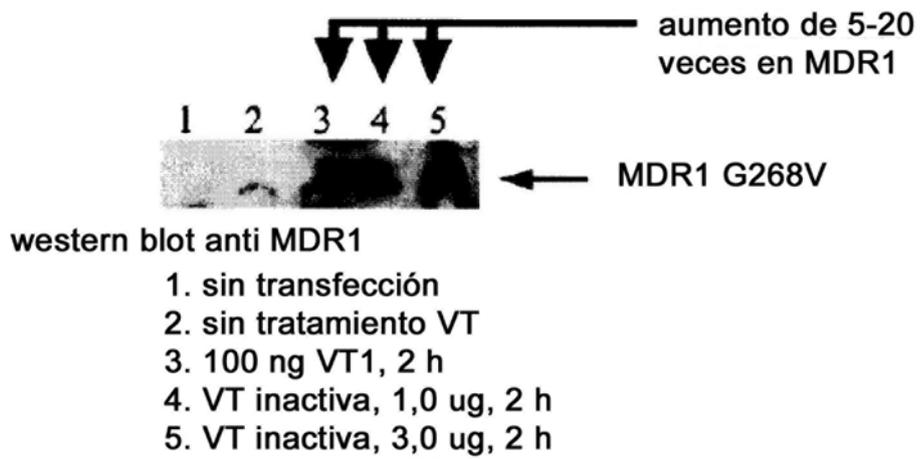


FIGURA 4

